

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“Efectos de la noradrenalina sobre la complejidad dendrítica en cultivos
de neuronas hipocampales”**

**TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN BIOQUÍMICA
ÁREA DE ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA Y
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIOQUÍMICO**

Por

David Antonio Neira Mora

Directoras de Tesis

Dra. Jenny Fiedler Temer

BQ. Paulina Rojas Domínguez

Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile, 2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

DAVID ANTONIO NEIRA MORA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Bioquímica área de especialización Bioquímica Clínica y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____.

Directores de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler Temer

BQ. Paulina Rojas Domínguez

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela Pedevila
(Presidenta)

Dra. Alejandra Álvarez Rojas

Dr. Alfonso Paredes Vargas

Esta Tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1080489 y ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

Presentaciones en congresos científicos

- David Neira, Paulina Rojas, Jenny Lucy Fiedler. Participación de la activación del receptor beta2-adrenérgico en la organización del citoesqueleto en neuronas hipocampales. XXXII Sociedad de Farmacología de Chile, Valdivia, noviembre de 2010.
- David Neira, Paulina Rojas, Jenny Lucy Fiedler. Role of beta2-adrenergic receptor activation in cytoskeleton arrangement in hippocampal neurons. VII Sociedad Chilena de Neurociencia, Santa Cruz, septiembre de 2011.

*“Serán vecinos el lobo y el cordero,
y el leopardo se echará con el cabrito,
el novillo y el cachorro pacerán juntos,
y un niño pequeño los conducirá.*

*La vaca y la osa pacerán,
juntas acostarán sus crías,
el león, como los bueyes, comerá paja.*

*Hurgará el niño de pecho en el agujero del áspid,
y en la hura de la víbora el recién destetado meterá la mano.*

*Nadie hará daño, nadie hará mal en todo mi santo Monte,
porque la tierra estará llena de conocimiento de Yahveh,
como cubren las aguas el mar”*

Isaías 11, 6-9

Agradecimientos

Durante la realización de esta Tesis, y durante la mayor parte de mi vida, he tenido la gracia de verme rodeado de muchísimas personas de gran valor e importancia. Consciente de que no seré capaz de transmitir de forma completamente fidedigna los sentimientos de gratitud a cada una de ellas a través de estas líneas, intentaré al menos dejar un registro de lo agradecido que estoy de la vida y de quienes me han acompañado a caminar en ella.

En primer lugar, agradezco a Dios, sin tener aún mucha certeza de su naturaleza, de lo que desea de mí o de las libertades y responsabilidades que desde Él me corresponden. Agradezco en particular, y muy humildemente, la confianza que se me ha depositado al disponer de las vidas de aquellos animales que formaron parte de mis experimentos. Asumo esto como una responsabilidad enorme, no sólo con el mundo de la ciencia y la investigación, sino también con mi propio crecimiento personal y mis expectativas de vida futura.

En segundo lugar, agradezco a mis padres Elisabeth y Flavio, a mis hermanos Johanna y Darío, a mi tía Alicia y a mis parientes cercanos, por tenerme la paciencia y la fortaleza de acompañarme a la distancia, por el cariño y el apoyo emocional, por los pocos pero muy valiosos días que hemos compartido en los años de mi vida universitaria. Deseo de todo corazón el poder corresponder a tan nobles sentimientos.

Después quiero agradecer a los compañeros con quienes tuve el gusto de compartir dentro del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética, tanto por su calidad profesional como por su gran valor individual y colectivo. En particular quisiera agradecer a la Dra. Jenny Fiedler por su dedicación a cada uno de los proyectos y pequeños sueños que forman parte del Laboratorio, más allá de los resultados experimentales y mucho más cerca de la realización y el cumplimiento de los sueños de cada uno de nosotros, y muy en particular por su inmensa paciencia conmigo. Agradezco también a la BQ Paulina Rojas, por su disposición a enseñarme, su amistad y su brillante desempeño como compañera de trabajo. También extender el agradecimiento a José Luis, Karina, Claudio, Patricia, Romina, Viviana, José, Lorena, Aníbal, Camila, Javier, Sebastián, Damaris, Sergio, Mauricio, Valentina, Natalia, Clarita, y a todos quienes de una u otra forma aportaron al desarrollo de mi Tesis.

Quiero también recordar a los siguientes investigadores, para destacar los importantes aportes realizados para el desarrollo de esta Tesis: a la Dra. Lorene Lanier (Universidad de Minnesota), la Dra. Bonnie Firestein y el Dr. Christopher Langhammer (Universidad de Rutgers), por su ayuda para la implementación de la metodología de cuantificación de morfología dendrítica; la Dra. Katia Gysling y la Dra Inés Forray (Pontificia

Universidad Católica de Chile), por su cooperación en la medición de noradrenalina por HPLC en los cultivos, y al Dr. Jorge Fuentealba (Universidad de Concepción) por su colaboración con los experimentos de electrofisiología. Además deseo extender este agradecimiento a Paola Birkner y a los integrantes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Quiero extender muy especialmente mi agradecimiento, como un estudiante que ha dejado su tierra y su familia para cumplir con el anhelo de la educación universitaria, a todos aquellos quienes desinteresadamente me abrieron las puertas de su hogar: Miguel y Myriam; Nancy, Carlos, Carlitos y Sergio; Ruth y David. Junto con ello, recordar a todos aquellos que han compartido pensión conmigo, y en particular a mis compañeros y amigos de la residencia universitaria Juan Gómez Millas. No quisiera dejar de mencionar a mis actuales compañeros de departamento, Osvaldo y Francisco.

Quiero recordar además a todos mis amigos de la Vicaría Pastoral Universitaria, del Coro Savia Nueva, a los miembros de la comunidad Adsis de Santiago, a todos los alumnos a quienes he tenido la fortuna de enseñar durante mi período como ayudante-alumno en la Universidad y también en forma especial a las profesoras Ruth Alcarraz y Else Lemp. Extiendo el agradecimiento a mis amigos del preuniversitario popular Preumed, a mis compañeros de equipo de futbolito NN, a mis compañeros de generación, a los amigos con quienes pude compartir los días en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, y por supuesto a los grandes amigos de mi vida: Carolina, David, Pablo, Mariela, María José, María Francisca, Sandra, Mauricio... y a todos aquellos que el apuro me ha hecho olvidar, espero puedan disculparme.

Finalmente, quiero agradecer a Eliana por hacerme feliz y enamorar cada día de mi vida.

Espero poder retribuir de la mejor forma cada una de las buenas cosas que la vida me ha entregado a través de todos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice General	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	vi
Abreviaturas	vii
Resumen	ix
Summary	xi
1.- Introducción	1
1.1.- Receptores adrenérgicos	1
1.2.- Inervación noradrenérgica y su relación con la función hipocampal	4
1.3.- Disfunción de la neurotransmisión adrenérgica y función hipocampal	5
1.4.- Noradrenalina y su relación con BDNF	5
2.- Hipótesis	8
3.- Objetivos	8
3.1.- Objetivo General	8
3.2.- Objetivos Específicos	8
4.- Metodología	9
4.1.- Reactivos generales	9
4.2.- Animales	9
4.3.- Cultivo primario de neuronas hipocampales	10
4.4.- Estrategia farmacológica	11

4.5.- Obtención de extractos neuronales	14
4.6.- Electroforesis y Western Blot	14
4.7.- Inmunocitoquímica	17
4.8.- Medición de calcio citosólico	19
4.9.- Evaluación de la actividad sináptica espontánea	19
4.10.- Cuantificación de largo y número de dendritas y análisis de Sholl	20
4.11.- Análisis estadístico	22
5.- Resultados	24
5.1.- Activación farmacológica de los receptores β_2 adrenérgicos	24
5.2.- Presencia y distribución del receptor β_2 -adrenérgico en cultivos primarios hipocámpales	30
5.3.- Efecto de agonistas adrenérgicos sobre la morfología dendrítica	35
5.3.1.- Análisis de Sholl	37
5.3.2.- Puntos de ramificación	40
5.3.3.- Número de dendritas	40
5.3.4.- Largo dendrítico total	43
5.3.5.- Largo dendrítico promedio	48
6.- Discusión	52
6.1.- Reducción de la complejidad dendrítica asociada a la activación de receptores adrenérgicos	52
6.2.- Efecto de la noradrenalina sobre la morfología neuronal	52
6.3.- Cascadas transduccionales en neuronas asociadas a cambios en la morfología dendrítica	58

7.- Resumen	60
8.- Consideraciones del estudio	62
9.- Conclusiones	64
10.- Referencias	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura Nº 1	Esquema de un terminal nervioso noradrenérgico	3
Figura Nº 2	Esquema de estimulación farmacológica para cultivos primarios de neuronas hipocampales	12
Figura Nº 3	Metodología para cuantificación de largo y número de dendritas de neuronas hipocampales	23
Figura Nº 4	Metodología para análisis de Sholl de neuronas hipocampales	24
Figura Nº 5	Procesamiento de imágenes para la cuantificación dendrítica y análisis de Sholl	25
Figura Nº 6	Niveles de p-CREB en cultivos mediante Western Blot	28
Figura Nº 7	Inmunocitoquímica para p-CREB en cultivos 7 DIV	29
Figura Nº 8	Medición de señales intracelulares de Ca ²⁺ en cultivos primarios hipocampales 10 DIV	32
Figura Nº 9	Medición de corrientes sinápticas espontáneas en cultivos primarios hipocampales 12 DIV	33
Figura Nº 10	Determinación de los niveles de receptor β_2 adrenérgico durante distintos DIV en cultivos primarios hipocampales	34
Figura Nº 11	Imágenes representativas de neuronas 8 DIV utilizadas para medición de morfología dendrítica	36
Figura Nº 12	Efecto de agonistas β_2 -adrenérgicos sobre el número de intersecciones del análisis de Sholl para cultivos primarios hipocampales 8 DIV	38
Figura Nº 13	Análisis de Sholl para la estimulación con Noradrenalina (NA) de cultivos primarios hipocampales 8 DIV.	39

Figura Nº 14	Análisis de Sholl para la estimulación con Clenbuterol de cultivos primarios hipocampales 8 DIV.	40
Figura Nº 15	Análisis de puntos de ramificación para cultivos primarios hipocampales 8 DIV	42
Figura Nº 16	Efecto de la estimulación con NA sobre el número de dendritas primarias y secundarias por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV	43
Figura Nº 17	Efecto de la estimulación con Clenbuterol sobre el número de dendritas primarias y secundarias por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV	44
Figura Nº 18	Efecto de la estimulación con NA sobre el largo dendrítico total por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV	46
Figura Nº 19	Efecto de la estimulación con Clenbuterol sobre el largo dendrítico total por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV	47
Figura Nº 20	Efecto de la estimulación con NA sobre el largo dendrítico promedio por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV	49
Figura Nº 21	Efecto de la estimulación con Clenbuterol sobre el largo dendrítico promedio por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla Nº 1	Afinidad de los fármacos utilizados para la activación de receptores adrenérgicos	13
Tabla Nº 2	Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot	16
Tabla Nº 3	Listado de anticuerpos utilizados para Inmunocitoquímica	18
Tabla Nº 4	Esquema de experimentos de colocalización	18

ABREVIATURAS

AC	Adenililciclasa
AKT	Proteína quinasa B
AMPAr	Receptor para ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análisis de Varianza
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BONFIRE	Software para Análisis de Sholl (Laboratorio Bonnie Firestein)
BSA	Albúmina sérica bovina
CA (1-4)	Cuerno de Ammon – Áreas 1 a 4
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
Cav1.2	Canal de calcio tipo L
COMT	Catecol orto-metil transferasa
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico
CRMP-2	Proteína mediadora de la respuesta a Colapsina 2
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio Eagle Modificado - Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSU	Unidad de disco giratorio
DTT	Ditiotreitol
E18	Estado embrionario - 18 días
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
GABA	ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía
GSK3 β	Quinasa de glicógeno sintasa 3 β
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
IP3	Inositol trifosfato
Ki	Constante de disociación
LIMK	Quinasa con dominio LIM
LTD	Depresión a Largo Plazo
LTP	Potenciación a Largo Plazo

MAO	Mono amino oxidasa
MAP2A	Proteína asociada a microtúbulos 2A
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MEK	ERK quinasa
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NA	Noradrenalina
NET	Transportador de noradrenalina
NMDAr	Receptor para N-metil-D-aspartato
P3 - P21	Estado postnatal (3-21 días)
PAK	Proteína quinasa asociada a p21
PBS	Amortiguador salino fosfato
p-CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico, forma fosforilada (Ser 133)
PHEM	Amortiguador Pipes-Hepes-EGTA-MgCl ₂
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP2A	Protein fosfatasa 2
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
ROCK	Proteína quinasa asociada a Rho
ROI	Región de interés (soma)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SSH	Fosfatasa Slingshot
TBS	Amortiguador salino Tris
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etano-1,2-diamina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TrkB	Receptor tirosina quinasa B

Resumen

La neurotransmisión noradrenérgica está relacionada con procesos como el aprendizaje y la memoria. Se ha observado en el cuadro depresivo una disminución en la neurotransmisión de noradrenalina (NA), alteraciones de la arquitectura dendrítica y la disminución de los niveles de factores tróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). El hecho de que una variación de los niveles de NA pueda activar diferentes receptores adrenérgicos en el espacio sináptico, podría explicar en parte los mecanismos de plasticidad sináptica involucrados en cambios morfofuncionales, desde acciones sobre la complejidad dendrítica hasta la modulación sobre procesos complejos como aprendizaje y memoria. Esta noción es apoyada por el hecho de que los fármacos que incrementan los niveles de NA en el espacio sináptico revierten la atrofia dendrítica observada en modelos animales de depresión, y recuperan el deterioro cognitivo. En base a estos antecedentes hemos propuesto en esta Tesis que: **“La activación de receptores β -adrenérgicos promueve un aumento en la complejidad dendrítica en cultivos primarios de neuronas hipocampales”**. Se obtuvieron cultivos hipocampales de ratas en estado fetal de 18 días (E18), y se cultivaron durante 7 días *in vitro* (7 DIV). En estos cultivos se evaluó a través de Western Blot la respuesta frente a la estimulación de receptores β -adrenérgicos, midiendo la fosforilación de la Proteína de Unión al Elemento de Respuesta al AMP cíclico (CREB) frente a estímulos cortos (5-15 minutos) con noradrenalina (100 nM) en ausencia y presencia del β -antagonista propranolol (10 μ M). Junto con ello, se observó la distribución de CREB fosforilado a través de inmunocitoquímica luego de estímulos de 2 horas con los mismos fármacos. No fue posible a través de estas técnicas observar modificaciones en la intensidad de la señal o la distribución de p-CREB. Sin embargo, la adición de NA fue capaz de promover un incremento en el calcio citosólico, como se demostró a través del uso de sondas fluorescentes, y una reducción en la actividad neuronal evaluada por registros *whole-*

cell. Los cultivos a los 7 DIV presentan receptores β_2 -adrenérgicos, visualizados a través de Western Blot. Más aún, estudios de inmunocitoquímica muestran que el receptor β_2 presenta una distribución principalmente somatodendrítica. A través de la estimulación farmacológica de los cultivos durante 24 horas con NA 100 nM o clenbuterol 25 nM, en ausencia y presencia de propranolol 10 μ M, se estudió si la activación de receptores adrenérgicos modula la morfología dendrítica. Ésta fue evaluada a través de la medición de puntos de intersección (Análisis de Sholl), puntos de ramificación, largo y número de dendritas. La estimulación con clenbuterol 25 nM no produjo efecto sobre ninguno de estos parámetros, descartando la participación de los receptores β_2 -adrenérgicos en la arquitectura dendrítica. Tampoco produjo efectos en la morfología de las dendritas la administración por separado de noradrenalina o propranolol. Sin embargo, los cultivos estimulados con NA posterior a la incubación con propranolol mostraron una reducción en el número de intersecciones del análisis de Sholl en el rango de los 30-80 μ m en comparación con el control. Estos cambios están acompañados por un descenso en el largo total de las dendritas primarias, y en particular de las dendritas primarias mayores a 40 μ m, sin que el número de dendritas primarias por neurona se viera modificado. Un efecto similar se observó en las dendritas secundarias. Estos resultados sugieren que los cambios en el largo dendrítico observados probablemente no se asocian a la activación de receptores β_2 -adrenérgicos. Proponemos que la activación de receptores α - y β_1 -adrenérgicos regularían la morfología neuronal, probablemente con efectos opuestos, controlando el largo dendrítico de las dendritas primarias y secundarias de mayor tamaño.

El estudio realizado en esta Tesis por primera vez describe efectos de la activación de receptores adrenérgicos sobre la morfología neuronal, pudiendo explicar en parte los cambios morfológicos y mejoría cognitiva tras el tratamiento de fármacos que incrementan los niveles de NA en el espacio sináptico.

Effects of norepinephrine on dendritic complexity in hippocampal neuron cultures.

SUMMARY

Noradrenergic neurotransmission is related with processes as learning and memory. In depressive behavior, it has been observed a decrease in noradrenaline (NA) neurotransmission, alterations on dendritic arborization and a decrease in levels of trophic factors, such as brain derived neurotrophic factor (BDNF). The fact that different levels of NA can activate different adrenergic receptors at synaptic cleft, could explain part of synaptic neuroplasticity mechanisms involved in morphofunctional alterations, from actions on dendritic complexity to modulation of complex processes as learning and memory. This notion is supported by the fact that drugs that increase levels of NA at synaptic cleft reverse dendritic atrophy observed in animal models of depression, and recover cognitive impairment. Considering these antecedents, this Thesis proposed that: **“Activation of β -adrenergic receptors promotes an increase in dendritic complexity in primary cultures of hippocampal neurons”**. Hippocampal primary cultures were obtained from embryonic day 18 (E18) Sprague-Dawley rat fetuses, and cultured for 7 days *in vitro* (7DIV). In these cultures, changes in phosphorylation of cAMP-response element binding protein (CREB) were evaluated by Western Blot, in response to short stimulus (5-15 min) with 100 nM NA in absence and presence of 10 μ M propranolol, a β -adrenergic receptor antagonist. In addition, levels of phosphorylated CREB (p-CREB) were measured by immunocytochemistry, after stimulation of 2 hours with the same drugs. It was not possible to observe modifications on signal intensity of p-CREB through these techniques. However, the addition of NA promoted an increase in cytosolic calcium, measured by fluorescent probes for calcium, and a reduction of neuronal activity evaluated by whole-cell recording. The 7 DIV cultures showed β_2 -adrenergic receptors, which were visualized by

Western Blot. Moreover, immunocytochemistry studies showed that β_2 -adrenergic receptor was distributed in neurons mainly in the somato-dendritic compartment.

Through pharmacological stimulation of cultures for 24 hours with 100 nM NA or 25 nM clenbuterol, with 10 μ M propranolol absent or present, the activation of adrenergic receptors and their role in dendritic morphology has been measured. Morphology was evaluated through the measurement of intersection points (Sholl Analysis), branching points, and dendritic length and number. Stimulation with 25 nM clenbuterol did not have effect on any of these parameters, thus any role of β_2 -adrenergic receptors in dendritic architecture was discarded. Neither administration of NA nor propranolol alone produced effects on dendrite morphology. However, NA-stimulated cultures after incubation with propranolol showed a reduction in the number of intersections in Sholl analysis compared with controls, in the 30-80 μ m range. Those changes were accompanied by a reduction in primary dendrites greater than 40 μ m, without any modifications in primary dendrite number per neuron. A similar effect was shown in secondary dendrites. These results suggest that changes observed in dendritic length were probably not associated with the activation of β_2 -adrenergic receptors. We propose that the activation of α - and β_1 -adrenergic receptors may regulate neuron morphology, probably with opposite effects, controlling dendritic length of longer primary and secondary dendrites.

The study carried out in this Thesis describes for first time the effects of adrenergic receptors activation in dendrite morphology, and may explain in part the morphological changes and cognitive improvement after treatment of drugs that increase levels of NA in the synaptic cleft.

1.- INTRODUCCIÓN

La **noradrenalina (NA)** se describe como un neurotransmisor y neuromodulador del sistema nervioso central (Vogt 1954), capaz de influenciar múltiples respuestas y funciones de las neuronas. La NA es una catecolamina cuyo aminoácido precursor es la tirosina, compartiendo vías metabólicas con la dopamina y la adrenalina (Gelinas y Nguyen 2007). Su síntesis depende de la enzima dopamina- β -hidroxilasa, y su liberación ocurre a través de exocitosis dependiente de calcio, cuyos niveles son regulados por receptores presinápticos (Dixon y cols. 1979). La degradación de la NA ocurre principalmente a través de las enzimas catecol-o-metiltransferasa (COMT) y mono amino oxidasa (MAO) (Gelinas y Nguyen 2007).

En el cerebro de mamíferos, la NA es liberada por fibras que se originan en el *locus coeruleus* y que proyectan hacia estructuras como la corteza prefrontal y el **hipocampo** entre otras (Gelinas y Nguyen 2007). A través del **sistema noradrenérgico** se controlan diferentes procesos como el estado de alerta, la atención y el ciclo sueño-vigilia, y contribuye a los procesos de memoria y aprendizaje (Aston-Jones y cols. 2001).

1.1.- Receptores adrenérgicos

Las respuestas fisiológicas asociadas a la NA dependen de su unión con receptores específicos de membrana en las células efectoras. Los **receptores adrenérgicos** pertenecen a una gran familia de receptores que se unen a proteínas G para iniciar la señalización intracelular. De acuerdo a sus efectos, los receptores se han clasificado en receptores α - y β -adrenérgicos, y si bien las respuestas transduccionales gatilladas por cada receptor son conocidas, no se sabe tan bien cómo estas diversas vías se coordinan para generar una respuesta fisiológica apropiada (Gelinas y Nguyen 2007). A través de la activación de receptores adrenérgicos, se pueden modificar las propiedades de

neuronas hipocampales a través de la alteración de la excitabilidad celular o de modificaciones a nivel sináptico (Figura N° 1). Se ha evaluado el efecto de la activación de receptores adrenérgicos sobre la potenciación a largo plazo (LTP) o la depresión a largo plazo (LTD), modelos fuertemente asociados con neuroplasticidad, aprendizaje y memoria (Braunewell y Manahan-Vaughan 2001; Martin y Morris 2002).

En el hipocampo, los receptores adrenérgicos están expresados de forma heterogénea (Jones y cols. 1985; Pieribone y cols. 1994). Por ejemplo, se ha detectado el mRNA de los receptores $\alpha_{1A/D}$ en la región del *cuerno de Ammon* (CA1-CA4), en las células granulares del *giro dentado* y en el *hilus* (Pieribone y cols. 1994). Los receptores α_1 incrementan los niveles de calcio a través de la activación de Gq, generando un aumento de IP3 y liberación concomitante de calcio desde el retículo (Docherty 2010) (Figura N° 1). El receptor adrenérgico α_1 se localiza postsinápticamente en las neuronas CA1-CA3 del hipocampo (Scheiderer y cols. 2004) y estimula la actividad de la fosfolipasa C. Los receptores adrenérgicos $\alpha_{2(A)}$ a nivel del hipocampo están presentes en algunos astrocitos; a su vez, están localizados presinápticamente en terminales catecolaminérgicos y no catecolaminérgicos, y postsinápticamente en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales y granulares del hipocampo (Milner y cols. 1998). La activación de los receptores α_2 disminuye la actividad adenilato ciclasa (AC) o activa canales específicos de K^+ al acoplarse a proteínas Gi o Go (Nestler y cols. 1999).

