

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“EFECTO DEL BLOQUEO DE RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS EN LA
POTENCIACIÓN SINÁPTICA INDUCIDA EN LA CORTEZA OCCIPITAL DE LA
RATA ADULTA POR ESTIMULACIÓN DE FIBRAS CALLOSALES”

OSVALDO ANDRES FLORES BASTIAS.

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUIA: DR. ALEJANDRO HERNANDEZ KUNSTMANN.

SANTIAGO, CHILE
2004

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“EFECTO DEL BLOQUEO DE RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS EN LA
POTENCIACIÓN SINÁPTICA INDUCIDA EN LA CORTEZA OCCIPITAL DE LA
RATA ADULTA POR ESTIMULACIÓN DE FIBRAS CALLOSALES”

OSVALDO ANDRES FLORES BASTIAS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA: DR. ALEJANDRO HERNANDEZ KUNSTMANN
PROFESOR CONSEJERO: DR. RUBEN SOTO-MOYANO
PROFESOR CONSEJERO: DR. RICARDO OLIVARES PEREZ-MONTT

SANTIAGO, CHILE
2004

INDICE

I. Introducción.....	1
II. Revisión Bibliográfica.....	3
1-. Memoria y aprendizaje.....	3
2-. Plasticidad Neuronal.....	4
3-. Potenciación de largo plazo.....	5
3.1-. Mecanismo celular y molecular de la potenciación de largo plazo.....	6
4-. Receptores, Neurotransmisores que participan en la potenciación de largo plazo.....	9
4.1 Receptores.....	9
4.1.1. Receptor NMDA.....	9
4.1.2 Receptores AMPA y Kainato.....	12
4.1.3 Metabotrópicos.....	12
4.1.4 Receptor β - adrenérgicos.....	13
4.2. Neurotransmisores.....	14
4.2.1 Glutamato.....	14
4.2.2. Noradrenalina.....	16
5-. Aspectos fisiológicos del propanolol.....	17
III. Objetivos.....	18
1-. Objetivo general.....	18
2-. Objetivos específicos.....	18
IV. Materiales y Métodos.....	19
1-. Materiales.....	19
1.1-. Animales.....	19
1.2-. cirugía y procedimiento de estimulación y registro.....	19
1.3-. Fármacos.....	22
1.4-. Instrumentos de inoculación.....	22
2-. Métodos.....	22
2.1-. inducción y evaluación de la potenciación de largo plazo.....	22
2.2-. Grupos experimentales.....	23
2.3-. Expresión de resultados.....	23
2.4-. Análisis estadístico utilizado.....	23

V. Resultados.....	24
1-. Curso temporal del efecto de la administración de propanolol.....	24
2-. Obtención de la DE ₅₀ de propanolol.....	24
VI. Discusión.....	29
VII. Conclusiones.....	32
VIII. Bibliografía.....	33

RESUMEN

Existen evidencias que el propanolol inhibe la potenciación sináptica de largo plazo en rebanadas de hipocampo, sugiriendo que este compuesto deprime la transducción de señales dependiente de la activación del receptor β -adrenérgico. En la corteza occipital, se ha descrito también el fenómeno de la potenciación sináptica de largo plazo, caracterizado por un aumento progresivo en la actividad de las neuronas piramidales, el cual puede ser evocado por estimulación de alta frecuencia de la fibra neuronal. La potenciación sináptica occipital, al igual que en el hipocampo, depende principalmente de receptores NMDA, pero además se ha visto una importante acción de los receptores β -adrenérgicos. Se estudió el efecto de la administración intraperitoneal de propanolol en la potenciación de largo plazo occipital de la rata. Ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley de 150-300 g. fueron anestesiadas con uretano (1.5 g/Kg de peso vivo). La estimulación consistió en pulsos simples de onda cuadrada de 100 μ s de duración, 0.2 Hz y de intensidad creciente (entre 50 y 200 μ A), con el objeto de determinar la máxima amplitud asintótica de las respuestas evocadas contralaterales. La potenciación de largo plazo se indujo aplicando un tren tetanizante de ondas rectangulares monofásicas de 500 ms de duración, 312 Hz, y una intensidad 50% mayor que la necesaria para obtener respuestas basales. Los resultados muestran que propanolol (1, 2.5; 2.5 y 5.0 mg/kg i.p.), indujo una inhibición dosis-dependiente de la potenciación sináptica de largo plazo. Esta observación indica que propanolol es capaz de interferir a nivel cortical con el componente noradrenérgico mediado por receptores beta en la potenciación de largo plazo. Dado que la potenciación sináptica es el principal fenómeno que sustenta los mecanismos centrales involucrados en el desarrollo de la memoria y el aprendizaje, el presente estudio puede contribuir a futuras aplicaciones clínicas, en situaciones de estrés crónico y/o malnutrición perinatal donde ocurren cambios en la disponibilidad de noradrenalina central y/o en la densidad de sus receptores, en donde la activación de los receptores β -adrenérgicos podría ser insuficiente comprometiendo procesos de memoria y aprendizaje. En este sentido, tal vez parte de los esfuerzos terapéuticos futuros para el tratamiento de estos desórdenes deberían estar dirigidos hacia la corrección farmacológica de los niveles endógenos de noradrenalina central con el objeto de paliar los déficits de aprendizaje y memoria que acompañan a estos cuadros crónicos.

SUMMARY

It has been reported that propranolol inhibits hippocampal long-term potentiation, suggesting that this composite depresses the transduction of signals that depends on the activation of the β -adrenoceptors. In the occipital cortex, has also been described the phenomenon of the long term potentiation, characterized for a progressive increase in the activity of the pyramidal neurons, which can be evoked for stimulation of high frequency of the neuronal fiber. The occipital synaptic potentiation, just as in the hippocampus, depends principally of NMDA receptors, but moreover has seen an important action of the β -adrenoceptors. It has been studied the effect of the intraperitoneal administration of propranolol in the long term potentiation of the occipital cortex of the rat. were studied. Sprague-Dawley rats weighing 150-300 g were anesthetized with urethane (1,5 g/Kg body weight). The stimulation consisted in simple pulses of square wave of 100 μ s of duration, 0.2 Hz and of growing intensity (between 50 and 200 μ A) with the object of deciding the maximum asymptotic amplitude of the contralaterals answers evoked. The long term potentiation was induced by applying a tetanic train of rectangular waves of single-phase of 500 ms of duration, 312 Hz, and an intensity 50% major that the privy to obtain basal answers. The results show that propranolol (1,25; 2,5 and 5,0 Mg/kg i.p.), induced dose-dependent inhibition of long term potentiation activity . This indicates that propranolol is able to interfere with the noradrenergic-mediated β -adrenoceptors component of the long term potentiation in the occipital cortex. . Since long term potentiation is the principal phenomenon underlying central mechanisms for the development of the memory and the learning, the present studies can contribute to future clinical applications, in situations of chronic stress and/or in perinatal malnutrition where occur changes in the availability for service of central noradrenaline and/or in the density of his receptors, where the activation of the β - adrenoceptores could be insufficient compromising processes of memory and learning. In this sense, perhaps part of the therapeutic future efforts for the treatment of these disorders must be directed towards the pharmacological correction of the endogenous levels of central noradrenaline|with the object of palliating the deficits of learning and memory that accompanies these chronic squares.

I. INTRODUCCION

Hasta hoy se conoce poco sobre los mecanismos neuronales del aprendizaje y memoria. Se sabe que están implicadas simultáneamente diversas porciones de la corteza cerebral, el tálamo, el sistema límbico, y la formación reticular del tronco encefálico. Probablemente algunos aprendizajes primitivos dependan sólo de centros inferiores, tales como las memorias del dolor. Por el contrario, la mayor parte de los aprendizajes visuales requieren de una corteza cerebral indemne.

Fisiológicamente, un recuerdo es originado por una variación en la capacidad de transmisión sináptica de una neurona a la siguiente, esto como resultado de una actividad previa neuronal. A su vez estos cambios o variaciones hacen que se desarrollen nuevas vías o vías facilitadas de transmisión de señales a través de los circuitos neuronales del encéfalo.

Existen numerosas razones para creer que los procesos de la memoria y el aprendizaje se basan en esta propiedad que tienen las células nerviosas de variar, de reorganizar sus conexiones sinápticas y modificar su bioquímica. Esta capacidad de cambios es denominada como plasticidad neuronal.

En estos procesos de memoria y aprendizaje que se desarrollan en la corteza cerebral y otras estructuras subcorticales, están involucrados una gran variedad de factores, entre estos, algunos externos como la nutrición y el ambiente, y otros internos, como la propiedad sináptica llamada potenciación de largo plazo. Esta propiedad sináptica se considera hoy como uno de los modelos más útiles de plasticidad neuronal.

En general, existe consenso en definir a la potenciación de largo plazo como un incremento de larga duración en la eficacia sináptica, que puede ser inducida por actividad sináptica repetitiva. La potenciación de largo plazo desde que fue descubierta en los años 70, ha sido estudiada preferentemente en el hipocampo, aunque también se conoce su existencia en la corteza cerebral y otras regiones del cerebro.

La investigación de las bases celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria ha tenido un enorme impulso en la década pasada y constituye una de las áreas de investigación más activas de la neurobiología de nuestros días.

Diferentes estudios *"in vitro"*, señalan que la noradrenalina facilita la potenciación de largo plazo; este efecto beneficioso de noradrenalina se ejerce vía receptores β -adrenérgicos, ya que es revertido por antagonistas β -adrenérgicos. Otra clase de receptores del sistema noradrenérgico, los receptores α , también están involucrados en el proceso de la potenciación de largo plazo, pero en este caso su activación produce efectos contrarios a la activación a los receptores β , llevando a una disminución e incluso a la inhibición de esta propiedad sináptica.