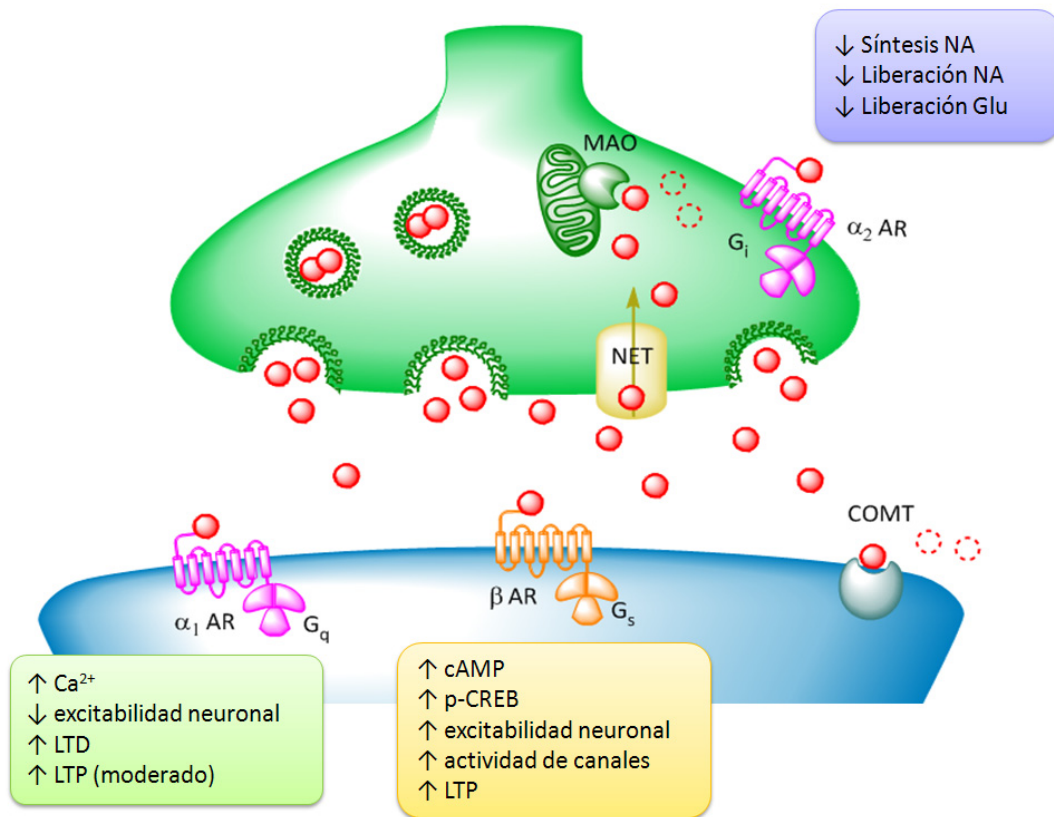


Figura Nº 1. Esquema de un terminal nervioso noradrenérgico. La noradrenalina (en rojo) es liberada a la hendidura sináptica, interactuando con los receptores α_1 , α_2 y β adrenérgicos. El receptor presináptico α_2 regula la síntesis de NA, mientras que los receptores postsinápticos median varias respuestas celulares. La acción de la NA se limita por su metabolización a través de las enzimas catecol-o-metiltransferasa (COMT) y mono amino oxidasa (MAO), o a través de la recaptación por el transportador de noradrenalina (NET). (Adaptado de (Gelinas y Nguyen 2007)).

Se ha descrito la presencia de receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos en neuronas piramidales, y en las subregiones del hipocampo en cerebro humano, siendo más abundante el mRNA asociado al receptor β_2 -adrenérgico (Reznikoff y cols. 1986; Gelinas y Nguyen 2007). Los receptores β -adrenérgicos activan proteínas Gs para estimular a la AC, llevando de esta forma a una respuesta fisiológica a través de la activación de la PKA y una activación del factor transcripcional CREB (Elemento de Respuesta de la proteína de unión de cAMP) a través de la fosforilación de éste. En cultivos hipocampales, la activación de receptores adrenérgicos induce la secreción del factor neurotrófico de cerebro, BDNF, y a una mayor fosforilación de CREB (Chen y cols. 2007). Además, la activación de los receptores β -adrenérgicos está acoplada a la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y aumenta el influjo de calcio a través de los receptores glutamatérgicos tipo tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Raman y cols. 1996).

1.2.- Inervación noradrenérgica y su relación con la función hipocampal.

Se ha descrito que la activación de los receptores α - y β -adrenérgicos actuaría en forma concertada, regulando la excitabilidad neuronal y modulando de esta forma la plasticidad sináptica en los procesos de LTP y LTD (Martin y Morris 2002). Por ejemplo, se ha reportado que la NA ejerce una acción facilitadora de la LTP en el hipocampo, participando en este efecto los receptores β -adrenérgicos presentes en el área CA1, cuya activación aumenta la excitabilidad celular (Winder y cols. 1999).

La activación de los receptores α_1 -adrenérgicos disminuye la excitabilidad de las neuronas en el *giro dentado* y en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (Harley 1991) y facilita la LTD en el hipocampo (Scheiderer y cols. 2004). De hecho, se ha observado que animales *knockout* para el receptor adrenérgico α_1 presentan déficit en la memoria visual-espacial, la cual está asociada a la función hipocampal (Spreng y cols. 2001).

1.3.- Disfunción de la neurotransmisión adrenérgica y función hipocampal.

Diversos trastornos cognitivos y afectivos se relacionan con una alteración en la neurotransmisión noradrenérgica, como Alzheimer, estrés postraumático, déficit atencional y depresión (Gelinas y Nguyen 2007; Del Campo y cols. 2011; Moret y Briley 2011). En sujetos con **depresión mayor** se observa una alteración en la atención, la memoria y el sueño (Blier 2001), sugiriendo que una disfunción en la neurotransmisión noradrenérgica puede ser la responsable, al menos en parte, de los síntomas observados en esta patología. Por otra parte, se reconoce al estrés como un factor precipitante de la depresión, debido a que el estrés crónico produce una reducción en los niveles de NA, lo que sugiere que una disfunción del sistema noradrenérgico central estaría relacionada a la patología depresiva (Prange 1964; Ordway y cols. 1994). Del mismo modo, dilucidar la acción de la NA a nivel del sistema nervioso central (SNC) es clave para comprender el mecanismo de acción de los antidepresivos (Cryan y cols. 2004).

En modelos animales, la presencia de agentes estresantes aplicados crónicamente logra reducir la complejidad dendrítica (Cook y Wellman 2004) y la densidad de espinas dendríticas en corteza prefrontal y en neuronas piramidales del hipocampo (Silva-Gomez y cols. 2003), afectando de esta forma la neurotransmisión glutamatérgica. Es factible que cambios en la neurotransmisión noradrenérgica asociados al estrés afecten directa o indirectamente la complejidad dendrítica y la densidad de espinas.

1.4.- Noradrenalina y su relación con BDNF

El desarrollo y mantención del **árbol dendrítico** es una etapa crucial para el establecimiento de los circuitos neuronales. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) media estos cambios en forma dependiente de la actividad neuronal, debido a que su expresión y liberación es dependiente de ésta (Horch 2004). La señalización de

BDNF a través de su receptor TrkB modula la complejidad dendrítica de las neuronas corticales y cerebelares (McAllister y cols. 1995; Schwartz y cols. 1997), y de las neuronas del hipocampo (Danzer y cols. 2002; Tolwani y cols. 2002). La estimulación por 24 horas con BDNF en neuronas hipocampales incrementa el largo dendrítico pero no la complejidad de éstas (Alonso y cols. 2004). El gen de BDNF es complejo y en la rata es controlado por 5 promotores, siendo controlado uno de ellos por el factor transcripcional CREB (Nakagawa y cols. 2002). Se ha mostrado que el tratamiento de cultivos neuronales con NA aumenta los niveles de BDNF y de p-CREB de forma dosis- y tiempo-dependiente (Chen y cols. 2007). Para explicar el efecto positivo de NA en los niveles de BDNF se ha propuesto que existe una transactivación entre el receptor β -adrenérgico y el receptor TrkB (Chen y cols. 2007). Por otra parte, se ha observado una disminución de los niveles del mRNA del BDNF frente a estrés crónico o por el tratamiento crónico con glucocorticoides (Smith y cols. 1995; Murakami y cols. 2005), quizás dando cuenta de la atrofia dendrítica observada en estas condiciones experimentales (Magarinos y cols. 1996; Vyas y cols. 2002). Más aún, nuestro laboratorio describió que la reducción del mRNA para BDNF era restituida por el tratamiento con el antidepresivo desipramina (Bravo y cols. 2009). Este antidepresivo promueve un aumento en los niveles de catecolaminas, especialmente la NA, en el espacio sináptico (Tanda y cols. 1996).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, es probable que la reducción de la arborización dendrítica observada por la administración de glucocorticoides y estrés en forma crónica se deba a una disfunción en la neurotransmisión noradrenérgica, quedando por establecer si la NA participa directa o indirectamente (a través del BDNF) sobre la morfología dendrítica. En relación con esto, la morfología neuronal podría modificarse es a través de la regulación de vías transduccionales relacionadas con la organización del citoesqueleto neuronal, de forma similar a lo que ocurre en la

sinaptogénesis durante el desarrollo y en el crecimiento y establecimiento de contactos sinápticos entre dendritas y axones (Schubert y Dotti 2007). Sin embargo, no existen antecedentes sobre el papel de la activación de receptores adrenérgicos en la morfología neuronal.

En resumen:

- La neurotransmisión noradrenérgica está involucrada en procesos como el aprendizaje y la memoria, en los cuales hay una importante participación del hipocampo.

- La activación de receptores adrenérgicos modula de forma diferencial la LTP y la LTD. La activación de los receptores β -adrenérgicos está asociada a una mayor excitabilidad neuronal; en contraste, la activación de receptores α -adrenérgicos promueve una menor excitabilidad neuronal.

- La disfunción noradrenérgica central está relacionada con la patología depresiva y con el mecanismo de acción de los antidepresivos.

- Cambios en la neurotransmisión serotoninérgica y noradrenérgica asociados al estrés y a la depresión modifican la complejidad dendrítica y la densidad de espinas.

- La neuroplasticidad y la morfología dendrítica en neuronas hipocampales se ve estrechamente ligada a la presencia de factores tróficos como BDNF.

De acuerdo a estas evidencias, se propone la siguiente Hipótesis:

2.- HIPÓTESIS

“La activación de receptores β -adrenérgicos promueve un aumento en la complejidad dendrítica en cultivos primarios de neuronas hipocampales”

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Determinar si la estimulación β -adrenérgica modifica la complejidad dendrítica y/o el largo y número de dendritas en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata.

3.2.- Objetivos específicos

- 1) Determinar la activación y presencia de receptores adrenérgicos en cultivos hipocampales
- 2) Determinar el efecto de agonistas adrenérgicos sobre la morfología dendrítica.

4.- METODOLOGIA

4.1.- Reactivos generales.

- **BioRAD Laboratories** (California, EE.UU.): azul de bromo fenol, persulfato de amonio, Bis, N,N'-metilen-bis-acrilamida, acrilamida.
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): Tris-HCl, KCl, MgCl₂, NaCl, SDS, etanol absoluto (p.a.), Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, ditiotreititol, glicerol, acrilamida, glicina, Tween 20, ácido bórico, glucosa.
- **Sigma-Aldrich** (Saint Louis, MO, E.E.U.U.): rojo Ponceau, HEPES, EGTA, Tris-HCl, Na₄P₂O₇, NaF, Na₃VO₄, Tritón X-100, Pipes, Paraformaldehído, Albúmina sérica bovina, EDTA.
- **Winkler** (Lampa, Chile): Tris-base.
- **Invitrogen** (Carlsbad, CA, E.E.U.U.): TEMED.
- **J.T Baker**: Glutaraldehído 25%
- **Roche** (Basilea, Suiza): Cóctel inhibidor de proteasas 25X.
- **Thermo Scientific** (Waltham, MA, E.E.U.U.): Estándar de peso molecular para geles de poliacrilamida.

4.2.- Animales

Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron ratas Sprague-Dawley en estado de desarrollo de 18 días de gestación (E18), obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los experimentos que se llevaron a cabo fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

4.3.- Cultivo primario de neuronas hipocampales

Éste se realizó de acuerdo a protocolos establecidos en este laboratorio (Fiedler y cols. 1994). Brevemente, se disecó el hipocampo desde los cerebros de ratas E18 y posteriormente el tejido se sometió a digestión enzimática con tripsina (Biological Industries, Israel) al 0,5% en solución Hepes 1 mM, NaCl 8 mM, KCl 5 mM, glucosa 5 mM, KH_2PO_4 0,44 μM . Luego de 15-25 minutos, la digestión se detuvo mediante la adición de 1 mL de medio de mantención DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U.) al que se agregó suero bovino fetal 10% (HyClone), GlutaMax™ 2 mM (Gibco, Invitrogen, E.E.U.U.), piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U.) y 50 ui/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco, Invitrogen, E.E.U.U.). Posteriormente el tejido se centrifugó por 235xg durante 4 minutos. El sedimento se resuspendió en DMEM, las células se disgregaron con una pipeta Pasteur y posteriormente se realizó una centrifugación rápida para separar las células dispersas del tejido no disgregado. Este proceso se repitió a lo menos 3 veces.

Para los ensayos de Western Blot el sobrenadante se depositó sobre placas Petri de 60 mm pretratadas con poli-D-lisina 0,1 mg/mL (Sigma-Aldrich, MO, E.E.U.U.) a una densidad de 1×10^6 células/placa. Para los ensayos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia las células se sembraron sobre placas de 35 mm con cubre objetos pretratados con poli-D-lisina 0,1 mg/mL, a una densidad de 80.000 células/placa. En ambos casos, las células se mantuvieron en medio DMEM por 2 horas, el que posteriormente se reemplazó por medio Neurobasal™ (Gibco, Invitrogen, E.E.U.U.), el cual favorece el crecimiento de neuronas en desarrollo (Brewer y cols. 1993), al que se agregó GlutaMax™ 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 50 ui/mL de penicilina-estreptomicina, junto con el suplemento libre de suero B27 1% (Gibco, Invitrogen, E.E.U.U.). Las células fueron mantenidas a 37°C en un incubador con 5% de CO_2 . Con el objetivo de inhibir el crecimiento glial, a las 48 h de cultivo se agregó una

mezcla de 5-fluoro-2-deoxiuridina/uridina (Sigma-Aldrich, MO, E.E.U.U.) a una concentración final de 4,4 μ M. Luego de 24 h el medio fue reemplazado por uno fresco en ausencia del inhibidor de la replicación del DNA.

4.4.- Estrategia farmacológica

Con la finalidad de determinar el efecto de la activación de los receptores adrenérgicos, las neuronas se sometieron al estímulo farmacológico una vez alcanzados los siete días de cultivo *in vitro* (7 DIV). Los fármacos se disolvieron en medio Neurobasal™ antes de ser añadidos a los cultivos. Las soluciones de fármacos fueron preparadas inmediatamente antes de su uso. El antagonista (propranolol, 10 μ M) se agregó 30 minutos previamente a la estimulación con los agonistas. La NA (100 nM) se agregó durante 5-15 minutos. Luego del estímulo, las células se lisaron y se obtuvieron los extractos de proteínas que fueron utilizadas en los estudios de Western Blot. Para realizar la evaluación de los fármacos sobre la morfología neuronal, éstos se agregaron durante 24 horas (NA 100 nM, Clenbuterol 25 nM). Posterior al tratamiento, las células fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas para realizar la inmunofluorescencia y análisis de morfología. Un resumen de la estrategia farmacológica se muestra en la Figura N° 2, mientras que un resumen con las afinidades de los fármacos está expuesto en la Tabla N° 1.

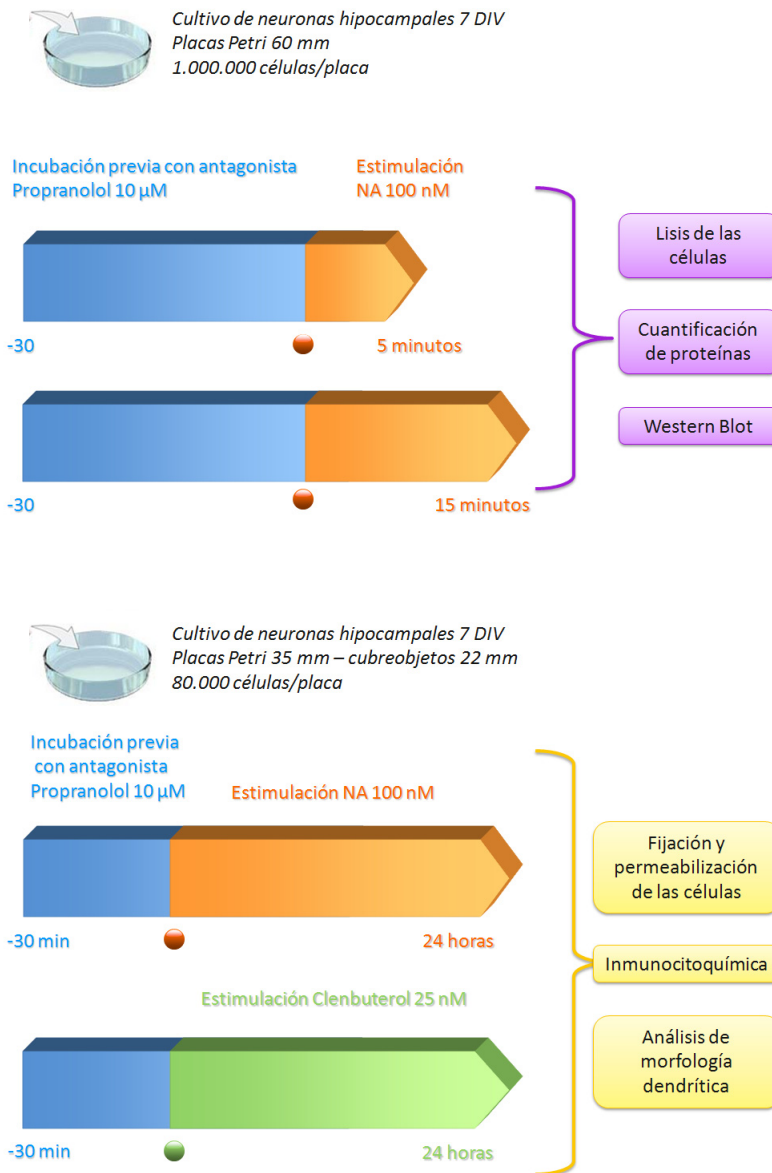


Figura N° 2: Esquema de estimulación farmacológica para cultivos primarios de neuronas hipocampales. Las soluciones de fármacos fueron preparadas inmediatamente antes de su uso. El antagonista (propranolol, 10 μ M) se agregó 30 minutos previamente a la estimulación con los agonistas. **(A)** La noradrenalina (100 nM) se agregó durante 5-15 minutos. Luego del estímulo, las células se lisaron y se obtuvieron los extractos de proteínas que fueron utilizadas en los estudios de Western Blot. **(B)** La noradrenalina (100 nM) o clenbuterol (25 nM) se agregaron durante 24 h. Posterior al estímulo, las células se lavaron, fijaron y permeabilizaron para realizar la inmunofluorescencia y análisis de morfología.

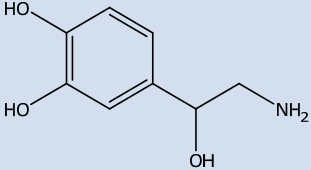
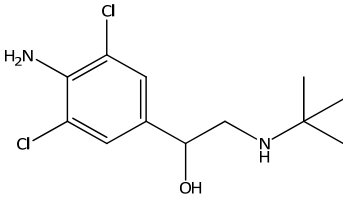
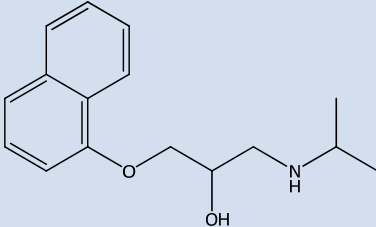
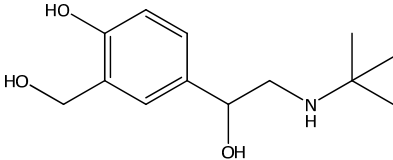
Fármaco	Características
<p>Noradrenalina (NA) (Sigma – Aldrich, A9512)</p> 	<p>Agonista adrenérgico $\beta_1 = \alpha_1 > \beta_2 = \alpha_2$ Concentración utilizada: 100 nM (Chen y cols. 2007)</p>
<p>Clenbuterol (Clen) (Sigma – Aldrich, C5423)</p> 	<p>Agonista adrenérgico $K_i = 1-3 \text{ nM}$ para receptores $\beta_2 > \beta_1$ (conformación de alta afinidad) (Morin y cols. 1997)</p> <p>Concentración utilizada: 25 nM</p>
<p>Propranolol (P) (Research Biochemicals, P-128)</p> 	<p>Antagonista inespecífico para receptores β_1 y β_2 adrenérgicos. $K_i = 1-5 \text{ nM}$ para receptores β_1 y β_2 (Cohen y cols. 1995)</p> <p>Concentración utilizada: 10 μM (Chen y cols. 2007)</p>
<p>Salbutamol (Recalcine, REA3-080-06)</p> 	<p>Agonista β_2-adrenérgico $K_i = 0,5 \text{ nM}$ para receptores β_2 (conformación de alta afinidad) $9,1 \mu\text{M}$ para receptores β_1 (Cohen y cols. 1995)</p> <p>Concentración utilizada: 25 nM</p>

Tabla Nº 1: Afinidad de los fármacos utilizados para la activación de receptores adrenérgicos. Se muestra el valor de K_i para los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos y la concentración utilizada en los experimentos.

4.5.- Obtención de extractos neuronales

Las placas de cultivo primario de neuronas hipocampales se lavaron con PBS una vez retirados del incubador. La homogeneización se realizó a 4°C agregando a cada placa 150 µL de amortiguador de lisis por placa (50 mM Tris HCl pH = 7, NaCl 150 mM, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,5 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, NaF 0,02 mM, Na₄P₂O₇ 0,025 mM, Tritón X-100 1,0%) al que se agregó una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, E64, Pefabloc, aprotinina, leupeptina, α₂-macroglobulina) (Roche, Basilea, Suiza). El homogenato se sometió a ultrasonido (Transsonic Digital D-78224 SinGen/HTW, ELMA, Alemania) a 4°C durante 5 min y luego se centrifugó a 21380 g durante 15 min a 4°C, descartando el precipitado. En una fracción del sobrenadante se realizó la cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico (Sapan y cols. 1999) en microplacas (Thermo Scientific), utilizando BSA como estándar para la curva de calibración y midiendo la absorbancia a 560 nm. El resto del sobrenadante se desnaturalizó con un amortiguador de carga en una relación 4:1 (Tris 250 mM pH 6,8, SDS 5%, glicerol 6,7% v/v, DTT 0,512 mg/mL, azul de bromo fenol 13,33 mg/mL). La solución resultante se hirvió durante 5 minutos en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc, EE.UU.) y finalmente se guardó a -80 °C para su análisis posterior mediante Western Blot.

4.6.- Electroforesis y Western Blot

Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida-SDS (Gel concentrador: 5% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1%, Tris 125 mM a pH 6,8. Gel separador: 8-15% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1% y Tris 375 mM a pH 8,8). La electroforesis se realizó durante 3 horas a 100 V en una cámara Mini Protean III (BioRad Inc, E.E.U.U.) utilizando un amortiguador de corrida Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, glicina 19 mM. Luego las proteínas de la muestra se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de poro 0,2 µm o PVDF (BioRad Inc. E.E.U.U.) en una celda

de transferencia mini Trans-Blot (BioRad Inc. E.E.U.U.). Como amortiguador de transferencia se utilizó glicina 19 mM, Tris 2,5 mM, metanol 20%. La transferencia se realizó durante 1,5 horas a 250 mA en una fuente con hielo (aproximadamente a 4°C). Como control de transferencia, las proteínas presentes en la membrana se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 0,2%. Posteriormente la membrana se lavó exhaustivamente con PBS o PBS-Tween 20 dependiendo de las proteínas a evaluar, y se mantuvo en solución de bloqueo durante 60 minutos. Para la medición de cada proteína de interés se utilizaron anticuerpos específicos, como se muestra en la Tabla N° 1.

Al día siguiente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con una solución de PBS o TBS de acuerdo al anticuerpo utilizado (Ver Tabla 2), con agitación a temperatura ambiente. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante dos horas con agitación a temperatura ambiente. Nuevamente se sometió la membrana a tres lavados de 5 minutos cada uno y luego se incubó con el reactivo de quimioluminiscencia durante 1 minuto (PerkinElmer, Massachusetts, E.E.U.U). La membrana se puso en contacto con un film fotográfico BioMax (Kodak) durante distintos tiempos (entre 30 segundos y 30 minutos). El film se colocó en una solución de revelado durante 1 min y luego en una solución de fijado durante 5 min (AGFA-Gevaert, Mortsel, Bélgica). Las bandas obtenidas en los films se analizaron mediante densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel, Automated Digitizing System Versión 5,0 para Windows usando un escáner ColorPage-HR6X (Genius).

Tabla N° 2. Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot.

Anticuerpo/Empresa	Huésped	Concentración	Condiciones
Receptor β_2 adrenérgico <i>Santa Cruz</i>	Conejo	1:100	Bloqueo: leche 3%, PBS-Tween 0,1% Anticuerpo primario: leche 1%, PBS-Tween 0,1% Lavados: PBS x2, PBS-Tween 0,1% x1 Exposición: 1-5 minutos
CREB-P (Ser 133) <i>Upstate</i>	Conejo	1:1000	Bloqueo: leche 3%, PBS Anticuerpo primario: leche 3%, PBS Lavados: H ₂ O destilada x2, PBS x1 Exposición: 30 segundos - 3 minutos
CREB total <i>Cell Signaling</i>	Conejo	1:1000	Bloqueo: leche 3%, PBS Anticuerpo primario: leche 3%, PBS Lavados: PBS Exposición: 3-10 minutos
Beta-actina (Control de carga) <i>Santa Cruz</i>	Conejo	1:10000	Bloqueo: leche 3%, PBS-Tween 0,1% Anticuerpo primario: leche 3%, PBS-Tween 0,1% Lavados: PBS-Tween 0,1% Exposición: 5 segundos – 1 minuto
Anti IgG de conejo conjugado con HRP (Anticuerpo secundario) <i>Thermo Scientific</i>	Cabra	1:5000	BSA 5%, TBS-Tween 0,1% (Cofilina y Cofilina-P) Leche 3%, PBS-Tween 0,1% (CREB-P, CREB, receptor β_2)

4.7.- Inmunocitoquímica.

Los cultivos de neuronas 7 DIV se fijaron y permeabilizaron simultáneamente (Witte y cols. 2008) en medio PHEM (Pipes 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 5 mM y MgCl 1 mM) con glutaraldehído al 0,25%, paraformaldehído al 3,7%, sacarosa al 3,7% y Tritón X-100 al 0,1%. Para apagar la autofluorescencia de las células, se agregó NH₄Cl 50 mM en PBS durante 5 minutos. Las neuronas adheridas a los cubreobjetos se incubaron posteriormente por 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (suero fetal de bovino 2%, seroalbúmina bovina 2% (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U.) y gelatina de pescado [Sigma-Aldrich, St Louis, Mo. E.E.U.U.] 0,2%) preparada en PBS. El anticuerpo primario se agregó en solución de bloqueo al 10% y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cubreobjetos se sometieron a 3 lavados de 5 minutos antes de que se agregara el anticuerpo secundario respectivo (Molecular Probes, Oregon, E.E.U.U.) en la misma solución de bloqueo al 10%, y se mantuvo por 3 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. En el caso que se requirió de la detección de otra proteína en las neuronas, se agregó posterior a este paso el otro anticuerpo primario obtenido en una especie diferente al usado. Las condiciones de incubación con el anticuerpo y lavados fueron similares. Mediante este protocolo se determinó la presencia del receptor β_2 adrenérgico y se observó el cambio en el estado de fosforilación de CREB en neuronas que fueron marcadas para la presencia de MAP2A. Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla N° 3. Del mismo modo, las diversas combinaciones de anticuerpos y tinciones están descritas en la tabla N° 4.

Para la observación del citoesqueleto de actina se agregó faloidina-rodamina (1:500; Molecular Probes, Oregon, E.E.U.U.) por 30 minutos. Posteriormente se incubó por 5 minutos con la tinción nuclear Hoechst (Molecular Probes, Oregon, E.E.U.U.) y finalmente las células se cubrieron con medio de montaje para fluorescencia (Dako, Dinamarca).

Tabla N° 3. Listado de anticuerpos utilizados para Inmunocitoquímica

Anticuerpo	Empresa	Huésped	Concentración
Receptor beta-2 adrenérgico	<i>Santa Cruz</i>	Conejo	1:50
CREB-P (Ser 133)	<i>Upstate</i>	Conejo	1:100
MAP2A	<i>Sigma Aldrich</i>	Ratón	1:1000
Alexa 488 IgG anti-ratón	<i>Molecular Probes</i>	Cabra	1:250
Alexa 568 IgG anti-ratón	<i>Molecular Probes</i>	Cabra	1:250
Alexa 568 IgG anti-conejo	<i>Molecular Probes</i>	Cabra	1:250

Tabla N° 4. Esquema de experimentos de colocalización.

Experimento	Primer anticuerpo	Segundo anticuerpo
1.- Para receptor β_2	MAP2A Alexa 488 IgG anti-ratón	Receptor β_2 Alexa 568 IgG anti-conejo
2.- Para CREB-P	MAP2A Alexa 488 IgG anti-ratón	CREB-P Alexa 568 IgG anti-conejo
2.- Para estudio morfología dendrítica	MAP2A Alexa 568 IgG anti-ratón	Faloidina-rodamina

*En todos los casos se agregó la tinción Hoechst (azul) para identificar el núcleo

4.8.- Medición de calcio citosólico

Las neuronas hipocampales (10 – 12 DIV) fueron incubadas con la sonda fluorescente Fluo-4 AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 5 μ M por 30 m a 37 °C protegidas de la luz. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos por vez con Solución Externa Normal (NaCl 150 mM; KCl 5,4 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM; Glucosa 10 mM; HEPES 10 mM; Sacarosa 50 mM). Las células fueron incubadas por 24 h y posteriormente se registraron señales de los transitorios de Ca²⁺ citosólico, o bien inducidos por la perfusión de NA (5 segundos). Para las mediciones y registros se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido Nikon TE-2000-U (Nikon, Tokyo, Japón), mientras que los cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico se registraron con una cámara EM-CCD ixon+ de 16 bit (Andor, Belfast, Irlanda del norte) y se visualizan en el software Imaging Workbench 6.0 (INDEC BioSystems, Santa Clara, CA, USA).

4.9.- Evaluación de la actividad sináptica espontánea

Para ello se utilizó la técnica electrofisiológica de *Patch Clamp* en la modalidad de célula única con la configuración de célula completa (*whole cell*). Las neuronas hipocampales 12 DIV se transfirieron a un pocillo donde se les agregó Solución Externa Normal (NaCl 150 mM; KCl 5,4 mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM; Glucosa 10 mM; HEPES 10 mM; Sacarosa 50 mM), de modo que la concentración de iones fuese similar a la del líquido extracelular, y con una osmolaridad de 300 mOsM. Los registros de actividad sináptica fueron realizados mediante un amplificador Axonpatch 200B (Axon-Instruments, Inc., Burlingame, CA) y un microscopio invertido (Nikon, Eclipse, TE 2000-S, Japón). El voltaje de la célula se fijó en -60 mV, registrándose con una velocidad de muestreo de 50 μ s.

Para la medición de la actividad sináptica, los cambios de corriente en las neuronas, previamente incubadas con las condiciones experimentales establecidas se detectaron

en un intervalo de 2 minutos, mientras que el registro fue filtrado a 5 KHz, y la señal digitalizada con un computador conectado al sistema de registro mediante una tarjeta de adquisición (Digidata 1440A, Axon Instruments) y el programa computacional pClamp 10 (Axon Instruments). Las pipetas de *patch* se elaboraron con capilares de borosilicato (World Precision Instrumentos, FL) en un estirador horizontal de pipetas (Sutter Instruments, USA). La resistencia promedio de las pipetas de *patch* fue entre 2 a 5 M Ω , mientras que la solución interna se preparó de la siguiente forma: KCl 120 mM; MgCl₂ 2 mM; ATP/Na₂ 2 mM; BAPTA 10 mM; GTP 0,5 mM; HEPES 10 mM; pH 7.4. Los registros fueron realizados por un período de tiempo de 2 minutos. Posteriormente, los datos fueron transferidos y analizados mediante el programa MiniAnalysis 5.0 (Synptosoft, USA), en donde se realizó la cuantificación de los eventos sinápticos, representada por la frecuencia.

4.10.- Cuantificación de largo y número de dendritas y análisis de Sholl.

Para el estudio de imagen se utilizó un microscopio confocal de unidad de disco giratorio (DSU) (Olympus) y las fotografías se tomaron con una magnificación de 40X. Los criterios utilizados para la selección de neuronas a fotografiar fueron que éstas: **(1)** presentaran una morfología acorde a una neurona viva saludable (adhesión, ausencia de cuerpos apoptóticos, etc.). **(2)** presentaran neuritas definidas y **(3)** no presentaran contacto con otras células, de modo que no hubiera interferencia en los análisis.

Una vez que se obtuvieron las fotografías, se procesaron en el programa ImageJ (NIH, rsb.info.nih.gov/ij) para obtener la imagen fusionada de las tres señales. A través de la tinción nuclear (Hoechst, señal azul) se pudo verificar que las señales correspondían a una sola neurona, mientras que la tinción de los filamentos de actina (faloidina-rodamina, señal roja) permitió una mejor aproximación al largo verdadero de las dendritas a través de los filamentos de actina, al visualizar el cono de crecimiento

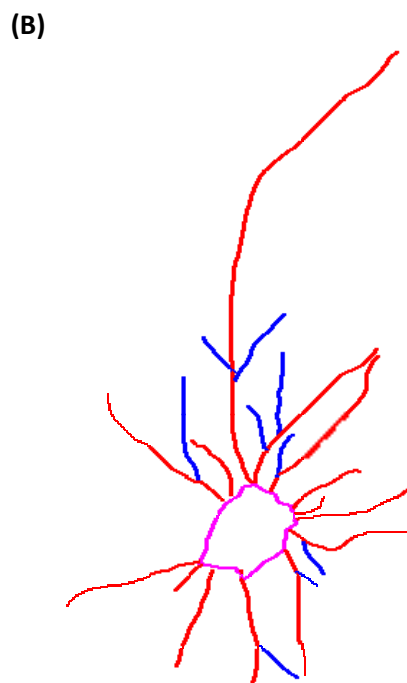
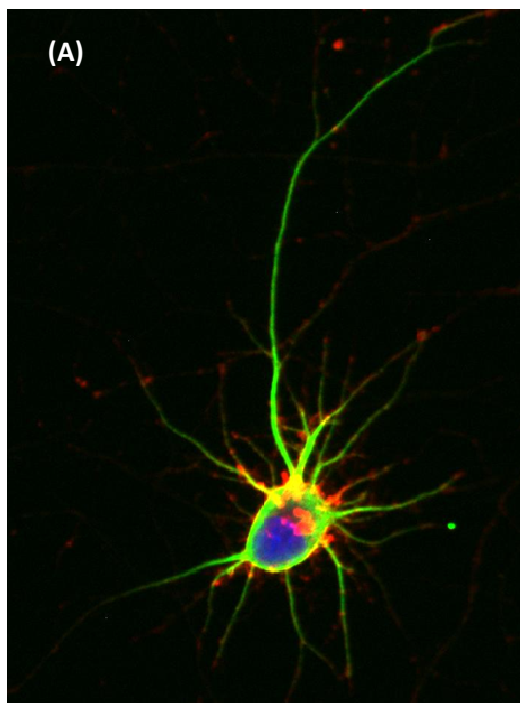
dendrítico. Para reconocer las dendritas fue utilizado el marcador dendrítico MAP2A (verde) Ver Figura N° 3 y Tabla N° 4.

La cuantificación del largo dendrítico se realizó a través del programa NeuronJ. Para hacer un análisis “doble ciego”, se tomaron las siguientes precauciones: **(1)** las imágenes se renombraron aleatoriamente a través del programa *BlindTreatment.jar* (Popko y cols. 2009), el que fue amablemente proporcionado por la Dra. Lorene Lanier (Universidad de Minnesota, E.E.U.U.) y **(2)** La preparación de las imágenes y su cuantificación en NeuronJ se realizaron por personas distintas. Para ello se contó con la valiosa cooperación de Paulina Rojas, candidata al Doctorado en Farmacología de la Universidad de Chile.

Una vez que se obtuvo el trazado de las dendritas a través de NeuronJ se pudo estudiar largo y número de dendritas, a través de la exportación de los datos desde NeuronJ a Microsoft Excel. Además, a partir de estos datos fue posible generar un análisis de Sholl (Sholl 1953), con la gran ventaja de que el trazado de las neuronas fue mucho más fácil de procesar por Sholl como un “esqueleto” de la imagen original que a través de la edición de imágenes realizada convencionalmente. Con este fin fue utilizado el programa Bonfire 1.0 (Bonnie Firestein Lab. Sholl Analysis Software, Universidad de Rutgers, E.E.U.U.), desarrollado para el software MATLAB 7.0 (MathWorks) (Langhammer y cols. 2010). Se requirió además del uso del programa NeuronStudio 0.9.92 (CNIC, Mount Sinai School of Medicine, E.E.U.U.) para la definición precisa de puntos de ramificación y puntos de término. Una vez finalizado el procedimiento, se entregaron los resultados tabulados en hojas de cálculo de Microsoft Excel para su posterior análisis gráfico. Una explicación gráfica de la forma en que los resultados son entregados se puede observar en las Figuras N° 3, 4 y 5.

4.11.- Análisis estadístico.

Cada experimento se realizó a lo menos tres veces, cada una de ellas en triplicado. Los datos según el número de condiciones fueron analizados mediante el test de Student de dos colas o por el test de ANOVA de una vía junto con el post-test de Bonferroni. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, E.E.U.U.).



(C)

Image	Tracing	Cluster	Type	Length [μm]
340265196	N19	Cluster 09	Primary	8,328
340265196	N22	Default	Primary	8,507
340265196	N23	Default	Primary	16,152
340265196	N18	Cluster 08	Primary	17,757
340265196	N20	Cluster 10	Primary	22,925
340265196	N13	Cluster 06	Primary	26,121
340265196	N11	Cluster 05	Primary	28,484
340265196	N17	Default	Primary	28,677
340265196	N15	Cluster 07	Primary	28,938
340265196	N21	Default	Primary	32,074
340265196	N1	Cluster 01	Primary	36,8
340265196	N9	Cluster 04	Primary	40,439
340265196	N3	Cluster 02	Primary	41,242
340265196	N6	Cluster 03	Primary	111,144
340265196	N12	Cluster 05	Secondary	5,451
340265196	N16	Cluster 07	Secondary	8,632
340265196	N8	Cluster 03	Secondary	10,21
340265196	N10	Cluster 04	Secondary	10,31
340265196	N14	Cluster 06	Secondary	10,86
340265196	N5	Cluster 02	Secondary	10,874
340265196	N7	Cluster 03	Secondary	18,373
340265196	N4	Cluster 02	Secondary	18,555
340265196	N2	Cluster 01	Secondary	23,512
340265196	N24	Default	Soma	66,949

(D)

	Largo dendrítico total	# dendritas	Largo dendrítico promedio
Primarias < 40	254,763	11	23,160
Primarias > 40	192,825	3	64,275
Total primarias	447,588	14	31,971
Secundarias < 20	93,265	8	11,658
Secundarias > 20	23,512	1	23,512
Total secundarias	116,777	9	12,975
Terciarias	0	0	0,000
Total	564,365	23	24,538

Figura N° 3: Metodología para cuantificación de largo y número de dendritas de neuronas hipocampales. (A) Las neuronas se fotografiaron en un microscopio confocal DSU y los canales se integraron en el programa ImageJ. (Rojo: faloidina-rodamina, verde: MAP2A, azul: Hoechst). (B) A través del programa NeuronJ se trazaron manualmente las dendritas de cada neurona, diferenciándolas en primarias (rojo), secundarias (azul) y terciarias (amarillo). (C) Los datos de largo dendrítico (a la izquierda) se exportaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2007 (D) Posteriormente se calcularon el largo dendrítico total, el número de dendritas y el largo dendrítico promedio. La imagen presentada en este esquema pertenece al grupo control.

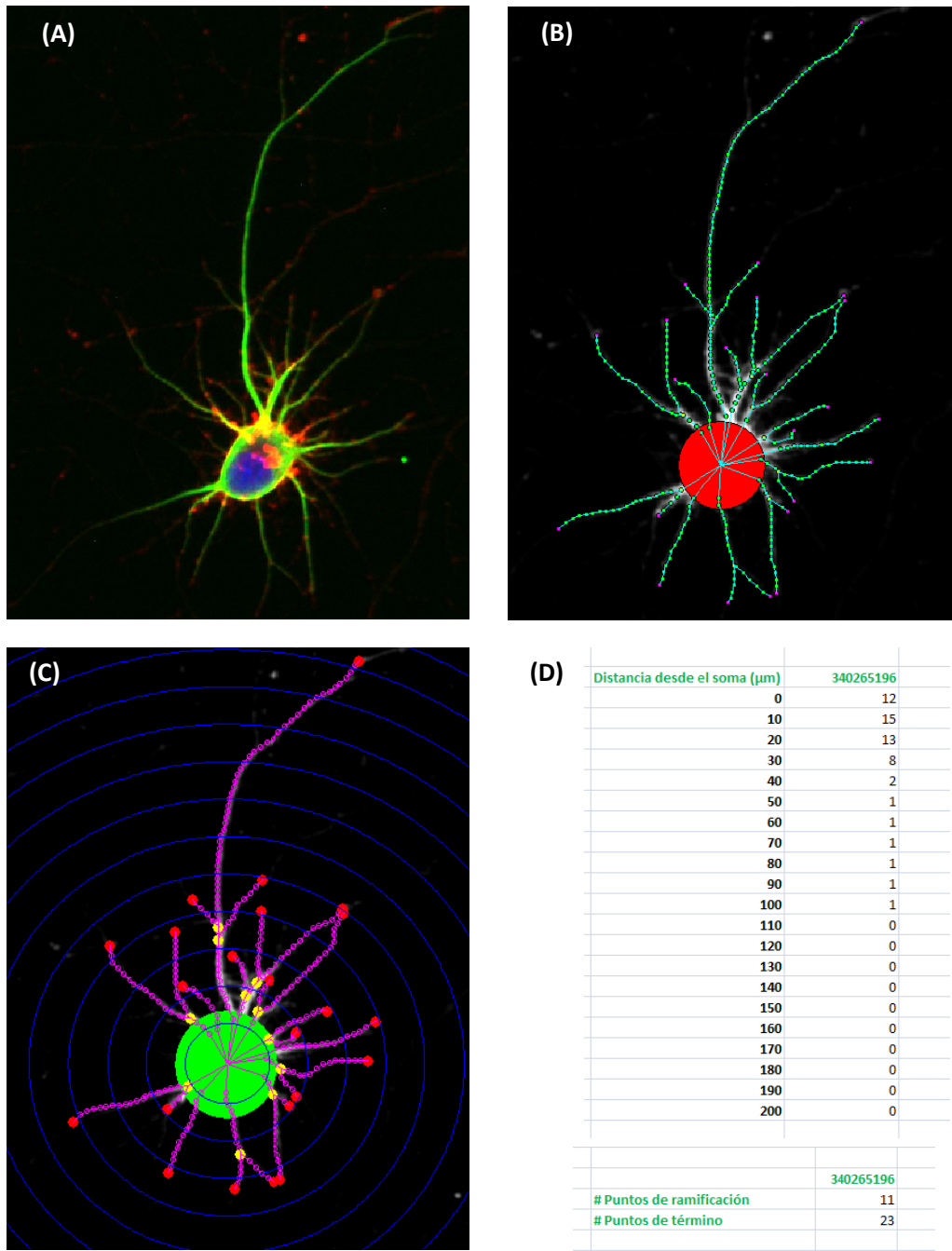


Figura N° 4: Metodología para análisis de Sholl de neuronas hipocámpales.(A) Las neuronas se fotografiaron en un microscopio confocal DSU y los canales se integraron en el programa ImageJ. (Rojo: faloidina-rodamina, verde: MAP2A, azul: Hoechst). Posteriormente se realizó el trazado de las dendritas en el programa NeuronJ (B) A través del programa NeuronStudio se revisaron los trazos realizados para las neuronas para establecer la presencia de puntos de ramificación (*branching points*) y puntos de término. (C) Utilizando el programa Bonfire en MATLAB 7.0, se analizó la información proveniente del programa NeuronStudio y se realizó el análisis de Sholl. (D) El número de intersecciones por círculo se exportó finalmente a una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2007, junto con el número de puntos de ramificación y término. La imagen presentada en este esquema pertenece al grupo control.