En esta memoria de título se estudió *"in vivo"*, el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos sobre la potenciación de largo plazo inducida en la corteza cerebral de la rata por estimulación de fibras aferentes callosales.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. Memoria y Aprendizaje.

Los esfuerzos encaminados a descubrir el sustrato molecular de la memoria, dieron sus primeros frutos a partir de la publicación del célebre libro del doctor Donald Hebb (1958): “La Organización del Comportamiento”. En dicho texto, fue postulado por primera vez que las sinapsis no eran inmodificables sino que, por el contrario, existían mecanismos por medio de los cuales eran fortalecidas, y ello sentó las bases de la moderna teoría de la plasticidad neuronal. Trabajos realizados en las últimas décadas, tanto en modelos animales, en rebanadas de tejido cerebral, como en cultivos de células nerviosas, han permitido concluir que la memoria es almacenada en las sinapsis, y para formar nuevos recuerdos es necesario modificar las existentes incrementando su eficiencia según los postulados de Hebb, o bien establecer nuevas conexiones entre células vecinas. Se puede por lo tanto concluir que los neurotransmisores, además de las respuestas eléctricas, son también capaces de inducir cambios estructurales en las neuronas. En el caso de la memoria, el principal mediador de estos procesos es el neurotransmisor glutamato, que interactúa con varios tipos de moléculas receptoras.

Desde un punto de vista fisiológico, los procesos cognitivos son originados por cambios en la capacidad de transmisión sináptica de una neurona a la siguiente, como resultado de variaciones de la actividad previa. Estos cambios, a su vez, hacen que se desarrollen nuevas vías o vías facilitadas de transmisión de señales a través de los circuitos neuronales del encéfalo implicados en la memoria y el aprendizaje (Guyton y Hall, 1997).

Se sabe que algunos recuerdos duran tan solo unos segundos y otros duran horas, días, meses o años. Una explicación de la memoria a corto plazo es la potenciación sináptica, que puede facilitar la conducción sináptica (Guyton y Hall, 1997). En contraste, se cree que la memoria a largo plazo es el resultado de alteraciones estructurales reales en las sinapsis, consecutivas a cambios químicos, que facilitan o suprimen la conducción de señales (Guyton y Hall, 1997).

A pesar de que aún son desconocidos los mecanismos celulares y moleculares del aprendizaje y de la memoria, se acepta que estos procesos se relacionan en alto grado con fenómenos de plasticidad neuronal.

El estudio de la potenciación de largo plazo ha despertado especial interés no sólo como una de las principales expresiones de plasticidad, sino que también por su relación con el aprendizaje y la memoria, problemática que es abordable experimentalmente. De la plasticidad neuronal depende la memoria, el aprendizaje y las modificaciones del comportamiento para adaptarse a un medio ambiente cambiante. Además, la plasticidad neuronal está implicada en la recuperación funcional después de cualquier lesión cerebral.

Las formas o tipos de memoria son procesos en que puede haber reconocimiento sensorial de algo (de un objeto, de una cara), en el marco de un determinado tipo de información (auditiva, olfativa o visual), pero también otras memorias se pueden relacionar a aprendizajes motores (habilidades motoras), emocionales (miedo), o a aprendizajes ligados a formas de razonamiento (aprender a multiplicar, por ejemplo).

Se ha visto que regiones corticales, tanto del sector frontal como occipital de la corteza, presentan propiedades de potenciación de largo plazo, las que se relacionarían directamente con el proceso de consolidación de la memoria, esto es el paso de la memoria desde un estado lábil a un estado más permanente (Vickery *et al*, 1997; Volgushev *et al*, 1999).

Estudios recientes han establecido que el entrenamiento en una tarea refuerza conexiones sinápticas en áreas de la corteza relacionadas con dicha actividad, y que este reforzamiento sináptico se produce a través de la inducción de potenciación de largo plazo cortical (Rioult-Pedotti *et al*, 1998 y Rioult-Pedotti *et al*, 2000).

2. Plasticidad neuronal.

Hace más de 30 años fueron descubiertos los principios de la plasticidad neuronal, cuando Bliss y Lomo (1973) fueron capaces de poner en evidencia que la potenciación de largo plazo es el mecanismo fundamental del aprendizaje y memoria.

Hoy se sabe que la estructura de las neuronas y del sistema nervioso está determinada genéticamente y que, además, su desarrollo puede ser modificado por otros factores distintos, epigenéticos, como es la influencia de otras células y sus conexiones, o por requerimientos ambientales. Se dice que el sistema nervioso es plástico ya que, en efecto, puede modificar su estructura y función. Uno de los niveles funcionales donde la plasticidad se muestra en forma indiscutida, es el sináptico. A este nivel, dos fenómenos son considerados expresión importante de la plasticidad sináptica: la potenciación de largo plazo y la depresión de largo plazo; también el “wind up”, una forma de potenciación sináptica del dolor a nivel espinal, se considera un fenómeno plástico.

Se cree que la plasticidad sináptica es el mecanismo celular que está en la base del almacenamiento de información, en forma de memoria, en el cerebro de los mamíferos. Esta noción es consistente con la evidencia creciente que la corteza sensorial primaria permanece plástica en la madurez, y que los mecanismos de potenciación de largo plazo pueden contribuir a esta plasticidad (Arnold, et al 2001).

También está claro que, sin tener en cuenta la edad, la plasticidad cortical experiencia-dependiente puede tener un impacto funcional importante en el procesamiento sensorial (Weinberger, 1995; Buonomano y Merzenich, 1998). En relación a la corteza visual, se ha descrito que los mecanismos de potenciación de largo plazo contribuyen a la adquisición experiencia-dependiente de sensibilidad visual durante el periodo crítico (Bear et al., 1987; Frégnac y Shulz, 1994; Singer, 1995). En efecto, se ha establecido que la capa II/III es un sitio de plasticidad sináptica robusta en la corteza visual adulta (Kirkwood y Bear, 1994).

Esta plasticidad es prontamente inducida en los adultos (McLean y Palmer, 1998), aunque los sistemas intracelulares de segundos mensajeros que participan en la plasticidad sináptica en la corteza visual tienen una relevancia mayor durante un periodo crítico temprano de la vida postnatal (Dudek y Bear, 1989).

3. Potenciación de largo plazo.

A partir de los trabajos de Bliss y Lomo (1973), la potenciación de largo plazo se ha descrito en diferentes tipos de sinapsis. Ellos demostraron que un estímulo breve pero de alta frecuencia sobre la vía perforante, entrada al giro dentado en el hipocampo, producía un aumento duradero de los potenciales locales registrados extracelularmente en la región CA₃.

Dichos investigadores describieron el aumento de la eficiencia sináptica con la estimulación eléctrica repetitiva. Así, aquellas sinapsis inicialmente débiles modifican su arquitectura después de ser sometidas a estímulos de alta frecuencia, de tal forma que en etapas subsiguientes transmiten los impulsos nerviosos en una forma más intensa. Dicho fenómeno ha recibido el nombre de potenciación de largo plazo (LTP, siglas del inglés **Long Term Potentiation**) y constituye un proceso compartido por toda la escala zoológica.

Esta propiedad sináptica se considera hoy como uno de los modelos más útiles de plasticidad neuronal. En general, existe consenso en definir a la potenciación de largo plazo como un incremento de larga duración en la eficacia sináptica, que puede ser inducida por actividad sináptica repetitiva (Brown *et al.*, 1988). Los mecanismos de transducción de señales que conducen al desarrollo de la potenciación sináptica de largo plazo, han sido descritos a nivel hipocampal por Malenka y Nicoll (1999) y en la corteza cerebral y otras áreas del cerebro por Bennett (2000).

3.1. Mecanismo celular y molecular de la potenciación de largo plazo.

En estado basal, los canales iónicos de los receptores NMDA permanecen cerrados y bloqueados por una molécula de magnesio y, para ser activados, debe ocurrir una secuencia de fenómenos que se inicia con la despolarización neuronal dependiente de otros receptores. El cambio de potencial eléctrico de la membrana hace que el magnesio sea desplazado del sitio activo y así, las moléculas de glutamato procedentes de la terminal presináptica estimulan al receptor NMDA y se abren los canales que permiten el ingreso de calcio y sodio (Kandel, 2001).

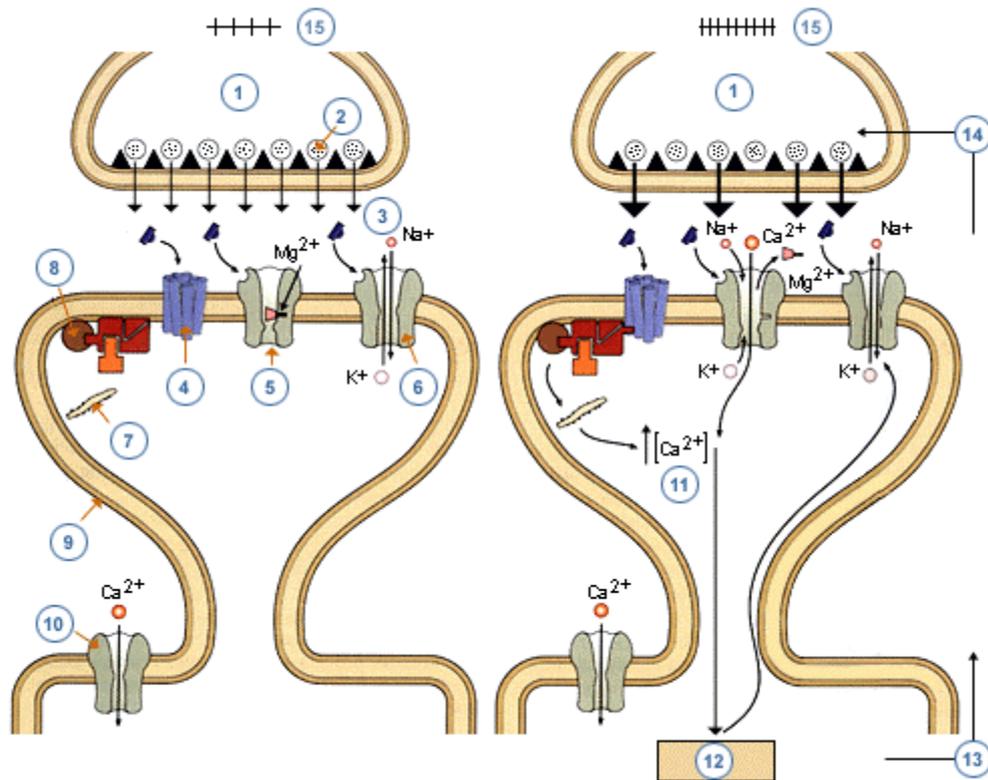
Una vez dentro de la célula, el ión calcio actúa como segundo mensajero para la activación de diversas enzimas tales como la proteína quinasa calcio/fosfolípido dependiente (PKC), la proteína quinasa calcio/calmodulina dependiente (CaMKII) y una tirosina quinasa calcio dependiente (TrK). El calcio también puede activar a la adenilciclase, enzima que cataliza la síntesis de AMPc, el que a su vez activa la proteína quinasa PKA. Como resultado de la activación de estas diversas proteínas kinasas, se promueve la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares y algunas kinasas son translocadas al interior de núcleo (Kandel, 2001). Una vez allí, modifican diversos sustratos, en particular las moléculas de la familia de factores de transcripción CREB.