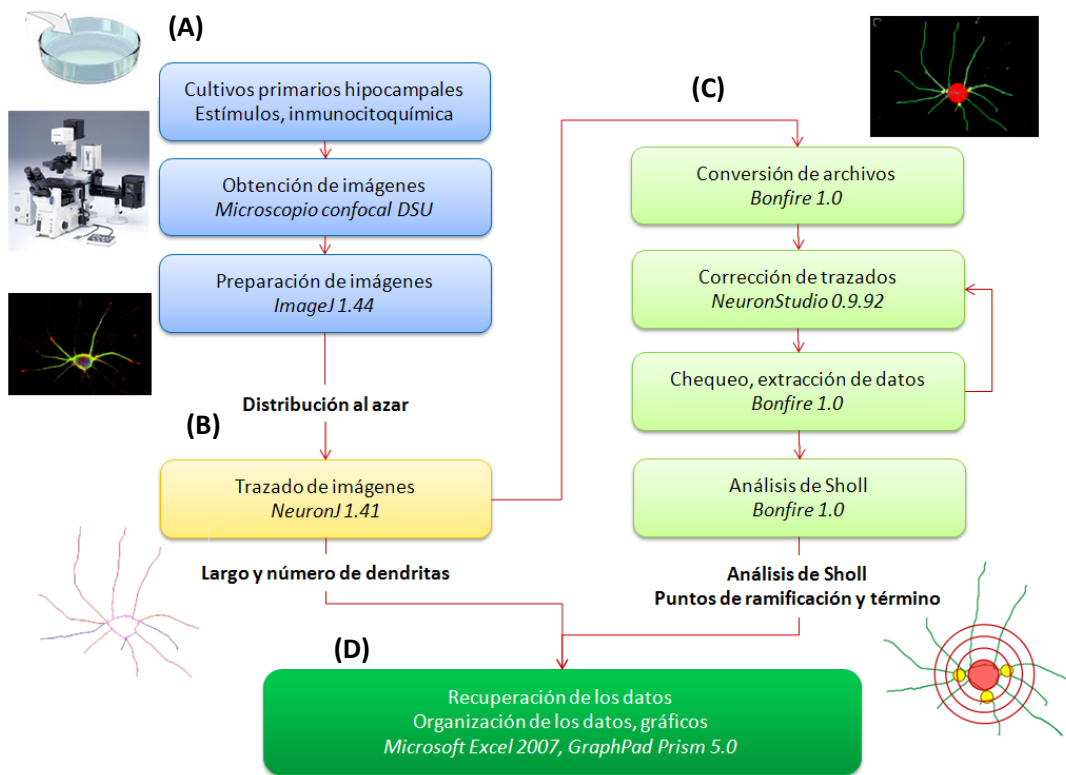


Figura N° 5. Procesamiento de imágenes para la cuantificación dendrítica y análisis de Sholl. (A) Las células se visualizaron en un microscopio confocal DSU (Olympus), y se capturaron las señales en distintos canales dependiendo del fluoróforo utilizado. La señal de MAP2A, con la que se pudo observar la arborización dendrítica (fluorescencia verde); la señal de faloidina-rodamina, que permitió observar el citoesqueleto de actina y los conos de crecimiento dendrítico (fluorescencia roja), y la tinción nuclear Hoechst (fluorescencia azul). A través del programa ImageJ se formó la imagen fusionada de las tres señales para cada neurona. Las imágenes fusionadas, transformadas en escala de grises, se renombraron aleatoriamente antes de ser analizadas. (B) A través del programa NeuronJ se trazaron las dendritas desde el soma de cada neurona, diferenciándolas en primarias, secundarias y terciarias. A partir de la organización de estos datos se estudió el largo y número de dendritas por neurona. (C) El archivo del trazado para cada neurona (extensión .ndf) fue reconvertido (extensión .swc) a través del programa Bonfire para poder determinar puntos de ramificación y puntos de término en el programa NeuronStudio. El programa Bonfire permitió la posterior revisión y exportación de los datos obtenidos. (D) A través del programa Microsoft Excel 2007 se organizaron los valores obtenidos en tablas de datos, que se graficaron y analizaron estadísticamente en el programa GraphPad Prism 5.0

5.- RESULTADOS

La finalidad de esta Tesis fue determinar si la presencia de agonistas β -adrenérgicos promovía cambios en la morfología neuronal. Por ello se evaluaron principalmente los cultivos neuronales a 7 DIV, periodo en que las neuronas aún no han alcanzado una completa madurez pero sí han logrado diferenciar su axón, siendo posible observar cambios en la morfología dendrítica de forma diferencial asociados a la activación de receptores β -adrenérgicos.

5.1.- Activación farmacológica de los receptores adrenérgicos

Se ha reportado en la literatura una relación entre la estimulación de receptores adrenérgicos en cultivo primario de hipocampo y la activación de varias vías transduccionales relacionadas con la sobrevivencia neuronal, como la vías de las MAP quinasas y la vía PI3K-Akt, donde ambas promueven la fosforilación de la proteína CREB en Ser¹³³ (Chen y cols. 2007; Juric y cols. 2008).

Con la finalidad de determinar en el cultivo la funcionalidad de los receptores adrenérgicos, se evaluó el efecto de la estimulación con noradrenalina sobre la cuantía de fosforilación de CREB mediante la técnica de Western Blot, en función de la madurez de los cultivos. En la Figura N° 6 se muestra que la estimulación no produjo variaciones en los niveles de fosforilación del CREB en Ser¹³³ (p-CREB) en los tiempos evaluados (5-15 min). La adición del antagonista propranolol 10 μ M tampoco produjo efecto sobre el nivel de fosforilación basal de CREB.

Estos resultados negativos pueden indicar que el cultivo no es capaz de responder a los estímulos utilizados. Sin embargo, era factible que la respuesta al estímulo no fuese homogénea, teniendo la consideración de que en el cultivo primario de hipocampo se observan diferentes poblaciones de neuronas (Banker y Cowan 1979). Por ello, se

determinaron cambios en la intensidad de la marca de p-CREB en el núcleo frente a la adición de noradrenalina o propranolol en un rango de tiempo acorde con lo descrito en la literatura (Chen y cols. 2007). La Figura N° 7 muestra que la mayoría de las células fueron positivas para la inmunotinción contra p-CREB y que esta proteína está preferencialmente asociada al núcleo en todas las condiciones experimentales. Tampoco fue posible establecer a través de esta técnica variaciones significativas en la intensidad de la inmunoreactividad luego de los estímulos con los distintos fármacos, aun cuando luego de 2 horas de exposición a la noradrenalina se observa una disminución en la intensidad de la señal. También es factible que la temporalidad escogida no fuese la apropiada.

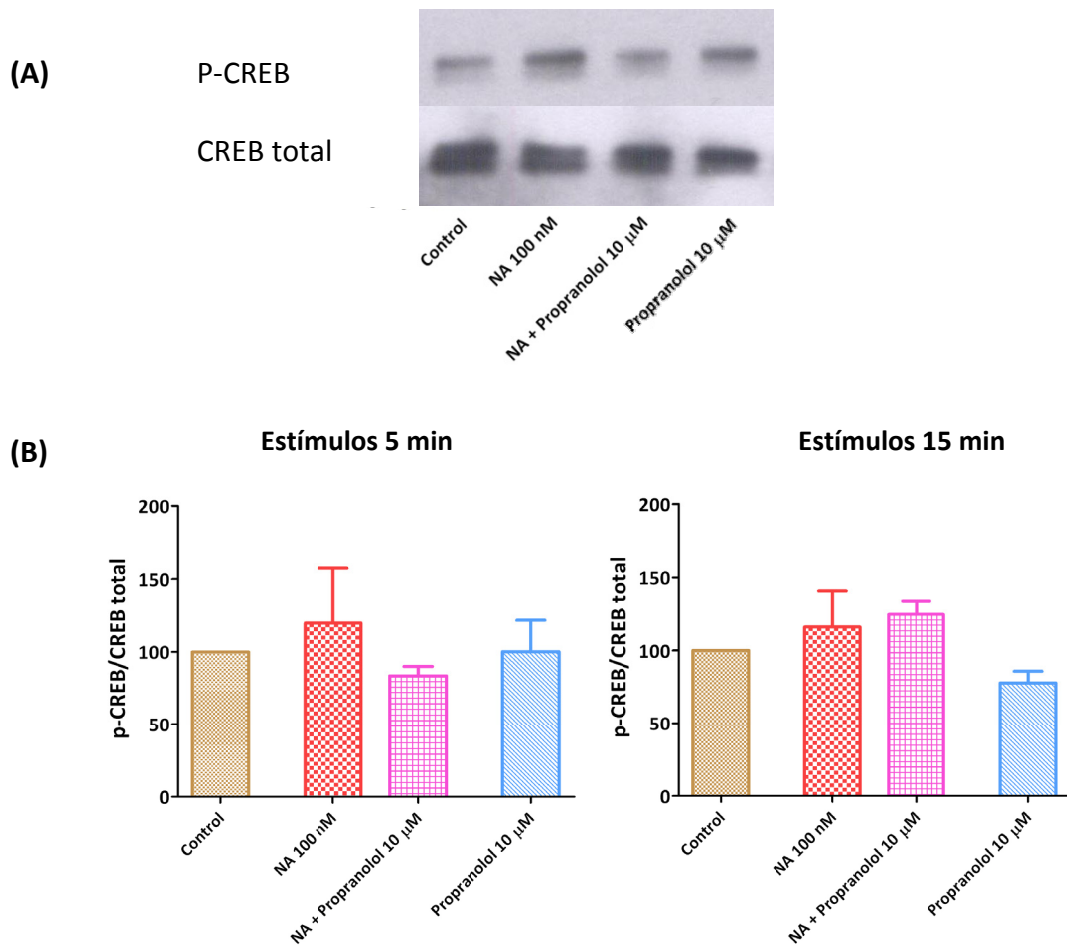


Figura N° 6: Niveles de fosforilación de CREB en cultivos mediante la técnica de Western Blot. Cultivos hipocámpales de 7 DIV fueron estimulados con noradrenalina (100 nM) y posteriormente se obtuvieron extractos de proteínas totales. El antagonista propranolol (10 μ M) fue agregado 30 min previo al agonista. (A) Muestra un inmunoblot representativo de las muestras. (B) Cuantificación de los niveles de p-CREB respecto a los de CREB total, frente a estímulos de agonistas por 5 y 15 minutos respectivamente. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la media, correspondientes a 3 cultivos independientes. Los datos fueron analizados mediante análisis de ANOVA no paramétrico.

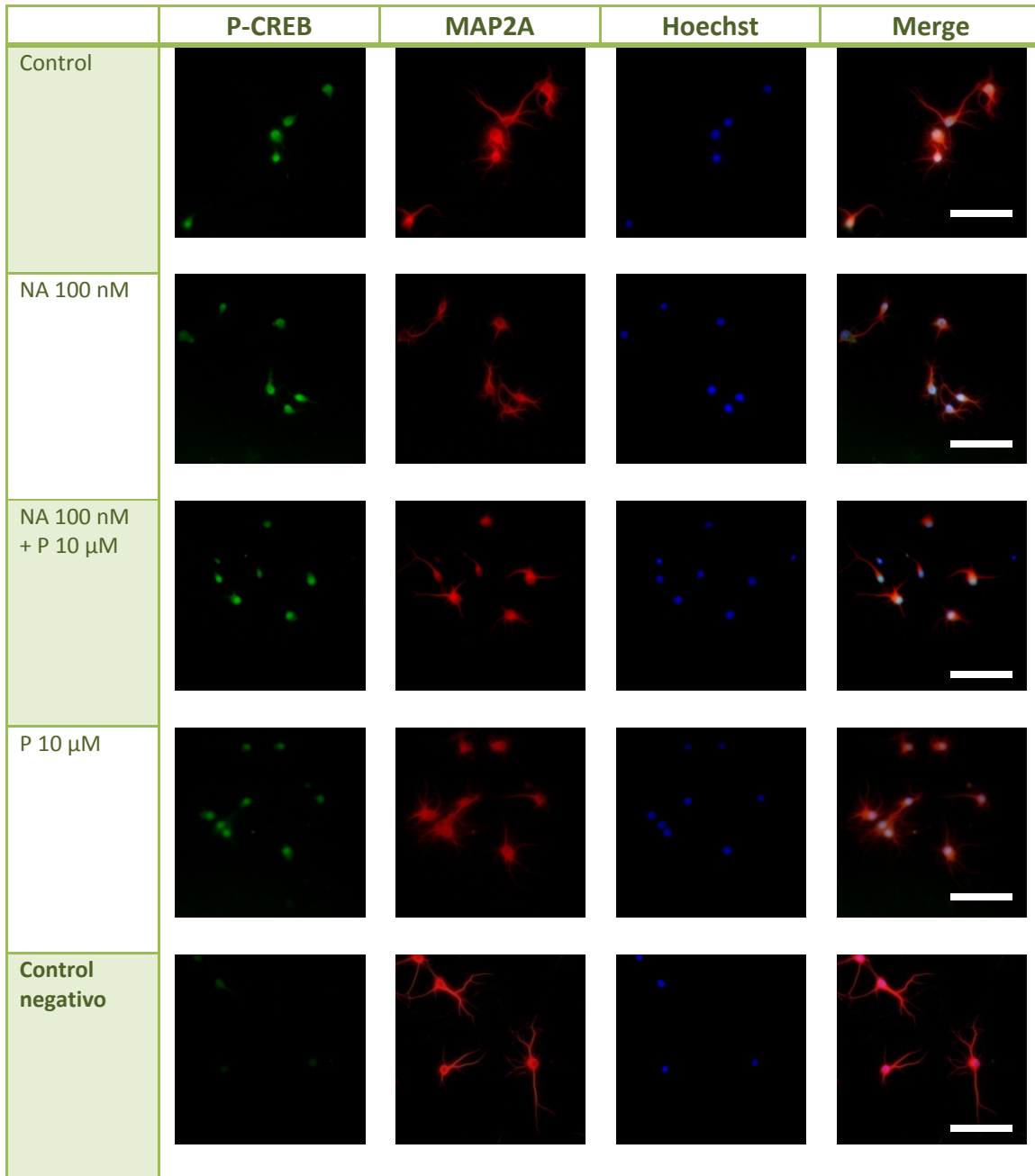


Figura N° 7: Inmunocitoquímica para p-CREB en cultivos 7 DIV. Las neuronas fueron cultivadas durante 7 días y estimuladas con Noradrenalina 100 nM por 2 horas. El antagonista propranolol fue agregado 30 min previo al agonista. Las células fueron posteriormente fijadas e inmunoteñidas con MAP2A (marcador dendrítico, en rojo) y con anticuerpos para p-CREB (verde). Imágenes obtenidas en microscopio de epifluorescencia, zoom 40X. Las imágenes son fusionadas a través del programa ImageJ. La barra representa 100 μm. Experimento realizado en triplicado.

En colaboración con el Prof. Jorge Fuentealba, de la Universidad de Concepción, se determinó que la estimulación con NA 10 nM promovía señales transitorias de calcio en cultivos neuronales 10 DIV (Figura N° 8). La señal de calcio generada por la estimulación es una señal algo más lenta y superior en magnitud a las señales espontáneas de Ca^{2+} . Aunque este experimento no fue realizado a los 7 DIV, el resultado fue muy valioso puesto que mostró que la activación de los receptores adrenérgicos se relaciona con un aumento del calcio citosólico, aunque no fue posible determinar a qué receptor adrenérgico correspondería esta activación. De forma complementaria, la Figura N° 9 muestra una disminución en la excitación neuronal frente a la estimulación con noradrenalina 1 μ M en neuronas hipocampales 12 DIV. En conjunto, estos datos de electrofisiología nos muestran una reducción de la actividad neuronal promovida por NA que puede ser reflejo de cambios en la actividad excitadora (liberación de glutamato) o un aumento del tono inhibitorio (liberación de GABA).

En resumen, podemos sugerir que la estimulación de los receptores adrenérgicos lleva a una activación de las neuronas presentes en cultivos primarios hipocampales de rata. Sin embargo, no fue posible asociar esta activación con un aumento en la fosforilación de CREB, como se ha reportado previamente (Chen y cols. 2007). Tampoco se pudo determinar cuál o cuáles de los receptores adrenérgicos están involucrados en las señales transitorias de calcio y en la excitabilidad neuronal.

5.2.- Distribución del receptor β_2 -adrenérgico en cultivos primarios hipocampales.

Existe amplia evidencia en la literatura sobre la presencia de los receptores β -adrenérgicos en el hipocampo (Booze y cols. 1993; Milner y cols. 2000) y de su importancia en la regulación de la plasticidad sináptica y en los procesos de aprendizaje y memoria (Gelinas y Nguyen 2007). Los receptores β -adrenérgicos se encuentran

presentes en el hipocampo principalmente en las regiones postsinápticas del giro dentado (Milner y cols. 2000) y en las neuronas de las regiones CA1 y CA3, observándose que el receptor β_1 está más asociado al soma y al citoplasma, mientras que el receptor β_2 presenta además una distribución nuclear (Guo y Li 2007). Dentro de los receptores adrenérgicos, fue de nuestro particular interés el estudio del receptor β_2 , que está presente en la región postsináptica en neuronas piramidales del hipocampo e involucrado en los procesos de aprendizaje y memoria (Joiner y cols. 2010).

Con el objetivo de evaluar la presencia del receptor β_2 -adrenérgico en extractos de cultivos primarios hipocámpales, se realizó la lisis de placas de cultivo de 60 mm en un mínimo volumen de amortiguador de lisis. En la Figura N° 10 (A) se muestra un Western Blot representativo en el cual se incluyeron muestras de cerebelo e hipocampo de ratas neonatas P3 como control positivo (Rainbow y cols. 1984). Se aprecia una banda inmunoreactiva entre los 60-70 KDa, que es aproximadamente el peso esperado para la proteína, según los datos del fabricante y la literatura (Zhang y cols. 2008). Sobre la banda de interés fue posible observar un bandeo probablemente relacionado con modificaciones postraduccionales de la proteína, como glicosilación (Hamdani y van der Velden 2009). En extractos de cultivos neuronales de hipocampo se observaron bandas inmunoreactivas en todos los DIV evaluados. Para determinar la localización del receptor β_2 en las neuronas hipocámpales, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica. Como se observa en la Figura N° 10 (B), la inmunoreactividad se distribuye en el soma y en dendritas que están marcadas con anticuerpo para MAP2A. A su vez, se observa que ambas señales tienen perfiles de distribución similares. Por lo tanto, se puede concluir que el receptor β_2 adrenérgico tiene en los cultivos una distribución somatodendrítica entre los 7 y los 21 DIV. Se investigó entonces si la activación de los receptores adrenérgicos, en particular el receptor adrenérgico β_2 , es capaz de modificar la morfología dendrítica de neuronas hipocámpales.

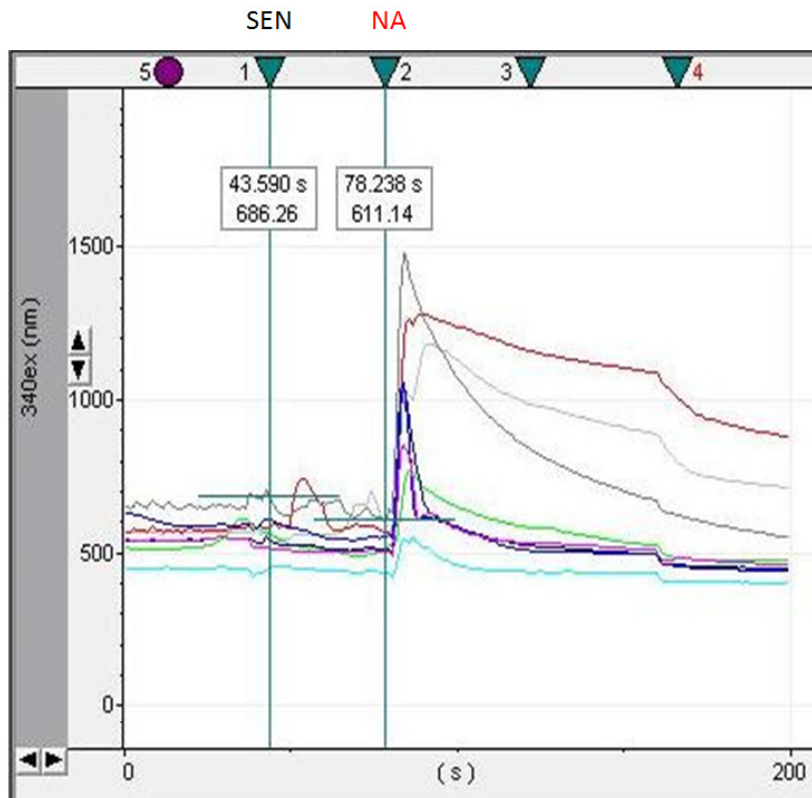


Figura N° 8. Medición de señales intracelulares de Ca^{2+} en cultivos hipocámpales 10 DIV. Las células fueron incubadas con Fluo-4 durante 30 min y luego se inició un registro del cambio de la fluorescencia en una región de interés (ROI) de los somas de las neuronas de un mismo campo. Posteriormente se agregó un pulso de Solución Externa Normal (SEN) y otro de noradrenalina 10 nM (NA) por 5 s y se determinó el cambio de la fluorescencia. Cada línea representa una ROI dentro de una neurona del campo estudiado.

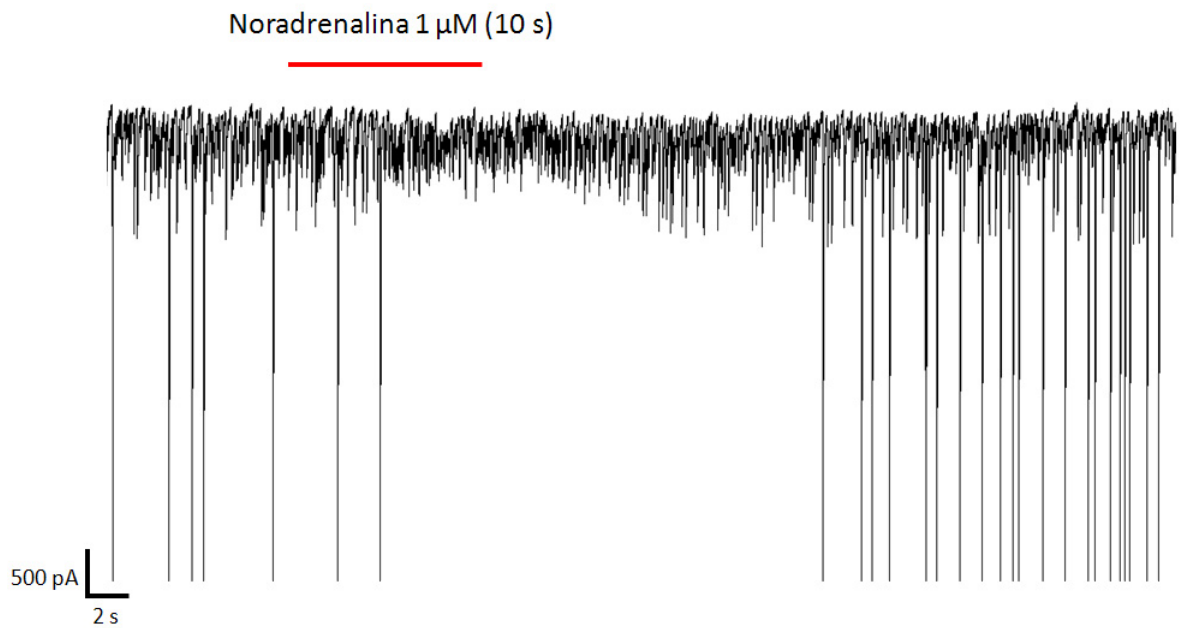


Figura N° 9. Medición de corrientes sinápticas espontáneas en cultivos hipocámpales 12 DIV. Registro en configuración *whole-cell* previo y posterior a la administración de un pulso de 10 s de noradrenalina 1 μ M (NA).

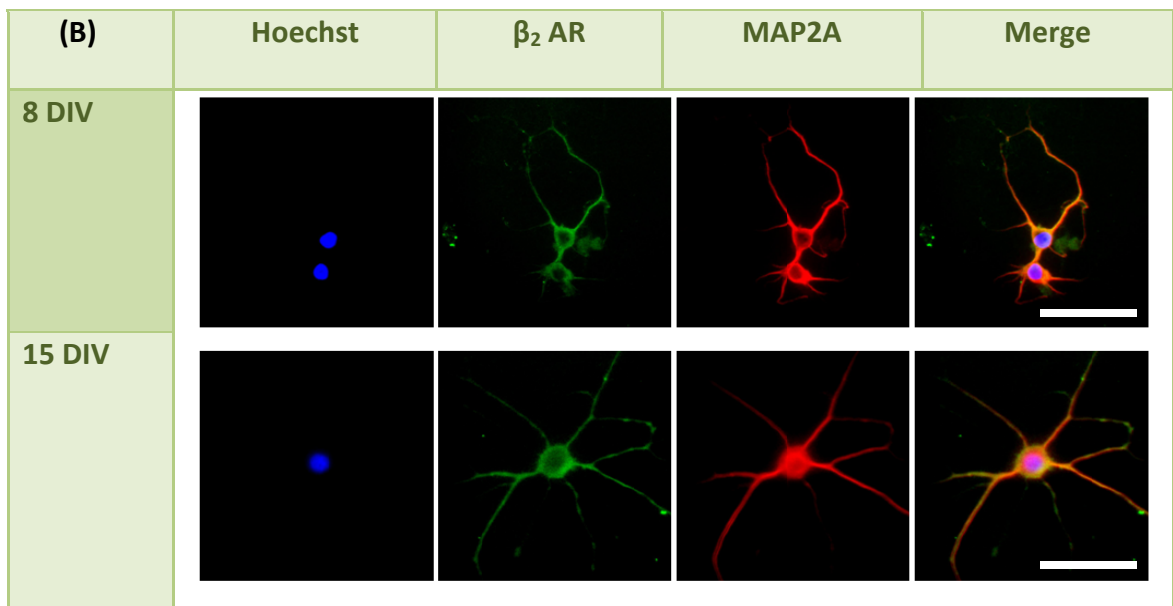
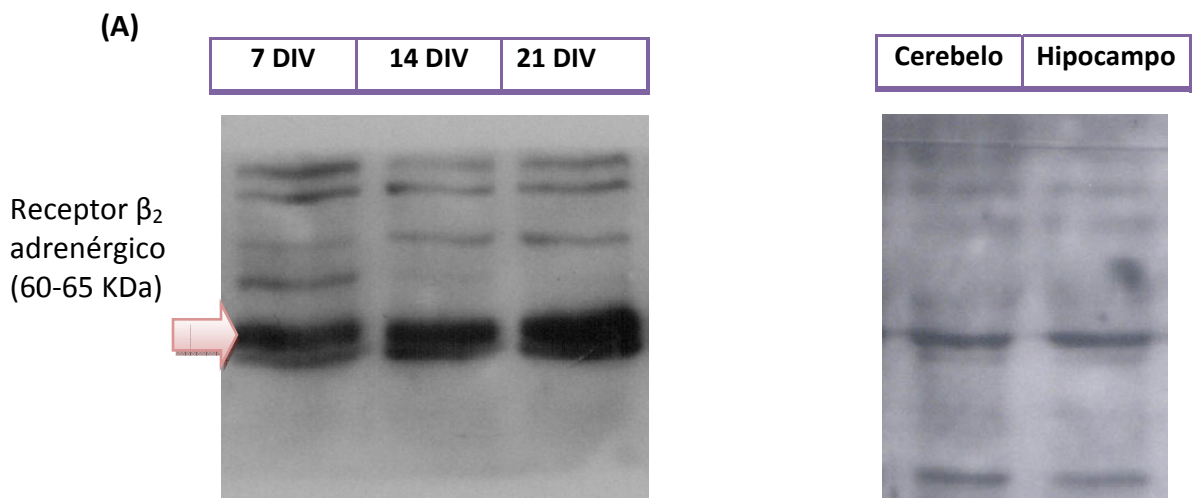


Figura N° 10: Determinación de los niveles de receptor β_2 adrenérgico durante distintos DIV en cultivos primarios hipocampales. (A) Western blot para el receptor β_2 adrenérgico. Se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de cultivos en distintos días in vitro. La señal asociada al receptor β_2 adrenérgico (~64 KDa) se observó en cultivos hipocampales de 7, 14 y 21 DIV. Señales representativas de 4 cultivos independientes. Como control positivo se utilizaron muestras de cerebelo e hipocampo de ratas neonatas P3 (derecha). La barra representa 100 μm . **(B) Inmunocitoquímica para el receptor β_2 adrenérgico.** Fotografías de inmunofluorescencia para MAP2A (rojo), receptor β_2 adrenérgico (verde) y Hoechst (azul) para 8 y 15 DIV, microscopio de epifluorescencia, zoom 40X. Las imágenes son fusionadas a través del programa ImageJ.

5.3.- Efecto de agonistas adrenérgicos sobre la morfología dendrítica

El desafío más grande que se ha planteado en esta Tesis ha sido la implementación de una metodología apropiada para un estudio satisfactorio de la morfología dendrítica en cultivos primarios hipocampales. El esfuerzo se centró principalmente en: **(1)** la búsqueda de condiciones óptimas de cultivo para mantener neuronas a una baja densidad en el cultivo, **(2)** marcaje de las neuronas mediante el uso de marcadores dendríticos (MAP2A) y de los conos de crecimiento, asociados al citoesqueleto de actina (faloidina-rodamina), **(3)** la obtención de fotografías de neuronas aisladas saludables, **(4)** la implementación de una metodología apropiada de cuantificación y **(5)** un análisis global que permita entregar conclusiones veraces.

Se pueden apreciar fotografías representativas de las neuronas estudiadas en la Figura Nº 11.

Con el fin de estudiar el efecto de la activación de los receptores adrenérgicos sobre la morfología neuronal, los cultivos se estimularon durante 24 horas con noradrenalina 100 nM o clenbuterol 25 nM, un agonista β_2 adrenérgico descrito previamente en (Semkova y cols. 1996). Como antagonista adrenérgico se utilizó propranolol 10 μ M. (Ver Figura Nº 2).

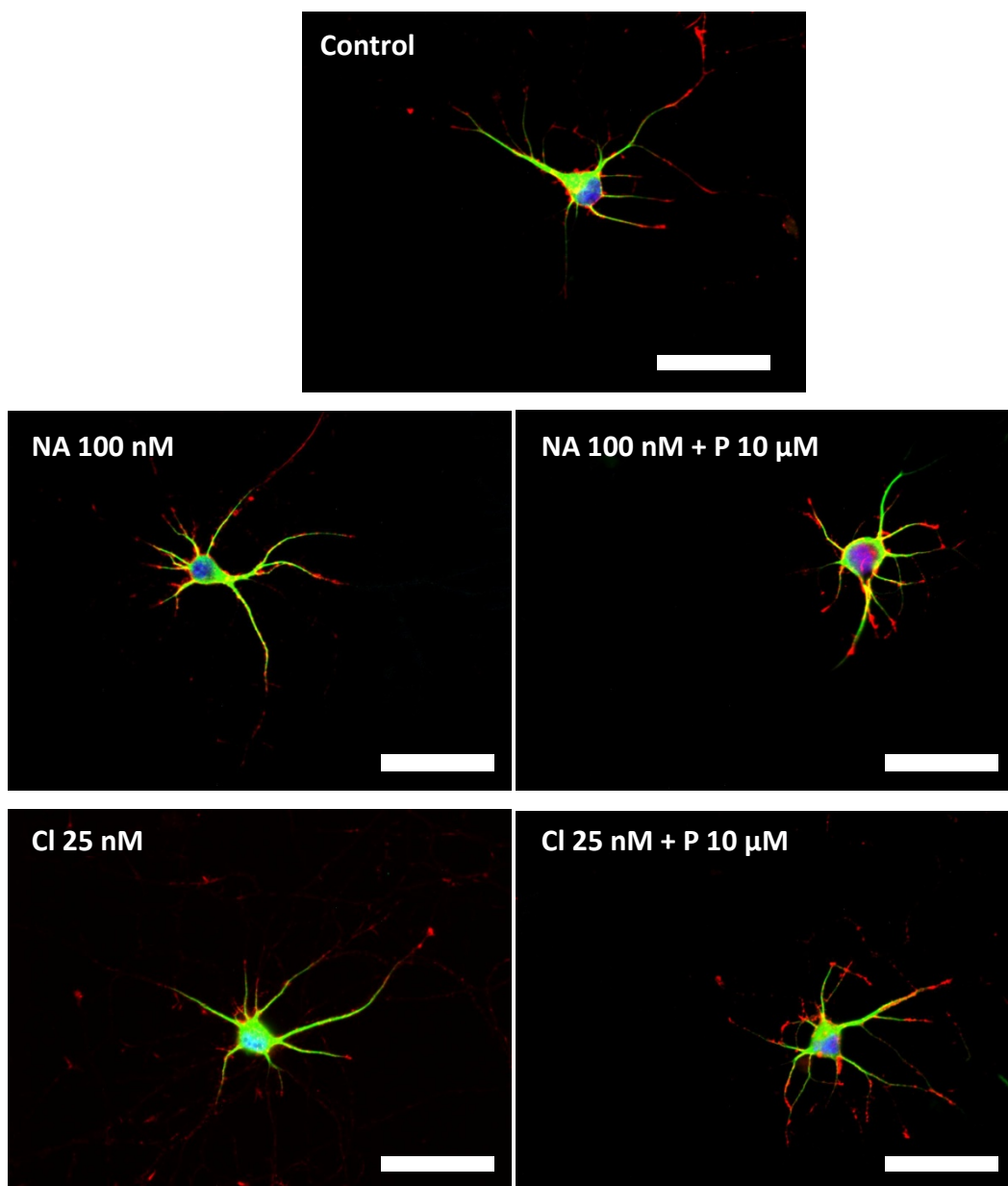


Figura Nº 11. Imágenes representativas de neuronas 8 DIV utilizadas para medición de morfología dendrítica. Las neuronas fueron cultivadas durante 8 días y posteriormente fijadas e inmuno teñidas con MAP2a (marcador dendrítico, verde) y con faloidinorodamina (marcador de citoesqueleto de actina, rojo), junto con la tinción nuclear Hoechst (azul). Se utilizó un microscopio confocal DSU, objetivo 40X. Los canales fueron integrados a través del programa ImageJ. La barra representa 100 μm.

Neuronas pertenecientes a las condiciones: Control (n=280), Noradrenalina 100 nM (n=63), Noradrenalina 100 nM + Propranolol 10 μM (n=78), Clenbuterol 25 nM (n=67) y Clenbuterol 25 nM + Propranolol 10 μM (n=29), provenientes de 4 cultivos independientes.

El efecto de la estimulación farmacológica sobre la morfología dendrítica se estudió a través de los siguientes enfoques:

5.3.1.-Análisis de Sholl. Para esto se trazaron círculos concéntricos desde el soma hacia el exterior y posteriormente se cuantificó el número de intersecciones de la neurona con cada uno de estos círculos, como fue presentado en la Figura N° 4. El análisis de Sholl, por su sencillez, es ampliamente utilizado como una forma de evaluar la complejidad dendrítica (Ristanovic y cols. 2006).

Se cuantificó a través del análisis de Sholl el número de intersecciones por neurona de cultivos estimulados con salbutamol y clenbuterol, agonistas específicos β_2 adrenérgicos (Figura N° 12). Los resultados indicaron que ni la adición de salbutamol o de clenbuterol 25 nM a los cultivos logró modificar el número de intersecciones, confirmando que la activación del receptor β_2 por sí misma no lograría modificar significativamente la arquitectura dendrítica.

Los resultados del análisis de Sholl para la estrategia farmacológica con noradrenalina, clenbuterol y propranolol se resumen en las Figuras N° 13 y N° 14. La incubación de los cultivos con clenbuterol 25 nM o propranolol 10 μ M por 24 horas no produjo ninguna modificación en el número de intersecciones. Sin embargo, se observó que la adición de noradrenalina 100 nM posterior a la incubación con propranolol 10 μ M produjo una reducción en el número de intersecciones en el rango de 30-80 μ m respecto al control. Esto sugiere que la noradrenalina ejerce acciones a través de uno o más subtipos de receptores adrenérgicos distintos a los receptores β_2 , en donde el bloqueo específico de receptores adrenérgicos podría relacionarse con la disminución observada en el número de intersecciones.

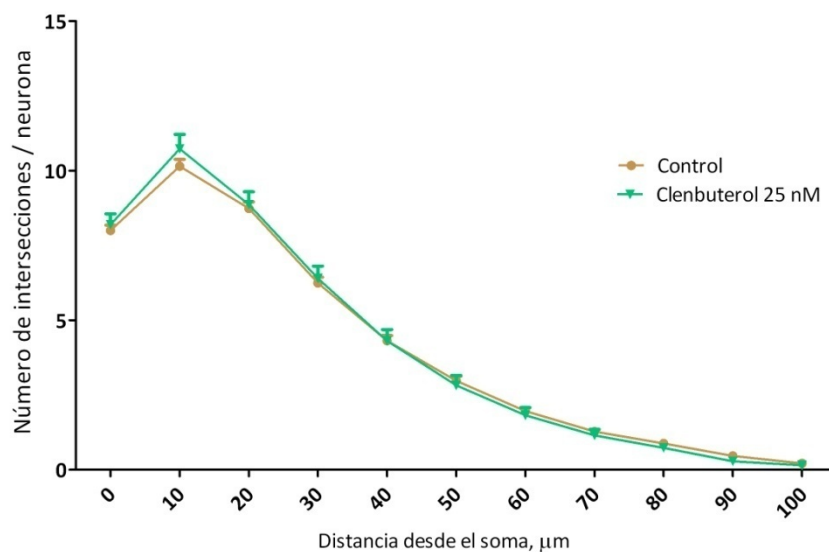
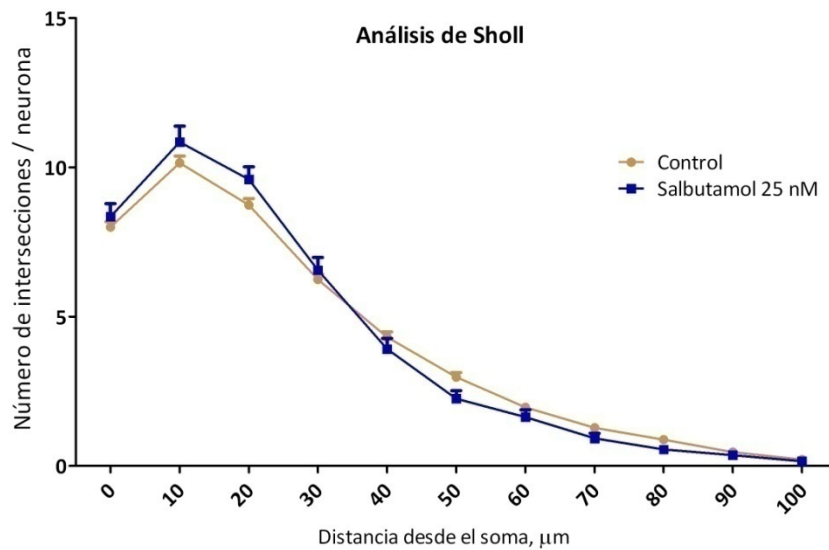


Figura N° 12: Efecto de agonistas β_2 -adrenérgicos sobre el número de intersecciones del análisis de Sholl para cultivos primarios hipocampales 8 DIV. Las neuronas fueron fijadas e inmunoteñidas para realizar el recuento del número de intersecciones en neuronas a los 8 DIV mediante el análisis de Sholl. Las neuronas son fotografiadas en un microscopio confocal DSU y las dendritas son trazadas en el programa NeuronJ. Mediante el programa NeuronStudio se establece la presencia de puntos de ramificación y puntos de término. Utilizando el programa Bonfire (en MATLAB 7.0) se analiza la información proveniente del programa NeuronStudio y se realiza el análisis de Sholl. Valores representan el promedio de intersecciones \pm error estándar de la media. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Clenbuterol 25 nM (n=67) y Salbutamol 25 nM (n=52), provenientes de 4 cultivos independientes.

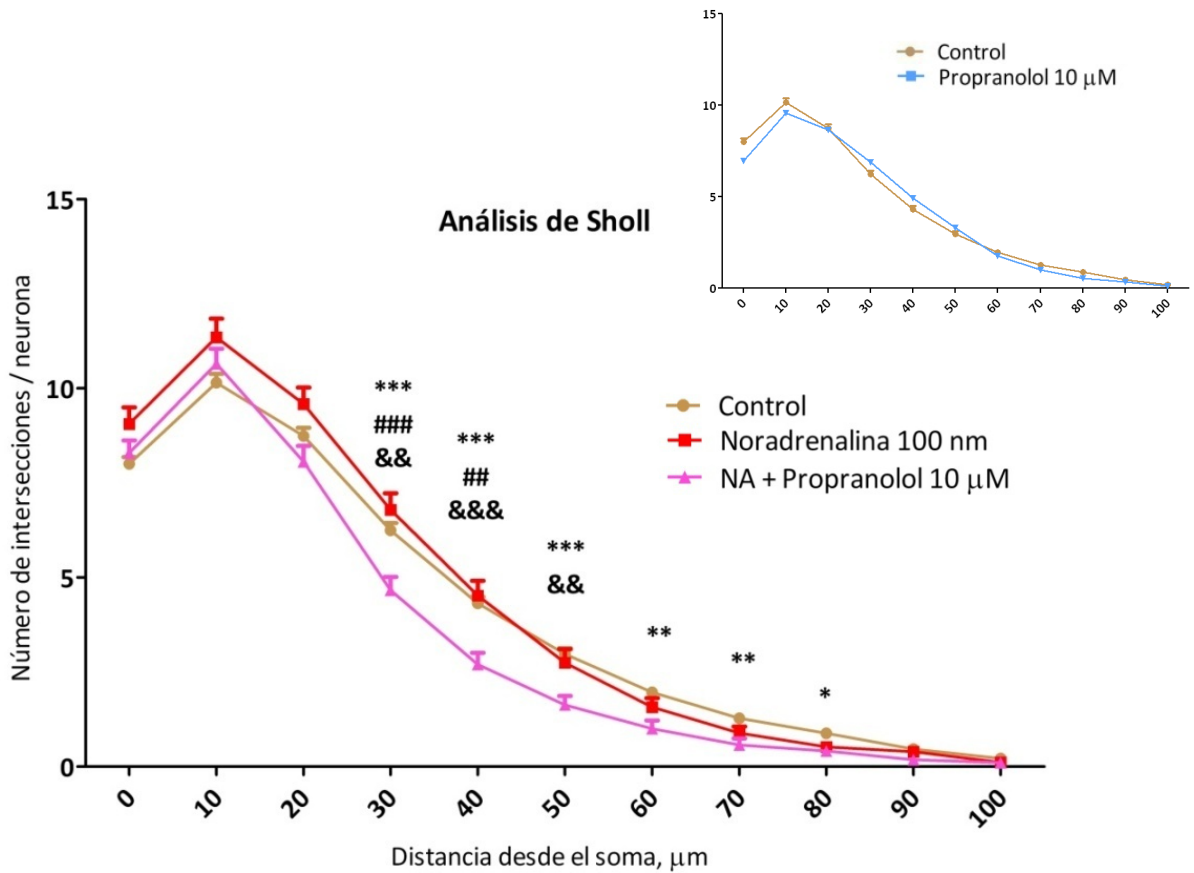


Figura N° 13: Análisis de Sholl para la estimulación con Noradrenalina (NA) de cultivos primarios hipocámpales 8 DIV. Las neuronas fueron fijadas e inmunoteñidas para realizar el recuento del número de intersecciones en neuronas a los 8 DIV mediante el análisis de Sholl. Las neuronas son fotografiadas en un microscopio confocal DSU y las dendritas son trazadas en el programa NeuronJ. Mediante el programa NeuronStudio se establece la presencia de puntos de ramificación y puntos de término. Utilizando el programa Bonfire (en MATLAB 7.0) se analiza la información proveniente del programa NeuronStudio y se realiza el análisis de Sholl. Valores representan el promedio de intersecciones \pm error estándar de la media. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Noradrenalina 100 nM (n=63), Noradrenalina + Propranolol (n=78), y Propranolol 10 μM (n=42), provenientes de 4 cultivos independientes.

Se muestran las diferencias significativas a través de:

*Control v/s Noradrenalina + Propranolol

Noradrenalina v/s Noradrenalina + Propranolol

& Noradrenalina + Propranolol v/s Propranolol

* $p < 0,05$; ** ## && $p < 0,01$; ### &&& $p < 0,001$.

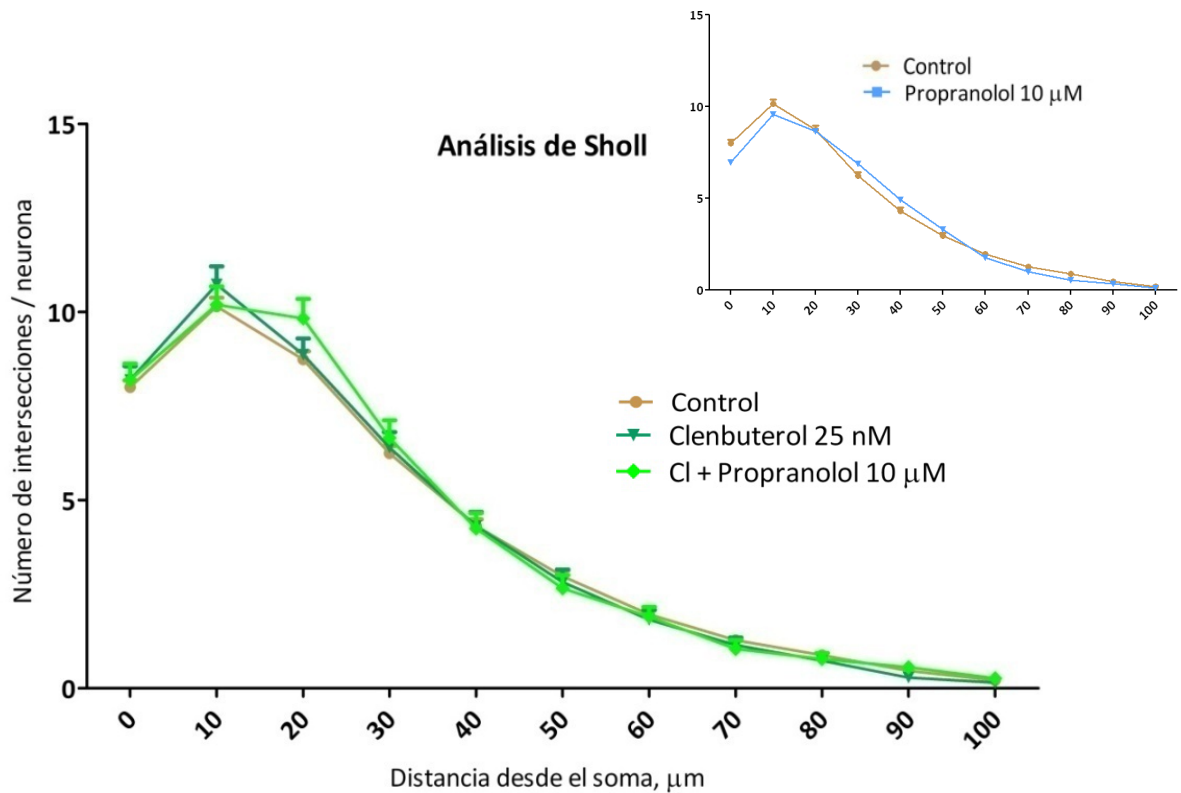


Figura N° 14: Análisis de Sholl para la estimulación con Clenbuterol de cultivos primarios hipocampales 8 DIV. Las neuronas fueron fijadas e inmunoteñidas para realizar el recuento del número de intersecciones en neuronas a los 8 DIV mediante el análisis de Sholl. Las neuronas son fotografiadas en un microscopio confocal DSU y las dendritas son trazadas en el programa NeuronJ. Mediante el programa NeuronStudio se establece la presencia de puntos de ramificación y puntos de término. Utilizando el programa Bonfire (en MATLAB 7.0) se analiza la información proveniente del programa NeuronStudio y se realiza el análisis de Sholl. Valores representan el promedio de intersecciones \pm error estándar de la media. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Clenbuterol 25 nM (n=67), Clenbuterol + Propranolol (n=29) y Propranolol 10 µM (n=42), provenientes de 4 cultivos independientes.

3.3.2.- Puntos de ramificación. Junto con los datos del análisis de Sholl es posible obtener de forma complementaria el número de puntos de ramificación por neurona para cada una de las condiciones experimentales. Los resultados están representados en la Figura N° 15. Ninguna de las condiciones experimentales utilizadas es capaz de modificar significativamente el número de puntos de ramificación por neurona. Ello nos lleva a pensar que las modificaciones observadas en el análisis de Sholl son debidas principalmente a variaciones en el largo y/o número de dendritas por neurona, y no a su patrón de ramificaciones.