Existen dos variedades de tales factores: CREB2 que actúan como represor de la transcripción y permanece activo en estado basal, y CREB1, con efecto estimulante y que se encuentra inhibido en condiciones de reposo. Las kinasas bloquean la acción de CREB2 y activan el factor CREB1, lo que a su vez permite que los elementos de respuesta al AMP cíclico promuevan la transcripción temprana de ciertos genes (Kandel, 2001).

Se ha comprobado que el óxido nítrico, un mediador que resulta de la activación de CaMKII, se encuentra en neuronas de diversas zonas del encéfalo, como el hipocampo, y que este mediador es fundamental para el desarrollo de potenciación de largo plazo.

En efecto, las drogas que bloquean a la enzima óxido nítrico sintasa, y por tanto la formación de óxido nítrico, impiden el establecimiento de la potenciación de largo plazo en rebanadas de hipocampo; de igual modo, la potenciación de largo plazo es bloqueada por sustancias químicas que capturan el óxido nítrico presente en el fluido intersticial.

Mecanismo de la potenciación de largo plazo.



1. Parte presináptica, 2. Vesículas glutamatérgicas, 3. Moléculas del neurotransmisor glutamato, 4. Receptor metabotrópico, 5. Receptor a NMDA (canal de calcio), 6. Receptor no-NMDA, 7. Retículo endoplásmico, 8. Sistema generador de 2º mensajero, 9. Espina dendrítica, 10. Canal de calcio regulado por voltaje, 11. Concentración de calcio en la espinna dendrítica, 12. Quinasas dependientes de calcio, 13. Sistema de generación de mensajeros retrógrados (NO, CO), 14. Terminal nervioso hipersecretor, 15. Frecuencia de potenciales de acción que invaden el terminal (adaptado de www.uc.cl)

Figura 1: Cuando se aumenta la intensidad del estímulo y la membrana sináptica es claramente despolarizada (condiciones de estimulación conducentes a potenciación de largo plazo) se anula el bloqueo del receptor NMDA que mantiene el ión magnesio. Esta situación permite mayor entrada de Na^+ y de Ca^{2+} y salida de K^+ por esos canales. El resultado neto de esos efectos es el aumento del Ca^{2+} en la parte dendrítica, lo cual activa a quinasas dependientes de Ca^{2+} como la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina y la proteína quinasa C. Una de esas quinasas, una isoforma de la proteína quinasa C, queda persistentemente activa. Así queda inducido el estado de potenciación de largo plazo, por despolarización, por entrada de Ca^{2+} y también por la activación por Ca^{2+} de la formación de segundos mensajeros retrógrados. En relación a este último factor se ha propuesto que al activarse la parte postsináptica, se generan en ella moléculas como el óxido nítrico o el monóxido de carbono los cuales fluyen a la parte presináptica, de ahí el nombre de mensajeros retrógrados. Estos mensajeros provocarían en la parte presináptica la activación de proteínas quinasas que mantendrían aumentada la liberación del neurotransmisor glutamato, estimulando y manteniendo la potenciación.

4. Receptores, neurotransmisores que participan en la potenciación sináptica de largo plazo.

Se ha comprobado que existen más de 50 sustancias químicas que funcionan como transmisores sinápticos. Se describen dos grupos de estos neurotransmisores. Uno de estos comprende los transmisores de molécula pequeña y acción rápida. El otro está integrado por numerosos neuropéptidos cuya molécula es mucho mayor y su acción es mucho más lenta (Guyton y Hall, 1997).

Los transmisores de moléculas pequeñas y acción rápida son los que originan la mayoría de las respuestas inmediatas del sistema nervioso, como son la transmisión de las señales sensoriales al cerebro y de las señales motoras a los músculos. Por otro lado, los neuropéptidos, suelen producir efectos más prolongados, tales como cambios en el número de iones y, posiblemente también, cambios a largo plazo en el número de sinapsis y en el tamaño de éstas (Guyton y Hall, 1997).

Existen diversos elementos involucrados en la potenciación de largo plazo. Dentro de estos destacan el receptor NMDA, los receptores no-NMDA, además de los receptores β -adrenérgicos, entre otros. Respecto a los neurotransmisores, se ha establecido que el glutamato cumple un rol fundamental, aunque también la noradrenalina participa en este fenómeno de plasticidad neuronal.

4.1. Receptores.

4.1.1 El receptor NMDA

Probablemente existen más estudios sobre los receptores de tipo NMDA que sobre cualquier otro receptor en el sistema nervioso. La razón es que los receptores NMDA, además de ser muy abundantes en el sistema nervioso, están implicados en numerosas funciones cerebrales, tales como el aprendizaje y la memoria, en los mecanismos de muerte neuronal, y en enfermedades como la epilepsia.

El receptor NMDA pertenece a una de las tres familias receptores ionotrópicos para glutamato, junto al receptor AMPA y al receptor de kainato.

Estos receptores fueron primero descritos por sus características farmacológicas y posteriormente por su biología molecular (Meldrum, 2000). Estas tres clases de receptores ionotrópicos para el glutamato son complejos macromoleculares que contienen tres dominios transmembranales denominados M1, M3 y M4 y una porción reentrante en la membrana, el dominio M2, que confiere las distintas selectividades iónicas del canal (Bigge, 1999).

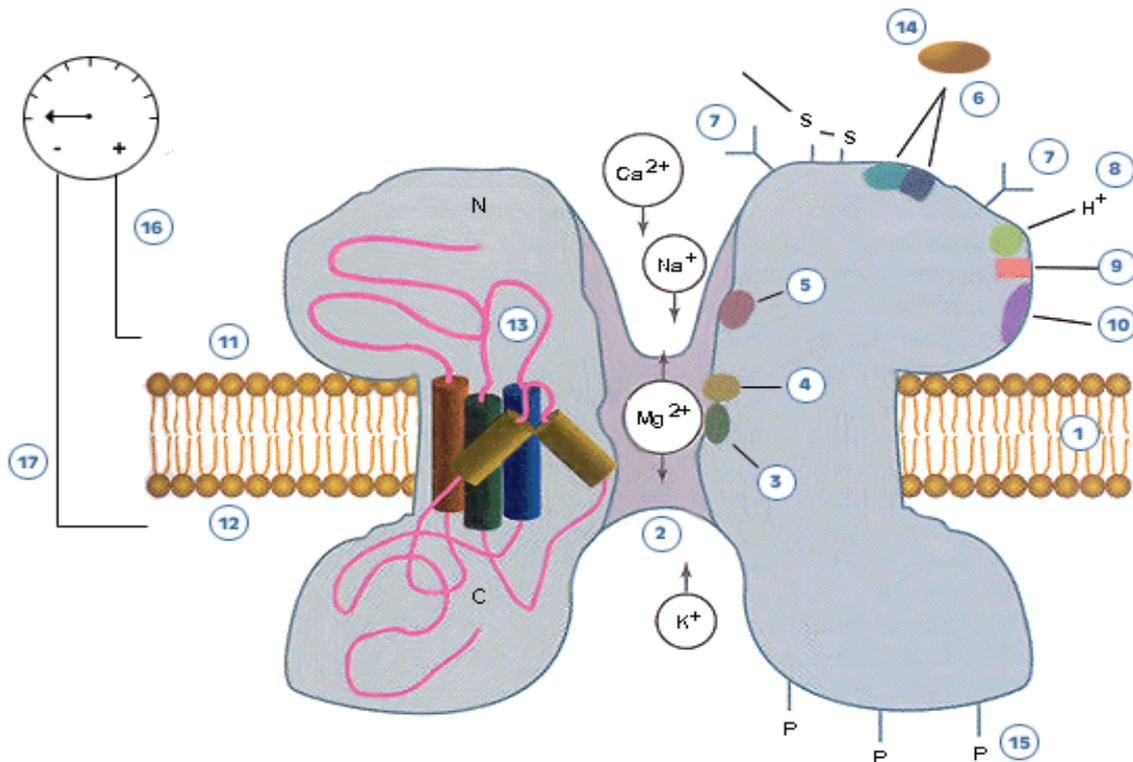
En lo que respecta al receptor de NMDA, este puede ser considerado como una estructura heteromérica con dos tipos de subunidad, la denominada subunidad NR1 y una de cuatro subunidades NR2 (NR2-A-NR2D) (Seeburg , 1993). La estimulación de los receptores de NMDA es responsable del incremento el calcio intracelular (Castillo, 2000). Se ha demostrado que la presencia del receptor NMDA en el espacio sináptico es un prerrequisito para la plasticidad cerebral; como se ha señalado anteriormente, el canal del receptor NMDA no solamente es permeable a sodio y a potasio, también es permeable a calcio y bloqueado por magnesio (Seeburg *et al*, 2001; Czuczwar, 2000).

A los receptores de NMDA se los relaciona además con la mediación de reflejos polisinápticos que participan en el incremento progresivo de la excitabilidad neuronal por estimulación nociceptiva repetitiva de las vías aferentes (fibras C), fenómeno conocido como "wind-up", el cual probablemente media diferentes estados hiperalgésicos asociados con la inflamación y la neuropatía periférica (Sundstrom *et al*,1997).

Los antagonistas de los receptores NMDA y los bloqueadores del canal de este receptor muestran una serie de efectos opuestos a los de los agonistas, la mayoría de los cuales son predecibles para los roles fisiológicos de los receptores de NMDA: alteraciones del aprendizaje, ataxia, miorelajación y sedación; también han sido reportados efectos psicomiméticos. Los moduladores de los receptores NMDA tienen un potencial terapéutico en entidades como la drogo-dependencia, epilepsia, enfermedad de Parkinson, accidentes vasculares cerebrales, dolor.

Recientemente se ha hipotetizado una posible alteración en la maduración de los receptores de NMDA, la cual conduciría a los síntomas sicóticos de la esquizofrenia (Trist, 2000; Ruppin, 2000).

Receptor NMDA.



1.Membrana plasmática, 2.Canal iónico bloqueado por Mg^{2+} en el sitio de bloqueo (4) , 3.Sitio de bloqueo por Mg^{2+} , 4.Sitio de unión a compuestos alucinógenos, 5.Sitio de unión al Zn^{2+} , 6.Sitio de unión a ligandos agonistas (glutamato) y/o a ligandos antagonistas (APV), 7.Sitios de glicosilación, 8.Sitios de unión a protones, 9.Sitios de unión a glicina, Sitios de unión a poliaminas, 10.Espacio extracelular, 11.Espacio intracelular, 12.Subunidad del complejo. 13.Glutamato (neurotransmisor), 14.Sitios de fosforilación, 15.Electrodo extracelular, 16.Electrodo Intracelular (adaptado de www.uc.cl).

FIG 2: El receptor NMDA es el más estudiado por la importancia funcional que ha demostrado tener. Contiene un canal iónico para el ion calcio (Ca^{+2}); presenta, además del sitio de unión al glutamato, otros sitios donde se unen el ion zinc (Zn^{+2}), barbitúricos, esteroides, drogas como las benzodiazepinas y otros compuestos. Normalmente, cuando la célula esta en reposo, este receptor-canal se encuentra bloqueado por la presencia del ion magnesio (Mg^{+2}). Cuando la célula se despolariza, ese ion sale del canal, haciéndole permeable principalmente al calcio.

4.1.2 Los receptores AMPA y Kainato.

Las subunidades del receptor de AMPA, son derivadas de una familia de 4 genes denominados GLUR1-GLUR4 (Healy y Meador-Woodruff, 2000). Se ha demostrado que los receptores de AMPA en las sinapsis glutamatérgicas median la transmisión de baja frecuencia, y están implicados en la expresión de la potenciación de largo plazo y la depresión de largo plazo, fenómenos celulares que están en la base de la formación de la memoria (Bliss y Collingridge, 1993).

El estudio de los receptores de kainato ha sido complicado hasta el advenimiento de nuevos agentes farmacológicos y la ayuda de técnicas de biología molecular que permitieron demostrar su existencia. A pesar de estos avances, las propiedades de los receptores de kainato continúan siendo poco conocidas (Huettner, 2001; Hume *et al*, 1991; Genevieve *et al*, 1999). Por otra parte, los genes que codifican para el receptor de kainato están expresados extensamente a través del sistema nervioso, incluyendo la corteza cerebral, sistema límbico y cerebelo (Frerking y Nicoll, 2000). Hace algunos años se propuso que los receptores de kainato pueden también ejercer efectos de carácter metabotrópico, lo que a la luz del conocimiento sobre la fisiología molecular de los receptores es algo sorprendente que abre un nuevo campo de investigación en el área, así como también brinda nuevos caminos para la comprensión de las enfermedades producidas por alteraciones de estos receptores, las cuales se han denominado canalopatías (Rodríguez-Moreno y Lerma, 1998).

4.1.3 Metabotrópicos.

En adición a la activación de los receptores ionotrópicos, el glutamato también actúa sobre receptores acoplados a proteína G modulando la producción de segundos mensajeros intracelulares. Estos receptores metabotrópicos mediarían los efectos lentos del glutamato (Frerking y Nicoll, 2000). Los estudios han revelado que existen al menos 8 subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato, y estos a su vez han sido clasificados en tres grupos distintos, basados en su homología de secuencia, farmacología y acoplamiento a mecanismos de señalización intracelular.

De esta manera, se puede señalar que el primer grupo está integrado por el subtipo mGluR1 y mGluR5, el cual activa a una fosfolipasa C, mientras que los miembros del segundo (mGluR2 y GluR3) y tercer grupo (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están acoplados negativamente a adenilciclasa; el receptor mGluR6 está también acoplado a la activación de GMPc fosfodiesterasa .

Utilizando bloqueo farmacológico de los receptores metabotrópicos en diferentes especies animales, se ha demostrado que estos juegan un papel vital para la inducción y el mantenimiento de la potenciación de largo plazo, de modo que su bloqueo lleva a la prevención de la inducción de potenciación de largo plazo y alteración del aprendizaje (Holscher *et al*, 1999). Los receptores mGluR1 están localizados principalmente postsinápticamente y sobre los límites de las densidades postsinápticas, desde donde regulan la actividad de los receptores NMDA y AMPA, así como la excitabilidad de la neurona postsináptica (Bessis *et al*, 2001).

4.1.4 Receptores β -adrenérgicos.

Además de los receptores metabotrópicos para glutamato, existen otros receptores que están ligados funcionalmente a un sistema de segundos mensajeros y que juegan un rol importante en la potenciación de largo plazo y en los procesos de memoria. Por ejemplo, el receptor β -adrenérgico cuyo neurotransmisor es la noradrenalina, está asociado al sistema proteína G-estimulante regulado por GDP (Guyton y Hall, 1997).

La activación de receptores β -adrenérgicos en el área CA1 del hipocampo facilita *in vitro* la potenciación de largo plazo en esta región; por el contrario, este efecto es obstruido cuando se co-administra DL-propranolol. Comparadas con ratas controles, las tratadas con DL-propranolol muestran un aprendizaje más lento en el laberinto de agua y una pobre retención de memoria cuando la prueba se prolonga a 24 horas. Estos resultados sugieren que los receptores β -adrenérgicos en el área CA1 están involucrados en la plasticidad sináptica de esta área y que ellos son importantes para el aprendizaje espacial (Jinzhao *et al*, 2003)

Tanto la noradrenalina como la adrenalina actúan sobre los receptores α y β adrenérgicos, pero el isoproterenol, un agonista sintético, actúa sólo sobre los receptores β . El antagonista del receptor β -adrenérgico propranolol es esencialmente inactivo en los receptores α , mientras que el antagonista del receptor α -adrenérgico fentolamina, es muy débil en los receptores β .

Entre los receptores β -adrenérgicos, los β_1 predominan en el corazón y en la corteza cerebral, mientras que los receptores β_2 predominan en pulmón y en cerebelo. Sin embargo, en muchos casos los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos coexisten en el mismo tejido.

El cerebro contiene tanto receptores β_1 como β_2 , a los que no se puede diferenciar en virtud de sus funciones fisiológicas.

Se ha identificado un tercer tipo de receptor β -adrenérgico, los receptores β_3 en el tejido adiposo marrón presente en roedores y en humanos neonatos. (Universidad Autónoma de Madrid, 2000).

4.2 Neurotransmisores.

4.2.1 Glutamato.

Existen muchos mediadores químicos y transmisores involucrados en la potenciación de largo plazo. Algunos se definen como excitatorios y otros como inhibitorios, según sus características intrínsecas, el tipo de receptor activado y la dinámica de transmisores participantes en eventos de transmisión de la potenciación de largo plazo.

Glutamato se considera como el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central y sus receptores están presente particularmente en el hipocampo y corteza cerebral (Universidad Autónoma de Madrid, 2000).

Glutamato es el mediador en la mayoría de las transmisiones sinápticas excitatorias del cerebro, y como se señaló, está involucrado en procesos tan diversos como la epilepsia, las lesiones cerebrales isquémicas y el aprendizaje, influyendo en el desarrollo de las conexiones sinápticas normales del cerebro.

El glutamato y el aspartato son aminoácidos no esenciales que no pueden cruzar la barrera hematoencefálica; por lo tanto, no son accesibles al cerebro mediante la circulación. En lugar de esto, son sintetizados a partir de la glucosa y de una gran variedad de otros precursores. Se han localizado las enzimas sintéticas y metabolitos para el glutamato y el aspartato en los dos principales compartimentos del cerebro: las neuronas y las células gliales.

Las vesículas sinápticas acumulan activamente glutamato a través de procesos dependientes de ATP y de Mg^{2+} . La actuación de estos aminoácidos se produce sobre los diversos tipos de receptores de la membrana postsináptica, aunque la mayoría de los receptores de glutamato son ionotrópicos; es decir, los lugares de enlace de los agonistas y el canal iónico asociado se hallan incorporados dentro del mismo complejo macromolecular. En estos receptores, el efecto de los agonistas es incrementar la probabilidad de que el canal se abra.