5.3.3.- Número de dendritas: En las Figuras N° 16 y N° 17 es posible observar que el número de dendritas primarias y secundarias no se modificó frente a los distintos fármacos. Sin embargo, al separar los datos de acuerdo al largo dendrítico, se puede apreciar que la acción conjunta de noradrenalina y propranolol logró a la vez aumentar el número de dendritas primarias menores de 40 μm y disminuir el número de dendritas primarias mayores a 40 μm . Por otro lado, en la Figura N° 17 se muestra que la presencia de clenbuterol y propranolol produjo una tendencia al aumento en el número de dendritas primarias por neurona, efecto asociado fundamentalmente a las dendritas primarias menores a 40 μm .

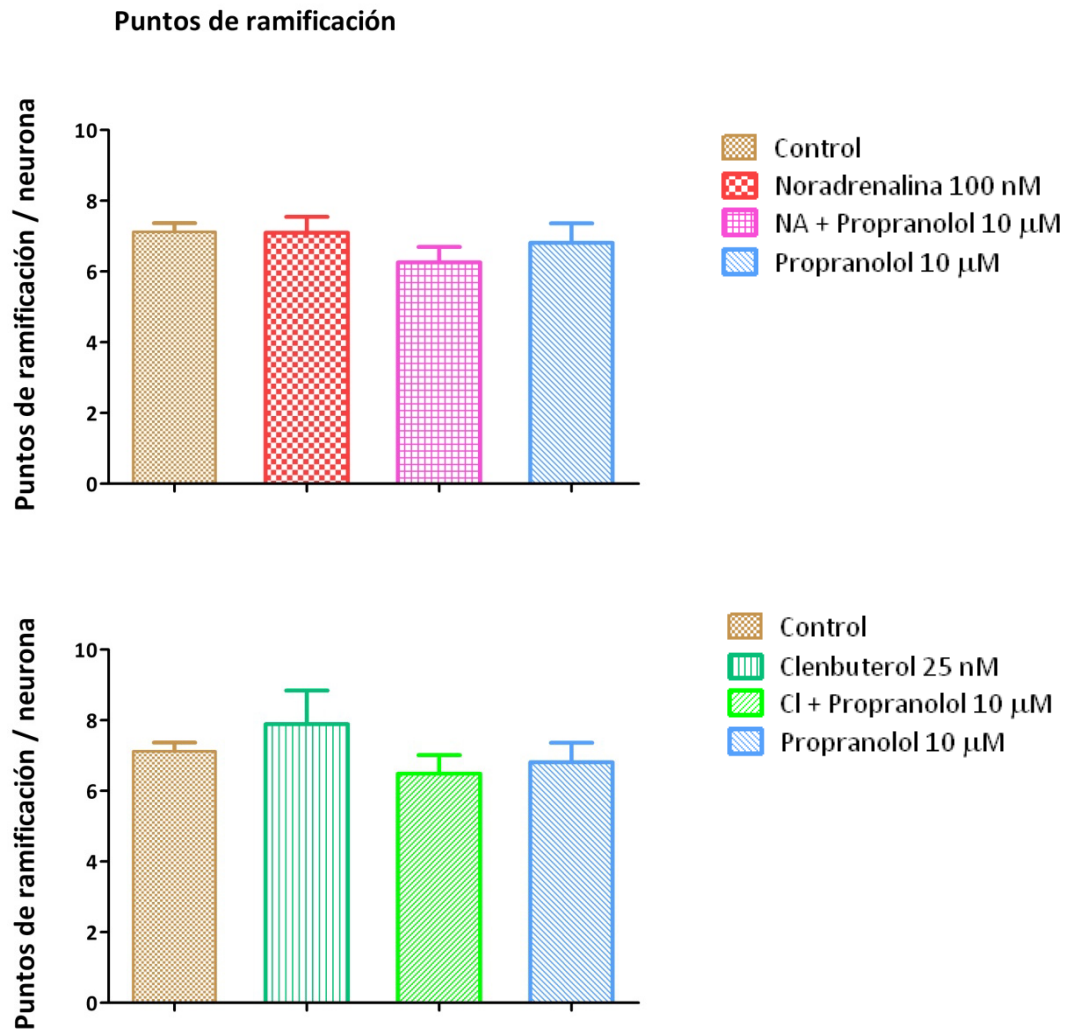


Figura N° 15: Análisis de puntos de ramificación para cultivos primarios hipocampales 8 DIV. Las neuronas fueron fijadas e inmunoteñidas para realizar el recuento del número de intersecciones en neuronas a los 8 DIV mediante el análisis de Sholl. Las neuronas fueron fotografiadas en un microscopio confocal DSU y las dendritas fueron trazadas en el programa NeuronJ. Los puntos de ramificación se establecieron a través del programa NeuronStudio y se exportaron a través del programa Bonfire (en MATLAB 7.0). Valores representan el promedio de puntos de ramificación \pm error estándar de la media. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Noradrenalina 100 nM (n=63), Noradrenalina + Propranolol (n=78), Clenbuterol 25 nM (n=66), Clenbuterol + Propranolol (n=29) y Propranolol 10 μ M (n=42), provenientes de 4 cultivos independientes.

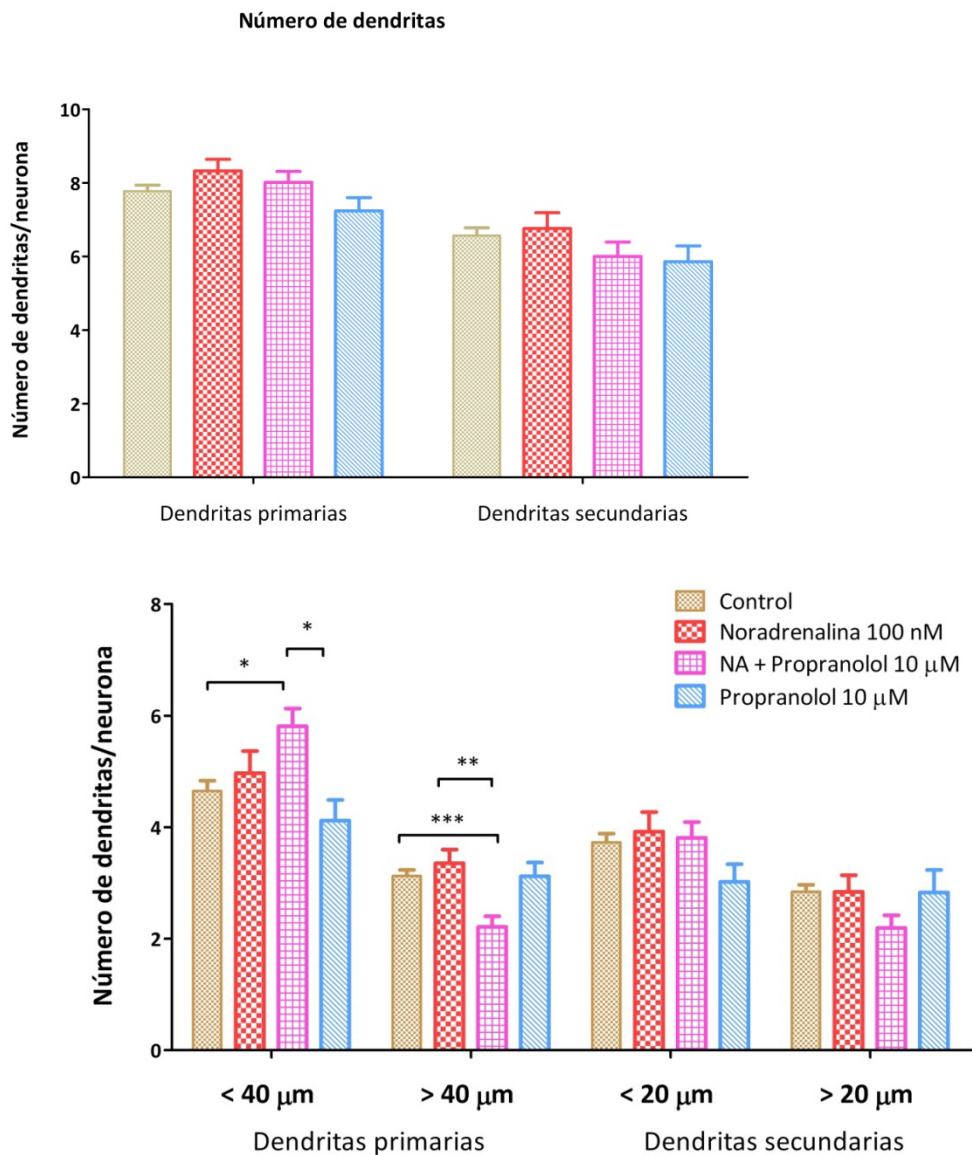


Figura Nº 16: Efecto de la estimulación con NA sobre el número de dendritas primarias y secundarias por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV. Las neuronas a los 7 DIV fueron incubadas durante 24 h con NA 100 nM. El antagonista propranolol se agregó 30 min previo al agonista. Las neuronas fueron fijadas e inmuno teñidas contra MAP2a y el citoesqueleto de actina fue marcado con rodamina-faloïdina. Para determinar el largo dendrítico total, se sumó el largo de las dendritas primarias y secundarias en cada neurona. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Noradrenalina (n=63), Noradrenalina + Propranolol (n=78) y Propranolol (n=42), correspondientes a 4 cultivos independientes. Los valores del número dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media y fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía para cada condición, seguido por el post-test de Bonferroni.

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

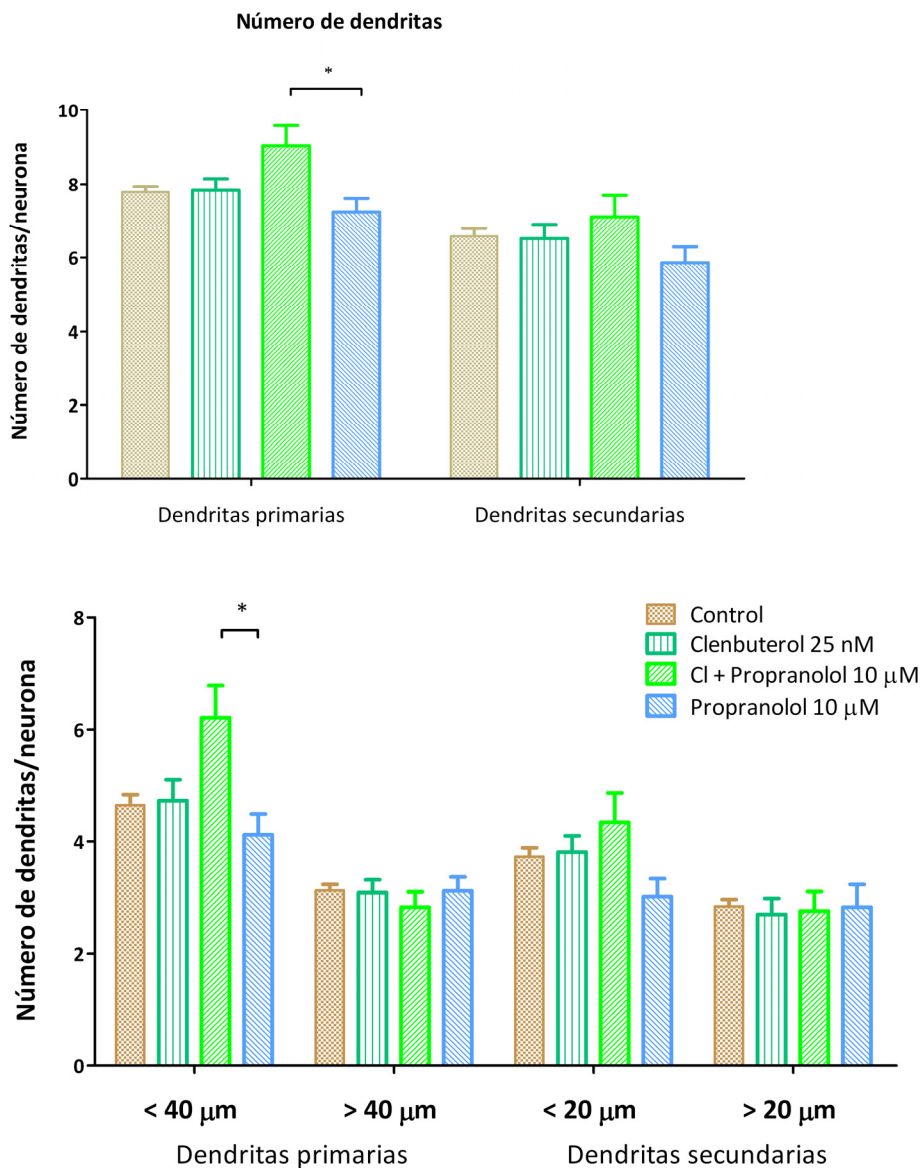


Figura Nº 17: Efecto de la estimulación con Clenbuterol sobre el número de dendritas primarias y secundarias por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV. Las neuronas a los 7 DIV fueron incubadas durante 24 h con Clenbuterol 25 nM. El antagonista propranolol se agregó 30 min previo al agonista. Las neuronas fueron fijadas e inmunoteñidas contra MAP2a y el citoesqueleto de actina fue marcado con rodamina-faloidina. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Clenbuterol (n=67), Clenbuterol + Propranolol (n=29) y Propranolol (n=42), correspondientes a 4 cultivos independientes. Los valores del número dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media y fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía para cada condición, seguido por el post- test de Bonferroni. * p < 0,05.

5.3.4.- Largo dendrítico total: la medida del largo dendrítico total permite una evaluación detallada de los cambios de longitud dendrítica. Sin embargo, este parámetro muestra una gran dispersión en sus valores. Los resultados de largo dendrítico total se muestran en las Figuras N° 18 y N° 19.

En la Figura N° 18 se puede observar que la presencia conjunta de noradrenalina y propranolol logró disminuir significativamente el largo dendrítico total en las dendritas primarias. Al hacer un análisis por rangos, observamos que este efecto se asoció fundamentalmente a las dendritas primarias mayores a 40 μm .

Si bien no se pudieron observar efectos del clenbuterol sobre el largo dendrítico total en dendritas primarias y secundarias, sí se observaron cambios significativos en dendritas menores a 40 μm frente a la incubación conjunta de clenbuterol y propranolol, como se muestra en la Figura N° 19. El aumento observado se correlaciona con una disminución no significativa en el largo dendrítico total de las dendritas mayores a 40 μm .

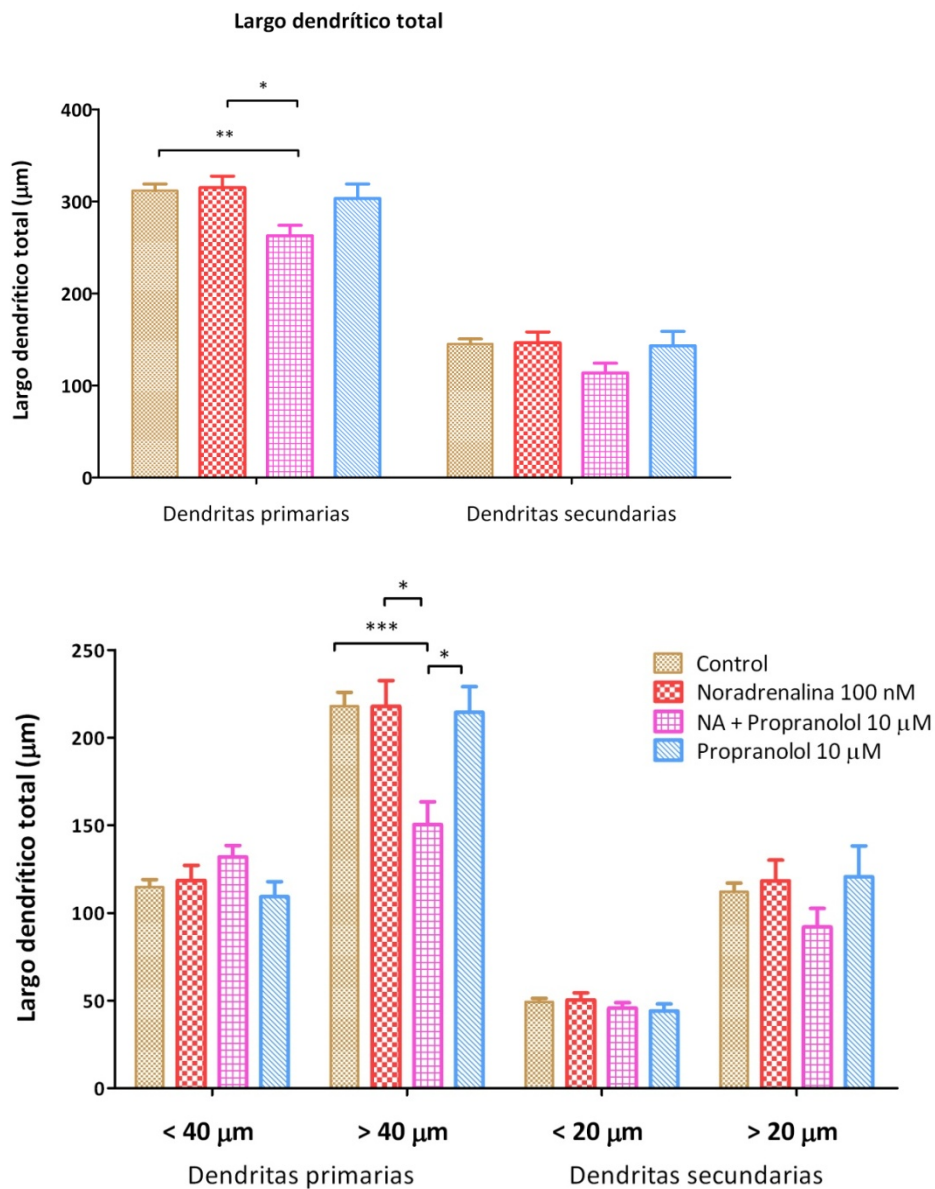


Figura Nº 18: Efecto de la estimulación con NA sobre el largo dendrítico total por neurona en cultivos primarios hipocámpales 8 DIV. Las neuronas a los 7 DIV fueron incubadas durante 24 h con NA 100 nM. El antagonista propranolol se agregó 30 min previo al agonista. Las neuronas fueron fijadas e inmuno teñidas contra MAP2a y el citoesqueleto de actina fue marcado con rodamina-faloídina. Para determinar el largo dendrítico total, se sumó el largo de las dendritas primarias y secundarias en cada neurona. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Noradrenalina (n=63), Noradrenalina + Propranolol (n=78) y Propranolol (n=42), correspondientes a 4 cultivos independientes. Los valores de largo dendrítico total son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media y fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía para cada condición, seguido por el post-test de Bonferroni. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

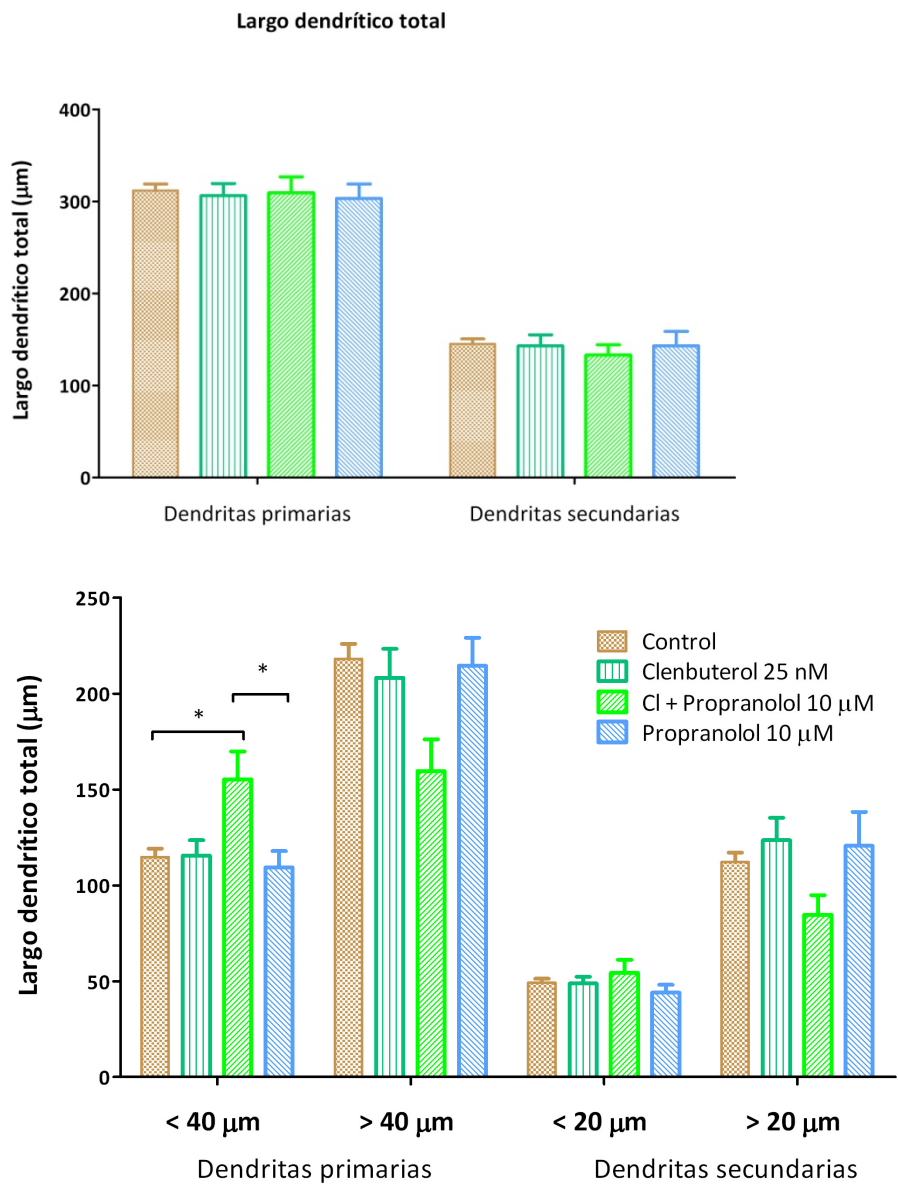


Figura Nº 19: Efecto de la estimulación con Clenbuterol sobre el largo dendrítico total por neurona en cultivos primarios hipocampales 8 DIV Las neuronas a los 7 DIV fueron incubadas durante 24 h con Clenbuterol 25 nM. El antagonista propranolol se agregó 30 min previo al agonista. Las neuronas fueron fijadas e inmunoteñidas contra MAP2a y el citoesqueleto de actina fue marcado con rodamina-faloïdina. Para determinar el largo dendrítico total, se sumó el largo de las dendritas primarias y secundarias en cada neurona. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Clenbuterol (n=67), Clenbuterol + Propranolol (n=29) y Propranolol (n=42), correspondientes a 4 cultivos independientes. Los valores de largo dendrítico total son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media y fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía para cada condición, seguido por el post- test de Bonferroni. * $p < 0,05$.

5.3.5.- Largo dendrítico promedio: la medida del largo dendrítico promedio, junto con el largo dendrítico total, permiten establecer si hay cambios morfológicos asociados a crecimiento o a retracción dendrítica. La ventaja del largo dendrítico promedio es que permite una menor dispersión de los datos, comparado con el largo total.

Los datos de largo dendrítico promedio se resumen en las Figuras N° 20 y N° 21. Se aprecia que, frente a la presencia de propranolol junto con NA, se logró una reducción significativa en el largo promedio de las dendritas primarias: junto con ello, se observa una disminución del largo promedio en las dendritas secundarias. La adición de NA, clenbuterol o propranolol por separado no produjo efecto sobre este parámetro.

El valor desglosado de acuerdo al largo de las dendritas varió de forma similar frente a la presencia de NA con propranolol, y clenbuterol con propranolol: se observó una disminución del largo promedio en las dendritas primarias mayores de 40 μm y en las secundarias mayores de 20 μm .

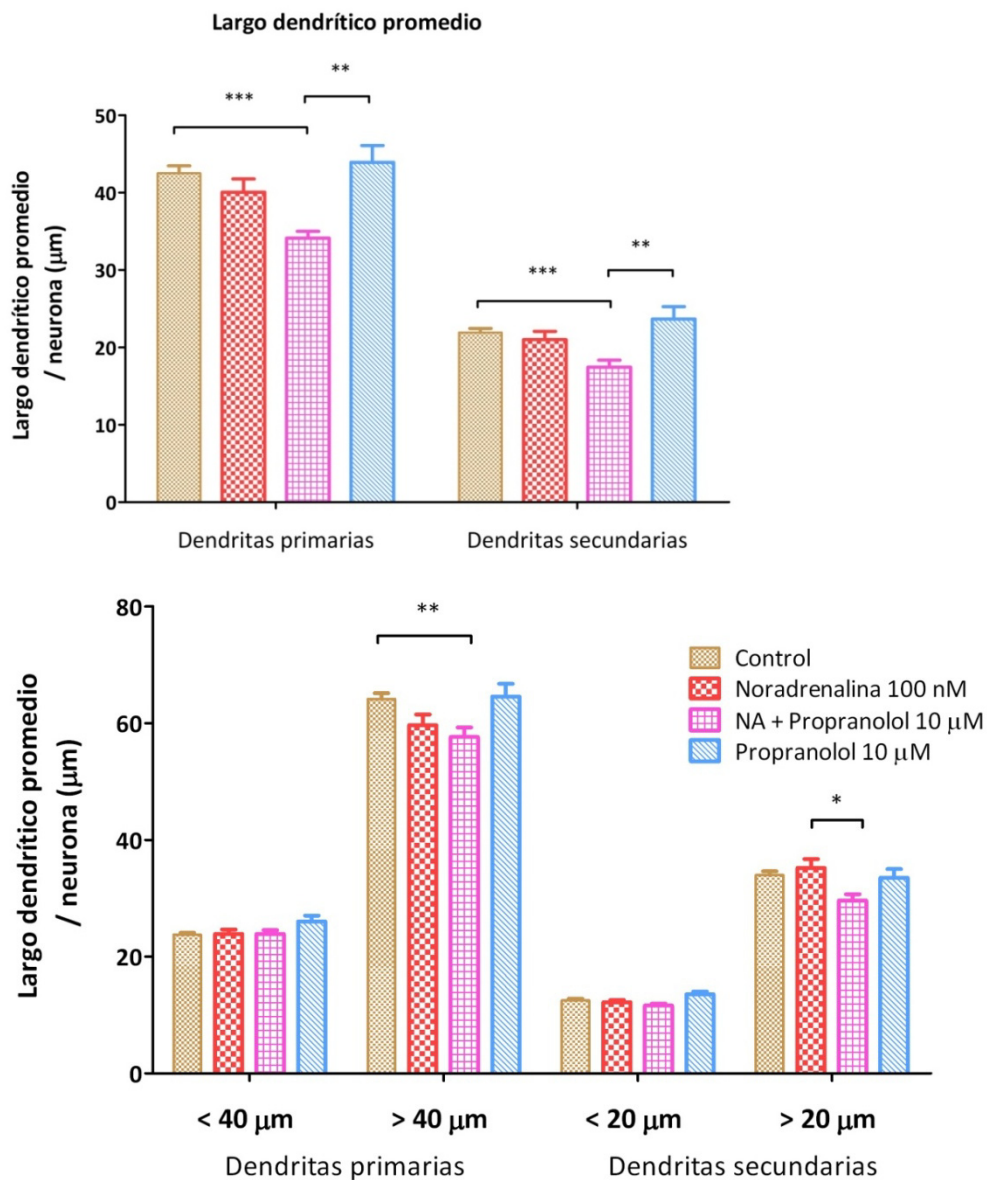


Figura Nº 20: Efecto de la estimulación con NA sobre el largo dendrítico promedio por neurona en cultivos primarios hipocámpales 8 DIV. Las neuronas a los 7 DIV fueron incubadas durante 24 h con NA 100 nM. El antagonista propranolol se agregó 30 min previo al agonista. Las neuronas fueron fijadas e inmuno teñidas contra MAP2A y el citoesqueleto de actina fue marcado con rodamina-faloidina. Para determinar el largo dendrítico promedio, se sumó el largo de las dendritas primarias y secundarias de cada neurona, y luego se dividió por el número de dendritas en cada categoría. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Noradrenalina (n=63), Noradrenalina + Propranolol (n=78) y Propranolol (n=42), correspondientes a 4 cultivos independientes. Los valores de largo dendrítico promedio son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media y fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía para cada condición, seguido por el post- test de Bonferroni.

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

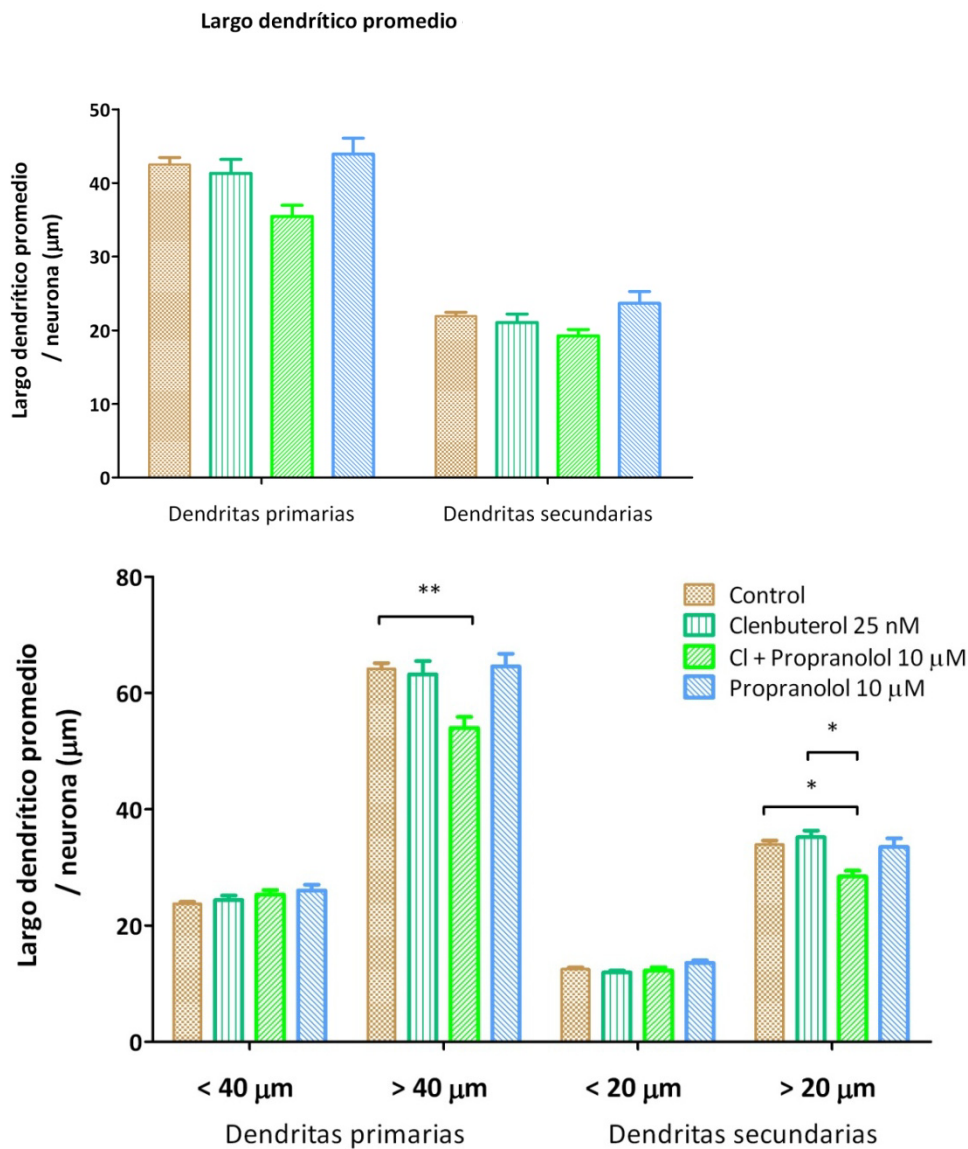


Figura Nº 21: Efecto de la estimulación con Clenbuterol sobre el largo dendrítico promedio por neurona en cultivos primarios hipocámpales 8 DIV. Las neuronas a los 7 DIV fueron incubadas durante 24 h con Clenbuterol 25 nM. El antagonista propranolol se agregó 30 min previo al agonista. Las neuronas fueron fijadas e inmunoteñidas contra MAP2A y el citoesqueleto de actina fue marcado con rodamina-faloidina. Para determinar el largo dendrítico promedio, se sumó el largo de las dendritas primarias y secundarias de cada neurona, y luego se dividió por el número de dendritas en cada categoría. Neuronas cuantificadas para las condiciones control (n=280), Noradrenalina (n=63), Noradrenalina + Propranolol (n=78) y Propranolol (n=42), correspondientes a 4 cultivos independientes. Los valores de largo dendrítico promedio son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media y fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía para cada condición, seguido por el post-test de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

A partir de los datos de morfología dendrítica pudo establecerse que ninguno de los tres fármacos utilizados modificó por sí mismo la distribución del número de intersecciones por neurona del análisis de Sholl en cultivos hipocampales 8 DIV. La adición de NA posterior al propranolol, sin embargo, logró una disminución del número de intersecciones por neurona en el rango de los 30-80 μm . Ninguna de las condiciones experimentales logró modificar significativamente la cantidad de puntos de ramificación, por lo que se procedió a estudiar el largo y número de dendritas por neurona, pensando que las diferencias observadas en el análisis de Sholl podrían explicarse por una variación en estos parámetros.

Al medir el largo y número de dendritas, se observó que la incubación con NA posterior a propranolol logró disminuir el largo total y el largo promedio de las dendritas primarias, sin modificar significativamente el número de dendritas. Del mismo modo, el largo promedio de las dendritas secundarias disminuyó frente a la adición de NA en presencia de propranolol en los cultivos, sin que estas modificaciones fuesen significativas al medir el largo dendrítico total y el número de dendritas secundarias. En su conjunto, estos resultados nos sugieren una menor tasa de crecimiento de las dendritas, principalmente de las dendritas primarias, frente a esta condición experimental.

La medición de largo y número de dendritas frente a la estimulación conjunta de clenbuterol y propranolol mostró una tendencia al aumento del número de dendritas primarias frente a esta condición experimental. Ni el largo dendrítico total o el largo dendrítico promedio se vieron modificados en dendritas primarias o secundarias, pero en las dendritas primarias mayores a 40 μm y en las dendritas secundarias mayores a 20 μm se observa una disminución significativa del largo dendrítico promedio.

6.- DISCUSIÓN

6.1.- Reducción de la complejidad dendrítica asociada a la activación de receptores adrenérgicos.

Las dendritas reciben, procesan e integran las señales provenientes de sus múltiples sinapsis. Estas funciones dependen, en primera instancia, del patrón de ramificación del árbol dendrítico y del número de contactos sinápticos establecidos. Los principales logros de esta Tesis se relacionan con la implementación de metodologías para observar cambios morfológicos en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Asimismo, por primera vez se describen, mediante estudios farmacológicos, efectos sobre la morfología dendrítica asociados a la activación de receptores adrenérgicos. Esto último tiene una gran relevancia desde el punto de vista farmacológico, indicando que la noradrenalina a través de sus receptores noradrenérgicos puede influenciar la morfología neuronal. Desde el punto de vista clínico, se piensa que los mejores fármacos antidepresivos, especialmente para pacientes con resistencia a los tratamientos clásicos, son aquellos que logran incrementar los niveles de noradrenalina en el espacio sináptico (Beyer y cols. 2002; Papakostas y cols. 2007; Papakostas y cols. 2008). La mejor comprensión de estos fenómenos avalaría el uso de fármacos con acción adrenérgica en las terapias antidepresivas (Massana 1998) y el mayor desafío sería diseñar fármacos que tuviesen una mejor distribución en el sistema nervioso central, reduciendo de esa forma los efectos periféricos.

6.2.- Efecto de la noradrenalina sobre la morfología neuronal.

Se ha descrito que luego de 24 h de la administración aguda de desipramina (inhibidor de la recaptura de NA) a ratas de 21 días de edad se observa un aumento en el largo y número de las dendritas secundarias de neuronas CA1 del hipocampo (Norrholm y

cols., 2000). Este efecto podría relacionarse a priori con la modificación en los niveles de NA en el espacio sináptico propiciados por la administración del fármaco (Beyer y cols. 2002; Gilmore y cols. 2002). Más aún, uno de los mecanismos propuestos en la acción de los fármacos antidepresivos es que el aumento de los niveles de neurotransmisores en el espacio sináptico activa cascadas transduccionales capaces de revertir la atrofia neuronal observada en sujetos con depresión (Pittenger y Duman 2008). En relación con esto último, se ha descrito que la activación de los receptores adrenérgicos provocada por una estimulación farmacológica con NA incrementa la síntesis de BDNF, el cual tiene acciones sobre la morfología neuronal a través de la activación de varias cascadas transduccionales, incluyendo la fosforilación de CREB y la activación de las vías PI3K y MAPK (Chen y cols. 2007; Juric y cols. 2008). A diferencia de este estudio, en esta Tesis no se pudieron observar cambios en los niveles de p-CREB, lo cual puede deberse a que el cultivo se encontraba en un estadio diferente (4 DIV versus 7 DIV). Del mismo modo, los autores no detallaron claramente el medio de cultivo en el cual mantenían las células durante el cultivo y estimulación. Más aún, estos autores sugieren que en el cultivo existe una producción de NA basándose en el hecho de que los antidepresivos, que inhiben el transportador de NA, producen un efecto similar a la NA sobre los niveles de BDNF y CREB. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de NA o de metabolitos de ésta en los cultivos a través de HPLC. Independiente de la discrepancia con los resultados de esta Tesis, en el trabajo de (Chen y cols. 2007) se describió el efecto de antagonistas adrenérgicos β - (propranolol), α_1 - (prazosina) y α_2 - (yohimbina) sobre el incremento del BDNF producido por NA, indicando que la activación de estos receptores podría estar relacionada con los efectos descritos.

En esta Tesis se determinó que la noradrenalina es capaz de promover señales transitorias de Ca^{2+} y de reducir la excitabilidad de las neuronas hipocámpales en los

cultivos neuronales. La presencia de noradrenalina 100 nM produjo un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelulares, lo que otros autores han relacionado con un efecto β -adrenérgico (Gray y Johnston 1987). La reducción observada en la excitabilidad neuronal, en tanto, es un efecto similar al observado por otros autores mediante la activación de receptores α_1 -adrenérgicos (Scheiderer y cols. 2004). Aunque no hemos podido determinar la contribución de un receptor adrenérgico específico, se ha determinado que el receptor β_2 esta presente con una localización somatodendrítica y que la estimulación con agonistas selectivos promueve incrementos de Ca^{2+} en las neuronas. Otros autores utilizando neuronas maduras han descrito que agonistas β -adrenérgicos inducen cambios transitorios de Ca^{2+} en las espinas pero no en las dendritas; siendo este efecto bloqueado por antagonistas de canales de calcio tipo L (Hoogland y Saggau 2004). Más aún, se ha descrito que el receptor β_2 -adrenérgico es capaz de formar un complejo proteico donde coexiste con el canal de calcio tipo L (Cav1.2), la proteína G, AC, PKA y la fosfatasa PP2A (Davare y cols. 2001).

Esta Tesis mostró que la noradrenalina por sí sola no ejerce efecto sobre la morfología dendrítica; sin embargo, al incubar previamente los cultivos con el antagonista β -adrenérgico propranolol, se observó una reducción en la complejidad dendrítica, asociado fundamentalmente a una reducción en el largo de las dendritas primarias. Esto se refleja además en la disminución del número de dendritas primarias largas y en el aumento concomitante en el número de dendritas primarias cortas, sin que el número total de dendritas primarias se viera modificado (Ver Figuras Nº 16 y Nº 18). Por otra parte, la presencia del antagonista solo no produjo ningún efecto sobre la morfología dendrítica.

Con la idea de tener una aproximación sobre el o los tipos de receptores involucrados en los cambios morfológicos observados, se utilizó clenbuterol, un agonista β_2 -

adrenérgico. El clenbuterol es una molécula lipofílica y se ha descrito que el enantiómero (+)-clenbuterol actúa como neuroprotector contra el daño excitotóxico o frente a estímulos proapoptóticos, y es capaz de reducir el daño isquémico a través de la activación de receptores β_2 -adrenérgicos (Junker y cols. 2002). De forma interesante, la exposición de cultivos de astrocitos a clenbuterol 10 μ M promueve una morfología estrellada y un aumento en la inmunoreactividad para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Culmsee y cols. 2007). En esta Tesis, el tratamiento de los cultivos con clenbuterol 25 nM no mostró un efecto significativo en la morfología dendrítica. La incubación con salbutamol, otro agonista β_2 -adrenérgico, a una concentración de 25 nM, no produce efectos apreciables sobre la morfología neuronal, sugiriendo que los receptores β_2 -adrenérgicos no modulan el crecimiento dendrítico. La adición de clenbuterol posterior a la incubación de los cultivos con propranolol 10 μ M, en tanto, no produjo modificaciones en el largo total pero sí en el número de dendritas, y en particular de las dendritas primarias de menor tamaño, lo que produjo una disminución del largo promedio. Esto sugiere que bajo esta condición farmacológica se estaría produciendo principalmente un aumento en el número de dendritas cortas, resultado que debe ser tomado con cautela debido a que el número de neuronas cuantificadas bajo esta condición (n=29) es menor que el de las otras condiciones experimentales.

De acuerdo a estos resultados, podríamos postular que la NA activa receptores adrenérgicos que tienen efectos opuestos sobre la morfología dendrítica, por lo que frente a la estimulación con NA no se observan cambios. Esta sugerencia se basa en el hecho de que la aplicación de la NA luego de bloquear receptores β -adrenérgicos promueve una reducción en el largo pero no en el número de las dendritas primarias: a través del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos se puede observar el efecto neto de los receptores α -adrenérgicos, que sería la inhibición del crecimiento dendrítico.

Proponemos que la NA promueve efectos sobre la morfología a través de la activación de receptores β_1 - y/o α -adrenérgicos, y que estas subclases de receptores tienen acciones opuestas sobre la plasticidad en neuronas hipocampales, asociándose los receptores α -adrenérgicos a una disminución de la excitabilidad neuronal y una mejora en el LTD, mientras que los receptores β -adrenérgicos aumentan la excitabilidad neuronal y mejoran el LTP (Gelinás y Nguyen 2007; O'Dell y cols. 2010) (Ver Figura N° 1). Si bien los datos son claros en mostrar que la activación del receptor β_2 -adrenérgico no modifica la arquitectura dendrítica, será importante determinar el efecto de agonistas y antagonistas específicos de los receptores β_1 - o α -adrenérgicos con la finalidad de comprobar la participación de estos receptores sobre la morfología dendrítica.

Una limitante del estudio es que no podemos precisar si durante la incubación durante 24 h con NA se promueve una desensibilización o reducción en la disponibilidad de receptores y que la adición del propranolol favorezca una regulación hacia arriba o un mayor acoplamiento de alguno de los receptores adrenérgicos con su cascada de señalización (Luttrell y Gesty-Palmer 2010; Tzingounis y cols. 2010). Una forma de evaluar estas posibilidades sería mediante estudios electrofisiológicos en neuronas aisladas, utilizando la exposición prolongada a NA en presencia y ausencia de antagonistas por 24 h. A su vez, la administración previa de propranolol en los cultivos podría modificar la distribución y proporción de los receptores presentes en las neuronas, explicando en parte los cambios morfológicos observados. Otra herramienta de aproximación sería un experimento de inmunocitoquímica posterior al estímulo farmacológico, utilizando anticuerpos que reconozcan la porción NH_2 -terminal de los receptores, pudiendo así detectar cambios en la distribución de los receptores después de los estímulos.

Se ha descrito previamente en cultivos hipocampales (Banker y Cowan 1979) la existencia de diferentes morfologías neuronales durante los días *in vitro*, lo que podría dar cuenta de la heterogeneidad de los cultivos en función de los fenotipos neuronales presentes. Por la metodología utilizada, no fue posible en esta Tesis determinar si determinados tipos neuronales responden diferencialmente frente a la estimulación farmacológica de receptores β -adrenérgicos. Sin embargo, se observó que la inmunotinción para el receptor β_2 -adrenérgico no está presente de forma homogénea en todas las células: esto sugiere que podrían coexistir distintas poblaciones neuronales, asociadas a diferentes densidades de receptores adrenérgicos. En apoyo a esta idea, se ha descrito que la distribución de canales de calcio en cultivos hipocampales y su inhibición frente a fármacos bloqueadores es heterogénea en cultivos neuronales similares a los descritos en esta Tesis (Reuter 1995). Más aún, se ha descrito que los receptores glutamatérgicos AMPAR y NMDAR varían notoriamente su distribución en neuronas hipocampales durante los días de cultivo (Rao y cols. 1998). Esto apoyaría la noción de que la capacidad de estimulación farmacológica estaría relacionada con el tipo de conexión neuronal formada (Reuter 1995) y con el estadio de los cultivos neuronales. De este modo, es posible que las estimulaciones adrenérgicas utilizadas en esta Tesis afecten de distinta manera a las neuronas hipocampales presentes en cultivo, ya sea por una diferente densidad de receptores adrenérgicos entre las células o por una diferente neuroplasticidad asociada a la estructura sináptica. Una metodología que permitiría trabajar en cultivos más homogéneos sería la sobreexpresión de un receptor adrenérgico en particular en los cultivos hipocampales, haciendo que la respuesta morfológica al estímulo posea una relación más fuerte con la especificidad de la estimulación adrenérgica. En esta Tesis no es posible distinguir cuáles son las subpoblaciones neuronales cuya citoarquitectura estaría siendo modificada, ni si la modificación de la arquitectura dendrítica se puede asociar a la presencia o ausencia de determinado receptor adrenérgico. Sería de nuestro interés

saber si es posible asociar la estimulación farmacológica con cierto tipo de morfología o marcador neuronal que permita aclarar cuáles son las poblaciones neuronales que son más sensibles a la estimulación α - o β -adrenérgica.

Por otro lado, se desconoce la participación que podrían tener los receptores β_3 -adrenérgicos, recientemente descritos en neuronas hipocámpales (Jhaveri y cols. 2010), en los resultados obtenidos, puesto que el propranolol no logra bloquear a este receptor con la misma potencia que a los receptores β_1 - y β_2 -adrenérgicos (Cohen y cols. 1995). No es posible proponer con los datos obtenidos, entonces, cómo participaría este receptor en la modulación de la morfología dendrítica. Igualmente, no se puede descartar una rápida metabolización u oxidación de los fármacos utilizados y que entonces el efecto observado sea producto de la activación de una cascada de señalización que ocurre en forma temprana y que se traduce en cambios morfológicos en forma retardada. Con el objetivo de controlar la oxidación de los fármacos usados se probó la adición de ácido ascórbico 1 mM al medio, pero se observó un mayor número de células muertas (no mostrado) por lo que no se utilizó en los experimentos.