Las propiedades del glutamato como neuroexcitador se describieron por primera vez hace más de 40 años (Hayashi, 1952), lo que posteriormente ha permitido estudiar las relaciones existentes entre los fenómenos excitotóxicos del glutamato con los procesos de ontogenia, aprendizaje y memoria, formación de redes neuronales durante el desarrollo, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas, y muerte celular (Cheung *et al*, 1998; Fletcher y Kalloniatis 1997; Houzan *et al*, 1998; Lerma *et al*, 1997). Como ya se ha señalado, la participación del glutamato es crucial para el funcionamiento del sistema nervioso, en particular en la plasticidad neuronal.

El glutamato es almacenado en vesículas sinápticas y liberado en la terminal presináptica por un mecanismo calcio-dependiente que implica la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje.

La liberación del contenido de glutamato de una vesícula sináptica genera un potencial excitador postsináptico que corresponde principalmente a la activación de receptores de AMPA (Meldrum, 2000).

La transmisión glutamatérgica ha sido descrita en diversas regiones del sistema nervioso, que incluyen: conexiones córtico-corticales ipsilaterales y contralaterales, proyecciones corticales hacia la amígdala, tubérculo olfatorio, el putamen, núcleo caudado, tálamo, colículos superior e inferior, área tegmental, sustancia nigra, núcleo rojo y médula espinal, participando en la neurobiología hipocámpal y en conexiones que incluyen al cuerpo mamilar e hipotálamo, así como también en la corteza visual, retina y cerebelo (Michaelis, 1998). Es importante señalar que las fibras callosales utilizan principalmente glutamato como neurotransmisor excitatorio, el cual actúa a nivel de receptores AMPA, Kainato y NMDA (Conti, 1988; Herrman, 1996)

Por otro lado, además de su acción en la escala de milisegundos, la activación de los receptores de glutamato juega un importante papel en los cambios duraderos que involucran al fenotipo neuronal y el desarrollo; los patrones de actividad sináptica excitadora son requeridos para el control fino de las conexiones sinápticas y la generación de mapas topográficos en las redes neuronales (Kalb y Fox 1997). Al respecto, se ha puesto en evidencia que las sinapsis glutamatérgicas de la corteza visual son modificadas por la experiencia sensorial (Nathaniel et al, 1999).

4.2.2 Noradrenalina.

La noradrenalina se biosintetiza en las terminaciones sinápticas a partir del aminoácido tirosina por acción de la tirosina hidroxilasa, produciéndose la dopa, la cual mediante la dopa descarboxilasa se convierte en dopamina, la primera de las catecolaminas.

La dopamina, por hidroxilación con la β -hidroxi-dopamina se transforma en noradrenalina, que es la segunda de las catecolaminas. Finalmente, en una pequeña población de neuronas del tronco cerebral, la noradrenalina puede convertirse en adrenalina, por una metilación inducida por la feniletanolamina N-metiltransferasa.

El neurotransmisor noradrenalina está extensamente distribuido en el cerebro de los mamíferos, donde se piensa que juega un papel en los mecanismos de atención selectiva y regulación de vigilancia (Aston-Jones *et al*, 1991). Noradrenalina también ha sido implicada en la facilitación de procesos de memoria y en la formación de recuerdos a largo plazo para los eventos emocionales (Cahill *et al*, 1994). Una hipótesis, es que la noradrenalina liberada durante la excitación conductual facilitaría la inducción de cambios a largo plazo en la transmisión sináptica excitadora que se piensa es crítica para el almacenamiento de información (Katy, 1972). Más recientemente se ha señalado que la noradrenalina central puede influenciar críticamente la memoria y el aprendizaje, sobre la base que los niveles centrales de noradrenalina modulan poderosamente el funcionamiento de la corteza frontal (Arnsten, 1998) y la potenciación de largo plazo cortical (Nowicky *et al*, 1992; Kamatsu, 1996). Así, se ha descrito que la administración de noradrenalina post-entrenamiento induce facilitación de la memoria, la que es atenuada por antagonistas de receptores adrenérgicos (Sternberg *et al*, 1986). Se ha visto que la administración de noradrenalina exógena intracraneal, inmediatamente después de un entrenamiento, resulta en la consolidación de la memoria desde un estado lábil a uno permanente, efecto que es inhibido por antagonistas β -adrenérgicos (Gibbs, 1991; Crowe *et al*, 1990).

La aplicación de noradrenalina en rebanadas de corteza cerebral de humanos y ratas aumenta la respuesta excitatoria evocada por glutamato o por NMDA (Radisavljevic *et al*, 1994). De igual manera la administración de noradrenalina en cortes de hipocampo de rata adulta, incrementa significativamente la potenciación de largo plazo, indicando que este neurotransmisor es un importante cofactor para promover plasticidad sináptica en el sistema nervioso central adulto (Bramhan, *et al*, 1997; Hopkins y Johnston, 1988).

Estos efectos de la noradrenalina en la potenciación de largo plazo, críticos para el establecimiento de procesos de memoria, se ejercerían vía receptores β -adrenérgicos ya que son revertidos por antagonistas de estos receptores (Bramhan, *et al*, 1997; Radisavljevic *et al*, 1994).

Existen diversos subtipos de receptores adrenérgicos del tipo α y β ; estos ya han sido identificados y clonados: α 1a, α 1b, α 1d, α 2a, α 2b, α 2c, β 1, β 2 y β 3 (Gibbs y Summers, 2000; Link, *et al*, 1992).

Respecto a los receptores adrenérgicos del tipo beta, la existencia de agonista específicos β_1 , β_2 y β_3 (RO363, Zinterol, y CL316243, respectivamente), ha permitido realizar estudios que demuestran que la consolidación de la memoria es incrementada por agonistas adrenérgicos β_2 y β_3 , pero no por agonistas β_1 (Gibbs y Summers, 2000).

Como se ha señalado anteriormente, existen bases suficientes para plantear que la estimulación de receptores adrenérgicos β_2 y β_3 incrementa el aprendizaje y la memoria. Por otra parte, se sabe que la estimulación de los receptores adrenérgicos de tipo alfa, en particular los α_2c , produciría un efecto opuesto. Esta noción muestra consistencia en la literatura y es apoyada por la amplia distribución que presentan los receptores β_2 y α_2c en la corteza cerebral e hipocampo (Gibbs y Summers, 2000; Lee *et al*, 1998). Por otra parte, los receptores β_3 están ausentes en la corteza frontal de la rata. (Nisoli *et al*, 1995).

5. Aspectos fisiológicos de propanolol.

El propanolol es un bloqueador no selectivo de los receptores β -adrenérgicos. Cuando el acceso a los sitios del receptor β -adrenérgico es bloqueado por propanolol, el cronotropismo e inotropismo cardíaco así como las respuestas vasculares β -adrenérgicas, disminuyen proporcionalmente. El propanolol se absorbe casi completamente en el tracto gastrointestinal. El efecto máximo ocurre en 1 y 1,5 horas y la vida media biológica es aproximadamente 4 horas

Junto a estos efectos periféricos de propanolol, observaciones experimentales en que se utilizó este antagonista, sustentan la hipótesis que el refuerzo de la memoria mediante experiencias emocionales involucraría la activación de receptores β -adrenérgicos. Investigadores de la Universidad de California, concluyeron que el refuerzo afectivo al aprendizaje involucra algún tipo de vía receptor β -adrenérgico susceptible de bloqueo farmacológico con propanolol (Universidad de California, 1995)

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración sistémica de propanolol en la rata es capaz de deprimir “*in vivo*” la potenciación sináptica de largo plazo inducida en la corteza occipital por estimulación de fibras callosales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer y analizar el curso temporal de los efectos de propanolol en la potenciación sináptica de largo plazo inducida en la corteza occipital.
2. Conocer y analizar las curvas dosis-respuesta de los efectos de propanolol en la potenciación sináptica de largo plazo cortical y determinar la DE₅₀ (dosis efectiva que modifica en 50% la potenciación de largo plazo en la corteza occipital).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales.

1.1. Animales.

Para la fase experimental se utilizaron ratas adultas (*Rattus norvegicus*), de la cepa Sprague-Dawley, de ambos sexos, cuyas edades fluctuaron entre 55 y 62 días. Las ratas permanecieron en el Bioterio del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. Las manipulaciones experimentales se rigieron por las orientaciones éticas conforme las normas estipuladas por el National Research Council (1985), así como por las normas aprobadas por el Comité de Bioética del INTA, Universidad de Chile. Una vez terminado cada experimento, las ratas fueron eutanasiadas empleando una sobredosis de anestésico general (5 g/kg de uretano i.p.).

Los experimentos se realizaron en ratas anestesiadas con uretano (1,5 g/kg i.p. en una solución de 0,1 g/ml de suero fisiológico). Este anestésico se caracteriza por producir un efecto sedante/hipnótico de larga duración y una acción selectiva sobre la musculatura voluntaria; por lo tanto, no interfiere con el desarrollo de los experimentos al usar la electrofisiología como metodología.

Previa administración de uretano, se inoculó en las ratas el relajante muscular D-tubocurarina (1,5 mg/kg i.m.). Este relajante muscular es de uso rutinario en experimentos electrofisiológicos en animales anestesiados y bajo respiración artificial, dado que por una parte deprime la respiración propia del animal y por otra parte relaja los músculos del cráneo donde normalmente se ubica el electrodo de referencia, evitando así la contaminación del registro con actividad electromiográfica.

1.2. Cirugía y procedimientos de estimulación y registro.

Las ratas fueron traqueostomizadas e intubadas para su posterior conexión a una bomba respiratoria, previa administración del relajante muscular D-tubocurarina (1,5 mg/Kg i.p.). Las ratas fueron instaladas en un aparato estereotáxico (Foto 1), y mediante craneostomía bilateral se expusieron sitios homólogos de cada corteza occipital.