6.3.- Cascadas transduccionales en neuronas asociadas a cambios en la morfología dendrítica

Diversas moléculas extracelulares han sido identificadas como reguladores del desarrollo dendrítico a través de la regulación de la actividad de la familia de proteínas Rho (proteínas G pequeñas, como RhoA, Rac1 y la proteína de división del ciclo celular cdc42). Las proteínas Rho actúan a través de las quinasas efectoras ROCK (Rho quinasa) y PAK (quinasas activadas por p21), regulando la actividad de la serín-proteína quinasa LIMK. Esta enzima activa es capaz de fosforilar e inactivar al factor depolimerizador de actina ADF/cofilina y junto con ello, ayuda al desensamblado de los microtúbulos

(Bernard 2007). La actividad de la LIMK está contrarrestada por la fosfatasa Slingshot (SSH), capaz de desfosforilar y reactivar a la cofilina: la acción de LIMK y SSH sería crucial en el control de la motilidad en los conos de crecimiento y en la morfología y extensión de las neuritas (Endo y cols. 2003). Como se ha observado que la cofilina tiende a presentarse en la densidad postsináptica y en el tronco dendrítico (Yildirim y cols. 2008), es posible pensar que RhoA, LIMK y la cofilina están asociadas a la plasticidad sináptica.

Por otro lado, la vía Ras - PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) – Akt es capaz de fosforilar y así inhibir a la quinasa de la glicógeno-sintasa-3, GSK3 β . Esta vía sería importante en regular la formación de microtúbulos. Por ejemplo, en cultivos de neuronas hipocampales, BDNF (a través de PI3K), inhibe a GSK3 β reduciendo la fosforilación de su efector río abajo CRMP2 (Proteína Mediadora de Respuesta a Colapsina 2). Esta proteína en estado desfosforilado se une a tubulina, promoviendo la formación de microtúbulos y estimulando el crecimiento del axón (Yoshimura y cols. 2005). GSK3 β y CRMP2 podrían tener entonces una particular importancia en la estabilidad del tronco dendrítico. Hay que destacar que la activación de receptores β -adrenérgicos se asocia a un aumento en la actividad de la vía PI3K (Chen y cols. 2007). Del mismo modo, la inhibición de la ERK quinasa (MEK) impide el aumento en la densidad de espinas dendríticas y la modificación del largo dendrítico de neuronas CA1 tras 24 horas de estimulación con BDNF en cultivos organotípicos hipocampales, mostrando la importancia de ERK1/2 en el control del largo dendrítico (Alonso y cols. 2004). Evaluar la participación de estas quinastas al igual que cambios en la actividad de la GSK podrá dar luces sobre las vías que participan en la morfología dendrítica. Del mismo modo, se deberá precisar si los cambios morfológicos observados en esta Tesis se deben o no a variaciones en los niveles de BDNF y acción a través de su receptor.

7.- RESUMEN

- Las neuronas hipocampales en cultivo son inmunoreactivas para el receptor β_2 adrenérgico.
- La presencia de clenbuterol 25 nM en cultivos hipocampales 7 DIV durante 24 horas no produjo cambios morfológicos, sugiriendo que este receptor no tiene incidencia sobre la morfología dendrítica.
- La estimulación de los cultivos hipocampales 7 DIV con noradrenalina 100 nM durante 5-15 minutos no modificó los niveles de fosforilación de CREB (Ser 133).
- La estimulación de cultivos neuronales 10 DIV con NA 100 nM (5 s) produjo un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelulares. Del mismo modo, estímulos de NA (10 s) sobre neuronas hipocampales 12 DIV logran disminuir la intensidad de las corrientes sinápticas espontáneas, lo que se relacionaría con una menor excitabilidad neuronal.
- La estimulación de cultivos hipocampales 7 DIV con NA 100 nM y propranolol 10 μ M durante 24 horas produce una disminución en el número de intersecciones y en el largo total en dendritas primarias. El número de dendritas y de puntos de ramificación no fue modificado. No se aprecian diferencias significativas frente a la adición de NA 100 nM o propranolol 10 μ M por separado respecto al control.

- La disminución del largo dendrítico observado frente a la incubación con NA 100 nM y propranolol 10 μ M se condice con un menor largo total de las dendritas primarias mayores a 40 μ m, y de las dendritas secundarias mayores a 20 μ m.
- La estimulación de cultivos hipocampales 7 DIV con Clenbuterol 25 nM y propranolol 10 μ M produce un aumento en el número de dendritas primarias de menor tamaño, acompañada de una disminución del largo promedio de las dendritas primarias y secundarias de mayor tamaño, sin mostrar modificaciones en el largo dendrítico total. Es posible que esta condición farmacológica estimule la aparición de dendritas adicionales de menor tamaño.
- La adición conjunta de NA y propranolol al medio de cultivo produciría una activación diferencial de los receptores adrenérgicos, que sería la responsable de las modificaciones observadas en la morfología dendrítica. Proponemos que esta acción se relacionaría con acciones opuestas sobre la morfología de los receptores α - y β_1 -adrenérgicos.

8.- CONSIDERACIONES DEL ESTUDIO

- El efecto de los agonistas adrenérgicos sobre la morfología dendrítica fue realizado a una temporalidad fija (24h). Hubiese sido importante contar con metodologías que nos permitieran observar la cinética de éstos.
- Los valores asignados para diferenciar las dendritas de mayor y menor tamaño (40 μm en dendritas primarias y 20 μm en dendritas secundarias) son una estrategia de estudio original del Laboratorio, relacionada con los valores de largo dendrítico promedio de las neuronas control. Si bien los resultados entregados de este modo son muy valiosos para esta Tesis, no es posible cotejarlos con otras metodologías descritas en la literatura.
- Menos del 50% de las neuronas observadas presentaron neuronas terciarias y/o cuaternarias, por lo que se decidió no expresar estos resultados.
- No se puede precisar si durante la incubación por 24 h con agonistas en ausencia y presencia de antagonistas ocurre desensibilización de receptores.
- Para precisar la participación de receptores $\alpha_{(1/2)}$ y β -adrenérgicos se deberían usar antagonistas específicos (prazosina, yohimbina, atenolol, ICI-118551) en presencia de NA.
- Independiente de los cambios morfológicos observados, no se puede precisar si ocurren por acción directa o indirecta de la NA. Si bien el número de glías fue controlado a través de la aplicación de inhibidor de mitosis, no es posible descartar la participación glial en los cambios morfológicos observados.

- No se midió la estabilidad de los fármacos durante las 24 horas que duró el estímulo.
- Los cambios fueron observados en cultivo primario de hipocampo a 7 DIV, estadio aún inmaduro. De acuerdo a esto, los experimentos deberían replicarse en un sistema funcionalmente maduro como lo son el uso de cortes de tejido o cultivos organotípicos.

9.- CONCLUSIONES

- La estimulación de cultivos hipocampales de rata con NA en períodos cortos (5-10 s) modifica la actividad neuronal. Esta modificación se observa a través de:
 - Un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+}
 - Una disminución de las corrientes sinápticas espontáneas

- La estimulación de cultivos hipocampales de rata con NA 100 nM posterior a la adición del antagonista β -adrenérgico (propranolol, 10 μM) en períodos largos (24 horas) modifica significativamente la arquitectura dendrítica. Esta modificación se observa a través de:
 - Una disminución en el número de intersecciones observadas en el análisis de Sholl
 - Una disminución del largo en las dendritas primarias

- La estimulación de cultivos hipocampales de rata con agonistas β_2 -adrenérgicos no modifica la arquitectura dendrítica

10. REFERENCIAS

- Alonso, M., J. H. Medina y L. Pozzo-Miller (2004). "ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons." Learn Mem **11**(2): 172-178.
- Aston-Jones, G., S. Chen, Y. Zhu y M. L. Oshinsky (2001). "A neural circuit for circadian regulation of arousal." Nat Neurosci **4**(7): 732-738.
- Banker, G. A. y W. M. Cowan (1979). "Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture." J Comp Neurol **187**(3): 469-493.
- Bernard, O. (2007). "Lim kinases, regulators of actin dynamics." Int J Biochem Cell Biol **39**(6): 1071-1076.
- Beyer, C. E., S. Boikess, B. Luo y L. A. Dawson (2002). "Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study." J Psychopharmacol **16**(4): 297-304.
- Blier, P. (2001). "Crosstalk between the norepinephrine and serotonin systems and its role in the antidepressant response." J Psychiatry Neurosci **26 Suppl**: S3-10.
- Booze, R. M., E. A. Crisostomo y J. N. Davis (1993). "Beta-adrenergic receptors in the hippocampal and retrohippocampal regions of rats and guinea pigs: autoradiographic and immunohistochemical studies." Synapse **13**(3): 206-214.
- Braunewell, K. H. y D. Manahan-Vaughan (2001). "Long-term depression: a cellular basis for learning?" Rev Neurosci **12**(2): 121-140.
- Bravo, J. A., G. Diaz-Veliz, S. Mora, J. L. Ulloa, V. M. Berthoud, P. Morales, S. Arancibia y J. L. Fiedler (2009). "Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection." Behav Pharmacol **20**(3): 273-285.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege y P. J. Price (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-576.
- Cohen, M. L., J. G. Granneman, A. Chaudhry, K. W. Schenck, D. J. Cushing y A. D. Palkowitz (1995). "Is the "atypical" beta-receptor in the rat stomach fundus the rat beta 3 receptor?" J Pharmacol Exp Ther **272**(1): 446-451.
- Cook, S. C. y C. L. Wellman (2004). "Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex." J Neurobiol **60**(2): 236-248.
- Cryan, J. F., O. F. O'Leary, S. H. Jin, J. C. Friedland, M. Ouyang, B. R. Hirsch, M. E. Page, A. Dalvi, S. A. Thomas y I. Lucki (2004). "Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8186-8191.

Culmsee, C., V. Junker, S. Thal, W. Kremers, S. Maier, H. J. Schneider, N. Plesnila y J. Krieglstein (2007). "Enantio-selective effects of clenbuterol in cultured neurons and astrocytes, and in a mouse model of cerebral ischemia." Eur J Pharmacol **575**(1-3): 57-65.

Chen, M. J., T. V. Nguyen, C. J. Pike y A. A. Russo-Neustadt (2007). "Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons." Cell Signal **19**(1): 114-128.

Danzer, S. C., K. R. Crooks, D. C. Lo y J. O. McNamara (2002). "Increased expression of brain-derived neurotrophic factor induces formation of basal dendrites and axonal branching in dentate granule cells in hippocampal explant cultures." J Neurosci **22**(22): 9754-9763.

Davare, M. A., V. Avdonin, D. D. Hall, E. M. Peden, A. Burette, R. J. Weinberg, M. C. Horne, T. Hoshi y J. W. Hell (2001). "A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Cav1.2." Science **293**(5527): 98-101.

Del Campo, N., S. R. Chamberlain, B. J. Sahakian y T. W. Robbins (2011). "The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder." Biol Psychiatry **69**(12): e145-157.

Dixon, W. R., W. F. Mosimann y N. Weiner (1979). "The role of presynaptic feedback mechanisms in regulation of norepinephrine release by nerve stimulation." J Pharmacol Exp Ther **209**(2): 196-204.

Docherty, J. R. (2010). "Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor." Cell Mol Life Sci **67**(3): 405-417.

Endo, M., K. Ohashi, Y. Sasaki, Y. Goshima, R. Niwa, T. Uemura y K. Mizuno (2003). "Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin." J Neurosci **23**(7): 2527-2537.

Fiedler, J. L., C. J. Epstein, S. I. Rapoport, R. Caviedes y P. Caviedes (1994). "Regional alteration of cholinergic function in central neurons of trisomy 16 mouse fetuses, an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome)." Brain Res **658**(1-2): 27-32.

Gelinas, J. N. y P. V. Nguyen (2007). "Neuromodulation of Hippocampal Synaptic Plasticity, Learning, and Memory by Noradrenaline." Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry **7**: 17-33.

Gilmor, M. L., M. J. Owens y C. B. Nemeroff (2002). "Inhibition of norepinephrine uptake in patients with major depression treated with paroxetine." Am J Psychiatry **159**(10): 1702-1710.

Gray, R. y D. Johnston (1987). "Noradrenaline and beta-adrenoceptor agonists increase activity of voltage-dependent calcium channels in hippocampal neurons." Nature **327**(6123): 620-622.

Guo, N. N. y B. M. Li (2007). "Cellular and subcellular distributions of beta1- and beta2-adrenoceptors in the CA1 and CA3 regions of the rat hippocampus." Neuroscience **146**(1): 298-305.

Hamdani, N. y J. van der Velden (2009). "Lack of specificity of antibodies directed against human beta-adrenergic receptors." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **379**(4): 403-407.

- Harley, C. (1991). "Noradrenergic and locus coeruleus modulation of the perforant path-evoked potential in rat dentate gyrus supports a role for the locus coeruleus in attentional and memorial processes." Prog Brain Res **88**: 307-321.
- Hoogland, T. M. y P. Saggau (2004). "Facilitation of L-type Ca²⁺ channels in dendritic spines by activation of beta2 adrenergic receptors." J Neurosci **24**(39): 8416-8427.
- Horch, H. W. (2004). "Local effects of BDNF on dendritic growth." Rev Neurosci **15**(2): 117-129.
- Jhaveri, D. J., E. W. Mackay, A. S. Hamlin, S. V. Marathe, L. S. Nandam, V. A. Vaidya y P. F. Bartlett (2010). "Norepinephrine directly activates adult hippocampal precursors via beta3-adrenergic receptors." J Neurosci **30**(7): 2795-2806.
- Joiner, M. L., M. F. Lise, E. Y. Yuen, A. Y. Kam, M. Zhang, D. D. Hall, Z. A. Malik, H. Qian, Y. Chen, J. D. Ulrich, A. C. Burette, R. J. Weinberg, P. Y. Law, A. El-Husseini, Z. Yan y J. W. Hell (2010). "Assembly of a beta2-adrenergic receptor--GluR1 signalling complex for localized cAMP signalling." EMBO J **29**(2): 482-495.
- Jones, L. S., L. L. Gauger y J. N. Davis (1985). "Anatomy of brain alpha 1-adrenergic receptors: in vitro autoradiography with [¹²⁵I]-heat." J Comp Neurol **231**(2): 190-208.
- Junker, V., A. Becker, R. Huhne, M. Zembatov, A. Ravati, C. Culmsee y J. Krieglstein (2002). "Stimulation of beta-adrenoceptors activates astrocytes and provides neuroprotection." Eur J Pharmacol **446**(1-3): 25-36.
- Juric, D. M., D. Loncar y M. Carman-Krzan (2008). "Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors." Neurochem Int **52**(1-2): 297-306.
- Langhammer, C. G., M. L. Previtara, E. S. Sweet, S. S. Sran, M. Chen y B. L. Firestein (2010). "Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales: Whole cell Sholl analysis versus Sholl analysis of arbor subregions." Cytometry A **77**(12): 1160-1168.
- Luttrell, L. M. y D. Gesty-Palmer (2010). "Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling." Pharmacol Rev **62**(2): 305-330.
- Magarinos, A. M., B. S. McEwen, G. Flugge y E. Fuchs (1996). "Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews." J Neurosci **16**(10): 3534-3540.
- Martin, S. J. y R. G. Morris (2002). "New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited." Hippocampus **12**(5): 609-636.
- Massana, J. (1998). "Reboxetine versus fluoxetine: an overview of efficacy and tolerability." J Clin Psychiatry **59 Suppl 14**: 8-10.
- McAllister, A. K., D. C. Lo y L. C. Katz (1995). "Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex." Neuron **15**(4): 791-803.

- Milner, T. A., A. Lee, S. A. Aicher y D. L. Rosin (1998). "Hippocampal alpha2a-adrenergic receptors are located predominantly presynaptically but are also found postsynaptically and in selective astrocytes." J Comp Neurol **395**(3): 310-327.
- Milner, T. A., P. Shah y J. P. Pierce (2000). "beta-adrenergic receptors primarily are located on the dendrites of granule cells and interneurons but also are found on astrocytes and a few presynaptic profiles in the rat dentate gyrus." Synapse **36**(3): 178-193.
- Moret, C. y M. Briley (2011). "The importance of norepinephrine in depression." Neuropsychiatr Dis Treat **7**(Suppl 1): 9-13.
- Morin, D., R. Sapena, R. Zini, B. Onteniente y J. P. Tillement (1997). "Characterization of beta-adrenergic receptors of freshly isolated astrocytes and neurons from rat brain." Life Sci **60**(4-5): 315-324.
- Murakami, S., H. Imbe, Y. Morikawa, C. Kubo y E. Senba (2005). "Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly." Neurosci Res **53**(2): 129-139.
- Nakagawa, T., M. Ono-Kishino, E. Sugaru, M. Yamanaka, M. Taiji y H. Noguchi (2002). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice." Diabetes Metab Res Rev **18**(3): 185-191.
- Nestler, E. J., M. Alreja y G. K. Aghajanian (1999). "Molecular control of locus coeruleus neurotransmission." Biol Psychiatry **46**(9): 1131-1139.
- O'Dell, T. J., S. A. Connor, J. N. Gelinas y P. V. Nguyen (2010). "Viagra for your synapses: Enhancement of hippocampal long-term potentiation by activation of beta-adrenergic receptors." Cell Signal **22**(5): 728-736.
- Ordway, G. A., P. S. Widdowson, K. S. Smith y A. Halaris (1994). "Agonist binding to alpha 2-adrenoceptors is elevated in the locus coeruleus from victims of suicide." J Neurochem **63**(2): 617-624.
- Papakostas, G. I., J. C. Nelson, S. Kasper y H. J. Moller (2008). "A meta-analysis of clinical trials comparing reboxetine, a norepinephrine reuptake inhibitor, with selective serotonin reuptake inhibitors for the treatment of major depressive disorder." Eur Neuropsychopharmacol **18**(2): 122-127.
- Papakostas, G. I., M. E. Thase, M. Fava, J. C. Nelson y R. C. Shelton (2007). "Are antidepressant drugs that combine serotonergic and noradrenergic mechanisms of action more effective than the selective serotonin reuptake inhibitors in treating major depressive disorder? A meta-analysis of studies of newer agents." Biol Psychiatry **62**(11): 1217-1227.
- Pieribone, V. A., A. P. Nicholas, A. Dagerlind y T. Hokfelt (1994). "Distribution of alpha 1 adrenoceptors in rat brain revealed by in situ hybridization experiments utilizing subtype-specific probes." J Neurosci **14**(7): 4252-4268.
- Pittenger, C. y R. S. Duman (2008). "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms." Neuropsychopharmacology **33**(1): 88-109.
- Popko, J., A. Fernandes, D. Brites y L. M. Lanier (2009). "Automated analysis of NeuronJ tracing data." Cytometry A **75**(4): 371-376.

- Prange, A. J., Jr. (1964). "The Pharmacology and Biochemistry of Depression." Dis Nerv Syst **25**: 217-221.
- Rainbow, T. C., B. Parsons y B. B. Wolfe (1984). "Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(5): 1585-1589.
- Raman, I. M., G. Tong y C. E. Jahr (1996). "Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase." Neuron **16**(2): 415-421.
- Rao, A., E. Kim, M. Sheng y A. M. Craig (1998). "Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture." J Neurosci **18**(4): 1217-1229.
- Reuter, H. (1995). "Measurements of exocytosis from single presynaptic nerve terminals reveal heterogeneous inhibition by Ca(2+)-channel blockers." Neuron **14**(4): 773-779.
- Reznikoff, G. A., S. Manaker, C. H. Rhodes, A. Winokur y T. C. Rainbow (1986). "Localization and quantification of beta-adrenergic receptors in human brain." Neurology **36**(8): 1067-1073.
- Ristanovic, D., N. T. Milosevic y V. Stulic (2006). "Application of modified Sholl analysis to neuronal dendritic arborization of the cat spinal cord." J Neurosci Methods **158**(2): 212-218.
- Sapan, C. V., R. L. Lundblad y N. C. Price (1999). "Colorimetric protein assay techniques." Biotechnol Appl Biochem **29 (Pt 2)**: 99-108.
- Scheiderer, C. L., L. E. Dobrunz y L. L. McMahon (2004). "Novel form of long-term synaptic depression in rat hippocampus induced by activation of alpha 1 adrenergic receptors." J Neurophysiol **91**(2): 1071-1077.
- Schubert, V. y C. G. Dotti (2007). "Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture." J Cell Sci **120**(Pt 2): 205-212.
- Schwartz, P. M., P. R. Borghesani, R. L. Levy, S. L. Pomeroy y R. A. Segal (1997). "Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning." Neuron **19**(2): 269-281.
- Semkova, I., M. Schilling, P. Henrich-Noack, A. Rami y J. Krieglstein (1996). "Clenbuterol protects mouse cerebral cortex and rat hippocampus from ischemic damage and attenuates glutamate neurotoxicity in cultured hippocampal neurons by induction of NGF." Brain Res **717**(1-2): 44-54.
- Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." J Anat **87**(4): 387-406.
- Silva-Gomez, A. B., D. Rojas, I. Juarez y G. Flores (2003). "Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats." Brain Res **983**(1-2): 128-136.
- Smith, M. A., S. Makino, R. Kvetnansky y R. M. Post (1995). "Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus." J Neurosci **15**(3 Pt 1): 1768-1777.

Spreng, M., S. Cotecchia y F. Schenk (2001). "A behavioral study of alpha-1b adrenergic receptor knockout mice: increased reaction to novelty and selectively reduced learning capacities." Neurobiol Learn Mem **75**(2): 214-229.

Tanda, G., R. Frau y G. Di Chiara (1996). "Chronic desipramine and fluoxetine differentially affect extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex." Psychopharmacology (Berl) **127**(2): 83-87.

Tolwani, R. J., P. S. Buckmaster, S. Varma, J. M. Cosgaya, Y. Wu, C. Suri y E. M. Shooter (2002). "BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus." Neuroscience **114**(3): 795-805.

Tzingounis, A. V., M. von Zastrow y G. A. Yudowski (2010). "{Beta}-blocker drugs mediate calcium signaling in native central nervous system neurons by {beta}-arrestin-biased agonism." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(49): 21028-21033.

Vogt, M. (1954). "Norepinephrine and epinephrine in the central nervous system." Pharmacol Rev **6**(1): 31-32.

Vyas, A., R. Mitra, B. S. Shankaranarayana Rao y S. Chattarji (2002). "Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons." J Neurosci **22**(15): 6810-6818.

Winder, D. G., K. C. Martin, I. A. Muzzio, D. Rohrer, A. Chruscinski, B. Kobilka y E. R. Kandel (1999). "ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors." Neuron **24**(3): 715-726.

Witte, H., D. Neukirchen y F. Bradke (2008). "Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization." J Cell Biol **180**(3): 619-632.

Yildirim, M., W. G. Janssen, N. E. Tabori, M. M. Adams, G. S. Yuen, K. T. Akama, B. S. McEwen, T. A. Milner y J. H. Morrison (2008). "Estrogen and aging affect synaptic distribution of phosphorylated LIM kinase (pLIMK) in CA1 region of female rat hippocampus." Neuroscience **152**(2): 360-370.

Yoshimura, T., Y. Kawano, N. Arimura, S. Kawabata, A. Kikuchi y K. Kaibuchi (2005). "GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity." Cell **120**(1): 137-149.

Zhang, X. H., X. F. Zhang, J. Q. Zhang, Y. M. Tian, H. Xue, N. Yang y J. X. Zhu (2008). "Beta-adrenoceptors, but not dopamine receptors, mediate dopamine-induced ion transport in late distal colon of rats." Cell Tissue Res **334**(1): 25-35.