Se utilizó un electrodo bipolar de tungsteno para la estimulación, y un electrodo monopolar de bola de plata para el registro. El electrodo de estimulación fue situado en el cuerpo calloso, a 0 mm de anterioridad respecto del conducto auditivo, a 3 mm de lateralidad respecto de la línea media, y a 2 mm de profundidad respecto de la superficie cortical (Pellegrino y Cushman, 1967) (Foto 2).

El electrodo de registro fue ubicado en el sitio homólogo contralateral, sobre la superficie cortical (Foto 2), y el electrodo de referencia fue situado sobre el hueso craneano expuesto. Las respuestas fueron amplificadas mediante un amplificador Grass P-5. Para cada animal, la estimulación consistió en pulsos simples de onda cuadrada de 100 μ s de duración, 0.2 Hz y de intensidad creciente (entre 50 y 200 μ A), con el objeto de determinar la máxima amplitud asintótica de las respuestas evocadas contralaterales. En cada experimento se ajustó la intensidad del estímulo para obtener respuestas evocadas de amplitud cercana al 50% de la amplitud máxima. A estas respuestas se les denominó respuestas basales.

FOTO 1

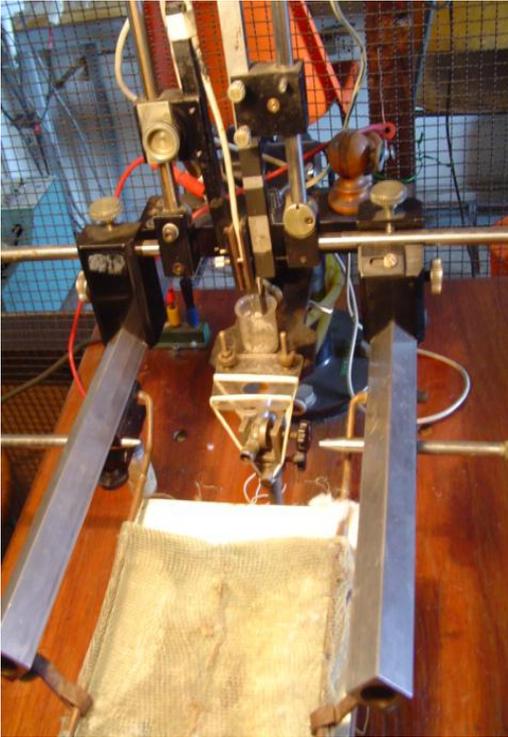


FOTO 2



Rata con craniotomía bilateral, sobre aparato estereotáxico un electrodo bipolar de tungsteno para la estimulación (izquierda), y un electrodo monopolar de bola de plata para el registro (derecha).

Aparato estereotáxico

1.3. Fármacos

Propranolol, Laboratorio SIGMA[®].

Uretano, Laboratorio SIGMA[®].

Cloruro de sodio 0,9%, Laboratorio Baxter S.A.

1.4. Instrumentos de inoculación

Jeringas de vidrio Dove Brand[®] para dilución e inoculación intraperitoneal (i.p.).

2. Métodos

2.1. Inducción y evaluación de la potenciación de largo plazo.

Como se señaló, la estimulación consistió en pulsos simples de onda rectangular de 100 μ s de duración, 0.2 Hz y de intensidad creciente (entre 50 y 200 μ A). Después de la obtención de las respuestas basales, se aplicó un estímulo tetánico potenciador consistente en un tren de ondas rectangulares monofásicas de 500 ms de duración, 312 Hz, y una intensidad 50% mayor que la necesaria para obtener respuestas basales. Después de la administración del tren tetanizante, se retomó el protocolo de estimulación simple descrito anteriormente y se registraron las respuestas hasta el minuto 30 después de la tetanización, para evaluarlas posteriormente por análisis de la amplitud del potencial evocado en la corteza occipital de acuerdo al método propuesto por Racine *et al.* (1994); estos autores definen operacionalmente a la potenciación de largo plazo como un aumento de más de un 10% en la amplitud de la respuesta cortical, 10 minutos después de la tetanización (respuesta potenciada), al ser comparada con la respuesta obtenida antes de la tetanización (respuesta basal).

Bajo esta definición, se evaluó el establecimiento de la potenciación de largo plazo en términos de amplitud de la respuesta y se dividió el curso de tiempo posterior a la tetanización en bloques de 5 minutos, considerando que el promedio de los valores de amplitud de la respuesta potenciada a los 10-15 minutos después de la aplicación del tren tetanizante constituye un buen parámetro para evaluar el establecimiento de la potenciación de largo plazo. La respuesta potenciada fue expresada como porcentaje de variación respecto a la respuesta basal, que constituye el 100%.

2.3. Grupos experimentales

Para conocer el curso temporal y la curva dosis respuesta de los posibles efectos de propanolol, se utilizaron 4 grupos compuestos por 7 ratas cada uno. Todas las ratas fueron inoculadas vía intraperitoneal con las siguientes dosis:

Grupo control: Administración de solución salina i.p. (grupo control).

Grupo 1: 1,25 mg/kg de propanolol i.p.

Grupo 2: 2,5 mg/kg de propanolol i.p.

Grupo 3: 5 mg/kg de propanolol i.p.

2.5. Expresión de Resultados

Los resultados del cambio inducidos por propanolol, se expresaron como porcentaje de inhibición de la potenciación de largo plazo respecto de su propio control (medido antes de la administración de los fármacos), el cual se ajustó a un 100% en cada experimento. Los resultados fueron registrados en el programa Microcal Origin versión 6.0, y representan la media aritmética \pm error estándar de la media (SEM) de los valores de la potenciación de largo plazo expresados en porcentaje.

Se analizó el curso temporal del efecto de las distintas dosis de propanolol, en términos del porcentaje de cambio de la potenciación de largo plazo integrada durante 30 minutos de registro (área bajo la curva). A partir de estos datos se obtuvo la curva dosis-respuesta, donde se expresan los efectos integrados durante los 30 minutos de registro en los diferentes grupos versus el logaritmo decimal de las dosis, y de ella se obtuvo la DE_{50} por interpolación en la recta de regresión, trazada por el método de los mínimos cuadrados en el gráfico dosis-respuesta. El error de la DE_{50} se estimó a través del error del intercepto en la abscisa, mediante el programa Microcal Origin, versión 6.0.

2.6. Análisis Estadístico Utilizado.

Para las comparaciones estadísticas de los resultados obtenidos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test *a posteriori* para comparaciones múltiples entre los distintos grupos y el control salino, (test de Dunnett; programa Graphpad InStat 3.0). Para los resultados, se estableció un nivel de significancia de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

V. RESULTADOS.

1. Curso temporal de la administración de propanolol

Puede observarse que no existieron diferencias significativas entre el basal pre-inoculación y las medias post-inoculación, tanto para el control con salino como para las tres diferentes dosis de propanolol utilizadas, antes de la aplicación del tren tetanizante (Gráfico N°1).

Los resultados obtenidos (Gráfico N°1) muestran que, después de la aplicación del tren tetanizante, propanolol indujo una inhibición de la potenciación de largo plazo en los tres grupos de ratas que recibieron las diferentes dosis de propanolol (1,25 mg/kg, 2,5mg/kg y 5 mg/kg). El curso temporal para las tres dosis aplicadas, muestra una disminución de la potenciación de largo plazo que se mantiene constante a partir de los 10 minutos post-tren tetanizante. La inhibición más marcada se observó con la dosis mayor, 5 mg/kg, la cual a partir del bloque 25-30 minutos (10 minutos después de ser aplicado el tren tetanizante), produjo una inhibición total de la potenciación de largo plazo, llegando a niveles basales que se mantuvieron en el tiempo. Las dosis de 1, 25 mg/kg y 2, 5 mg /kg, también establecieron una disminución en la potenciación de largo plazo a partir de los 10, existiendo diferencias significativas con el grupo control (salino), sin lograr inhibir completamente la potenciación de largo plazo a niveles basales.

2. Obtención de la DE_{50} de propanolol

El Gráfico N°2 presenta el efecto global que produjo la administración intraperitoneal de tres dosis distintas de propanolol, obtenido a través del área bajo la curva de los efectos temporales durante todo el período de observación (30 minutos) (efecto temporal integrado).

Puede observarse que propanolol indujo una inhibición dosis-dependiente de la potenciación de largo plazo, puesta en evidencia por el diferente grado de inhibición que generaron las distintas dosis de propanolol. Tanto la dosis mayor (5 mg/kg) como la intermedia (2,5 mg/kg) fueron capaces de inhibir significativamente la potenciación de largo plazo con respecto al control, mientras que la dosis más baja (1,25 mg/kg) no indujo un cambio significativo.

La curva dosis-respuesta (Gráfico N°3) muestra que durante los 60 minutos de registro propanolol inhibió la potenciación de largo plazo cortical en forma dosis-dependiente, con una DE_{50} de 1,67 mg/kg i.p. (intervalo de confianza 95% = 1,35 – 2,22 mg/kg i.p.).

Efecto temporal de la administración intraperitoneal de propanolol en la potenciación sináptica de largo plazo cortical.

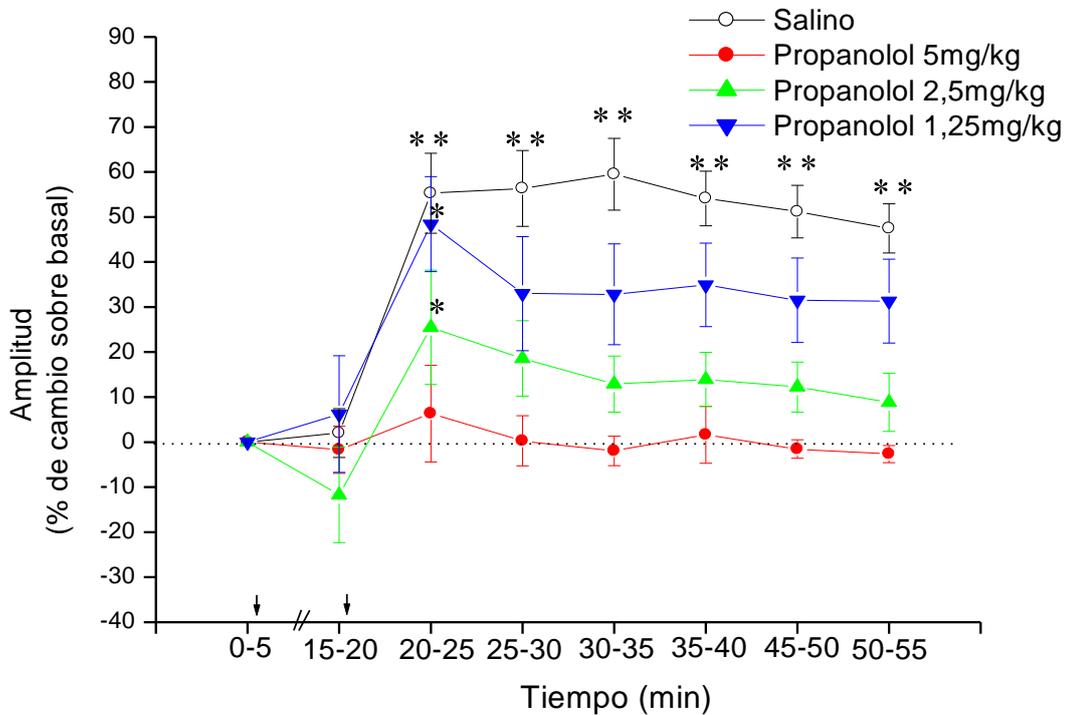


Gráfico N°1: Curva efecto temporal de la administración intraperitoneal de propanolol en la potenciación sináptica de largo plazo cortical. Los resultados están expresados como porcentaje de la potenciación de largo plazo obtenido respecto de su propio control, el cual se ajustó a un 100% en cada caso. Cada punto de las curvas representa la media aritmética \pm error estándar de los valores de la potenciación expresado en porcentaje. Las diferencias significativas entre los distintos grupos y el control (Salino), se representan como: *P<0.05, **P<0.01.

Grafico dosis-respuesta de los efectos globales de propranolol en la potenciación sináptica de largo plazo cortical

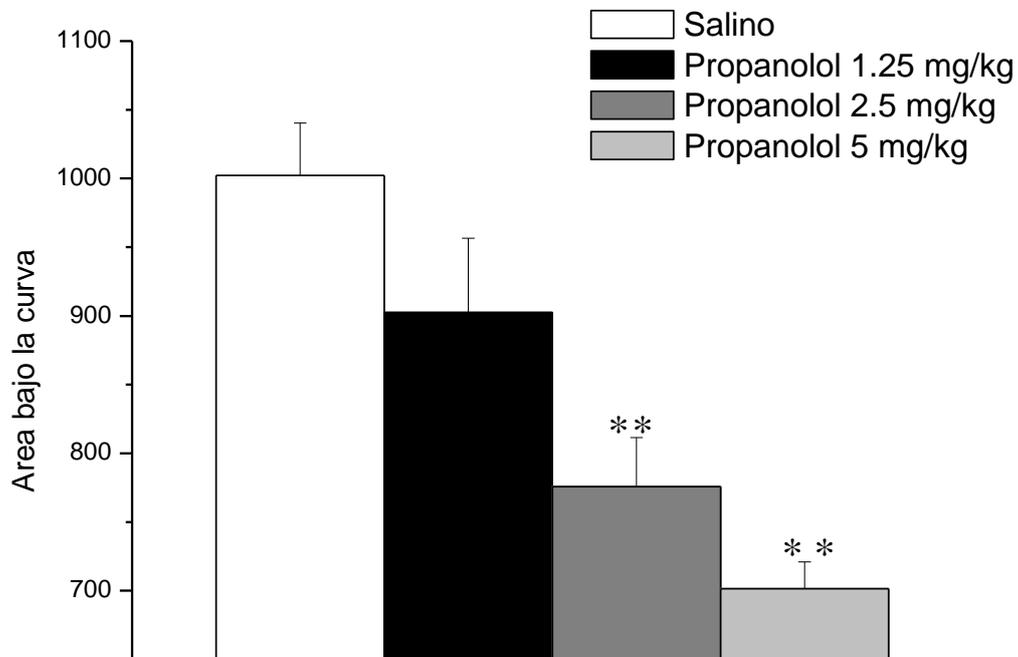


Gráfico N°2: Gráfico dosis-respuesta de los efectos globales de propranolol sobre la potenciación de largo plazo. El gráfico muestra el efecto temporal integrado de la administración intraperitoneal de propranolol de los grupos propranolol 1, 25 mg/kg, 2, 5 mg/kg, y 5 mg/kg, con respecto al grupo control (salino). Para este propósito, se calculó el área bajo la curva durante todo el período de observación (30 minutos) y se expresó como media aritmética de los porcentajes \pm error estándar. Las diferencias significativas entre los distintos grupos de propranolol y el control (salino), se representan como: **P<0.01.

Curva dosis-respuesta de los efectos globales de propanolol en la potenciación sináptica de largo plazo

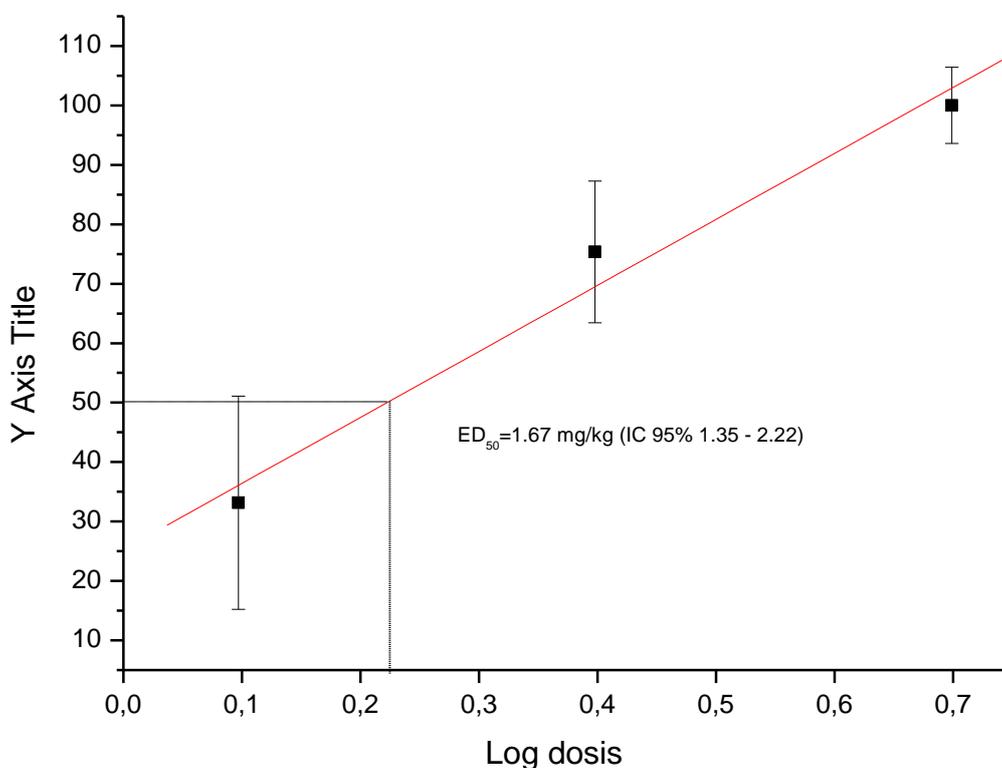


Gráfico N°3: Curva dosis-respuesta de los efectos globales de propanolol sobre la potenciación sináptica de largo plazo. Abscisa: dosis (mg/kg) expresada como su logaritmo decimal. Ordenada: efecto temporal integrado de la administración intraperitoneal de 1, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg y 5 mg/kg de propanolol. Cada punto representa el área bajo la curva durante todo el período de observación (30 minutos) y se expresó como media aritmética de los porcentajes \pm error estándar. La dosis efectiva que genera el 50% del efecto máximo (DE_{50}), se obtiene de la intersección de la recta de regresión con una línea horizontal que pasa por el valor 50%.

VI. DISCUSION

La estimulación eléctrica a baja frecuencia de las fibras callosales posteriores evocó en el campo receptivo de la corteza occipital, una respuesta evocada transcallosal con una morfología similar a las reportadas previamente (Racine *et al.*, 1994; Mondaca *et al.*, 2004). Esta se caracteriza primeramente por la aparición de una onda positiva (onda P) de latencia corta (aproximadamente 7-8 ms al pico), seguida de una onda negativa (onda N) de latencia mayor (aproximadamente 10-15 ms al pico). La latencia de ambas ondas sirvió como parámetro para identificar la respuesta transcallosal adecuada, y la amplitud de la respuesta fue evaluada desde el mínimo de la onda P hasta el máximo de la onda N. Estudios de Chapman *et al.* (1998) han puesto en evidencia que la onda P es generada por un pozo de corriente en la capa V de la corteza cerebral cuya fuente se ubica en las capas supragranulares (capas I a III), lo que da lugar a un potencial de superficie positiva. Por su parte, la onda N se genera por un pozo de corriente a nivel de la parte superior de la capa V cuya fuente se ubica ahora en la capa VI, dando origen a un potencial de superficie negativa. Ambos potenciales corresponden a componentes monosinápticos capaces de seguir estimulación de alta frecuencia (400 Hz) y son por lo tanto susceptibles de ser potenciados por el tren tetanizante utilizado en el presente estudio.

Los resultados mostraron que la aplicación de un tren tetanizante de 312 Hz a las fibras callosales posteriores, potenció en forma duradera la respuesta transcallosal, lo que se evidenció por el significativo aumento en la amplitud de las respuestas frente a estimulación de baja frecuencia, efecto que perduró por más de una hora después de la estimulación tetánica. El patrón temporal de la potenciación de largo plazo cortical registrada en el presente estudio es completamente consistente con las observaciones de Racine *et al.* (1994), quien demostró *in vivo* en ratas adultas que esta propiedad puede expresarse en varios sitios de la neocorteza, ipsilateral y contralateral al sitio de estímulo callosal. Asimismo, es consistente con resultados más recientes de Mondaca *et al.* (2004).

En los presentes experimentos, se observó que propanolol administrado por vía intraperitoneal alteró notablemente la capacidad de establecer potenciación de largo plazo cortical en la rata. En efecto, los resultados de las series experimentales en las que se administraron diferentes dosis de propanolol por vía intraperitoneal, muestran una inhibición dosis-dependiente inducida por el fármaco en la potenciación de largo plazo cortical. Esto sugiere que los receptores β -adrenérgicos, están involucrados en el establecimiento y mantención de la potenciación de largo plazo cortical. Al respecto, es necesario señalar que la participación de los receptores β -adrenérgicos en la potenciación de largo plazo hipocampal está claramente establecida.

En efecto, la probabilidad de evocar potenciación de largo plazo en rebanadas de hipocampo de rata es aumentada significativamente después de la administración de noradrenalina, efecto que es imitado por el agonista β -adrenérgico selectivo isoproterenol (Hopkins y Jhonston, 1988) y abolido por el antagonista β -adrenérgico selectivo propanolol (Hopkins y Jhonston 1988; Bramham *et al.*, 1997). De, igual modo, el refuerzo de la potenciación de largo plazo inducida en el hipocampo por estímulos repetitivos y aversivos es bloqueado por propanolol (Seidenbecher *et al.*, 1997). Mas recientemente, se ha demostrado que la liberación de noradrenalina en el hipocampo por estimulación persistente del núcleo *locus coeruleus*, induce potenciación de largo plazo en el giro dentado, efecto que es prevenido por la administración de propanolol (Walling y Harley, 2004). Por el contrario, el efecto de la activación de los receptores β -adrenérgicos en la potenciación de largo plazo cortical no ha sido aún completamente dilucidada. Al respecto, la información existente indica que el agonista β -adrenérgico isoprenalina, es capaz de aumentar la excitabilidad cortical pero no la probabilidad de inducir potenciación de largo plazo (Nowicky *et al.*, 1992); de igual modo, se ha descrito que noradrenalina y el agonista β -adrenérgico isoproterenol aumentan la capacidad de glutamato y de NMDA para excitar neuronas corticales, efecto que es revertido por propanolol (Radisavljevic *et al.*, 1994), lo que sin embargo no implica necesariamente un aumento de la potenciación de largo plazo cortical. En consecuencia ambos resultados sugieren, pero no demuestran, un rol modulador del receptor β -adrenérgico en la potenciación de largo plazo evocada en la corteza cerebral.

La demostración mas clara del efecto facilitador de la estimulación de los receptores β -adrenérgicos en la potenciación de largo plazo cortical ha sido provista por Kato (1993), quien puso en evidencia que la adición de isoproterenol en el medio de incubación de rebanadas de corteza visual de rata adulta era, un prerrequisito para la inducción de potenciación sináptica inducida por tetanización. Los presentes resultados confirman *in vivo* esas observaciones, ya que indican que la presencia de receptores β -adrenérgicos indemnes (no bloqueados), es un requisito para el establecimiento de la potenciación de largo plazo cortical, dado que su bloqueo mediante propanolol lleva a una disminución dosis-dependiente de esa capacidad plástica en las sinápsis calloso-corticales.

La DE_{50} de propanolol i.p. para inhibir la potenciación sináptica cortical fue de 1,67 mg/kg, valor que está en el rango de las dosis de propanolol utilizadas para inhibir la adquisición (0.5-5.0 mg/kg) y consolidación (5 mg/kg) de memorias en la rata (Grigoryan *et al.*, 1994; Cahill *et al.*, 2000). Como se sabe, propanolol es altamente soluble en lípidos y por lo tanto atraviesa fácilmente la barrera hémato-encefálica en la rata (Partridge *et al.*, 1983) y en el hombre (Olesen *et al.* 1978).

Los mecanismos a través de los cuales propanolol puede reducir la potenciación de largo plazo cortical pueden incluir: (i) bloqueo directo de los receptores β -adrenérgicos postsinápticos existentes en las células piramidales corticales (Tiong y Richardson, 1989; McCormick *et al.*, 1991), inhibiendo la transducción de señales respectiva, con disminución de la producción de mediadores intracelulares como proteína quinasa A, lo que se traduciría en una disminución de la fosforilación de proteínas relevantes para la inducción y persistencia de la potenciación sináptica (receptor NMDA, óxido nítrico, otras kinasas); (ii) bloqueo de los receptores β presinápticos existentes en los terminales axónicos glutamatérgicos, los cuales normalmente facilitan la liberación de glutamato en la neocorteza (Wang *et al.*, 2002), disminuyendo así la potenciación de largo plazo sobre la base de una reducción del glutamato cortical; y (iii) bloqueo de los adrenoreceptores β existentes en las células gliales de la corteza cerebral (Shao y McCarthy, 1994), lo que puede alterar el rol modulador de los astrocitos (via múltiples mediadores como glutamato, óxido nítrico, citoquinas) en las neuronas responsables de los procesos de memoria.

Es muy probable que todos estos mecanismos operen simultáneamente, deprimiendo los fenómenos de plasticidad sináptica y los procesos de memoria concomitantes. En efecto, como se señaló anteriormente, la administración de noradrenalina exógena intracraneal inmediatamente después de un entrenamiento resulta en la consolidación de la memoria de un estado lábil a uno permanente, efecto que es inhibido por antagonistas β -adrenérgicos (Gibbs, 1991; Crowe *et al*, 1990).

Es conveniente señalar que la posibilidad que los efectos de propanolol en la potenciación de largo plazo cortical sean indirectamente producidos a través de cambios en la circulación cerebral podría descartarse, sobre la base que propanolol no parece afectar el flujo sanguíneo cerebral (Olesen, 1986; Sieber *et al*, 1993).

Finalmente, es necesario señalar que los cambios en la disponibilidad de noradrenalina central y/o en la densidad de sus receptores, inducidos en ciertos estados crónicos como el estrés mantenido (Glavin, 1985; Southwick *et al*, 1999), malnutrición perinatal (Soto-Moyano *et al*, 1995; Soto-Moyano *et al*, 1998), o depresión (Harmer *et al*, 2003), la activación de los adrenoreceptores β podría ser insuficiente comprometiendo los procesos de plasticidad sináptica cortical e hipocampal, dando lugar a déficits en la adquisición de aprendizajes y de memoria. En este sentido, tal vez parte de los esfuerzos terapéuticos futuros para el tratamiento de estos desórdenes deberían estar dirigidos hacia la corrección farmacológica de los niveles endógenos de noradrenalina central con el objeto de paliar los déficits de aprendizaje y memoria que acompañan a estos cuadros crónicos.

VII. CONCLUSIONES

1-. Los resultados muestran que propanolol (1,25; 2,5 y 5 mg i.p.) indujo una inhibición dosis-dependiente de la potenciación de largo plazo. Siendo DE_{50} obtenida de 1,67 mg/kg i.p..

2-. Estas observaciones indican que propanolol es capaz de interferir, a nivel cortical, un componente noradrenérgico mediado por adrenoreceptores β que es crucial para la generación y mantención de la potenciación de largo plazo. Los mecanismos implicados son probablemente dependientes del sistema de transducción de señales activados por la noradrenalina a nivel de los receptores β -adrenérgicos neuronales pre- y postsinápticos, así como gliales.

BIBLIOGRAFÍA

ARNOLD, J. HEYNEN AND MARK F. BEAR. 2001. Long-Term Potentiation of Thalamocortical Transmission in the Adult Visual Cortex In Vivo J. Neurosci. 21: 9801-9813.

ARNSTEN, A.F.T. 1998. Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. Trends Cogn. Sci. 2 : 436-447.

ASTON-JONES, G.; CHIANG, C.; AND ALEXINSKY, T. 1991. Prog Brain Res 88. 501-520.

BEAR, M.; COOPER, L.; EBNER, F. 1987. A physiological basis for a theory of synaptic modification. Science 237:42-48.

BIGGE, C. 1999. Ionotropic Glutamate Receptors. Curr Opin Chem Biol 3: 441-447.

BENNET, M. 2000. the concept of long term potentiation of transmission at synapses. Prog. Neurobiol, 2000; 60:109-137.

BLISS, T.; LOMO, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. Journal of Physiology July 1973 232; 331-56.

BESSIS, A.; ACHER, F.; PIN, J. 2001. Metabotropic glutamate receptor: exciting possibilities in excitatory transmission. Cell transmissions 17: 3-9.

BLISS, T.; COLLINGRIDGE, G. 1993. A synaptic Model of Memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361: 31-39.

BRAMHAM, C.; BACHER-SVENDSEN, K.; SARVEY J. 1997. LTP in lateral perforant path is beta-adrenergic receptor dependent. Neuroreport 8 : 719-724.

BROWN, T.; CHAPMAN, P.; KAIRISS, E.; KEENAN, C. 1988. Long-term synaptic potentiation. Science. 242 : 724-8.

BLUE, E.; PARNAVELAS J. 1982. The effect of neonatal 6-hydroxydopamine treatment on synaptogenesis in the visual cortex of the rat. *Dev. Brain Res.* 3: 140-144.

BUONOMANO, D.; MERZENICH; M. 1998. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci* 21:149-186.

CAHILL, L.; PRINS, B.; WEBER, M. 1994. Beta-adrenergic and memory for emotional events. *Nature* 371, 702-104.

CAHILL. L.; PHAM, C.; SETLOW, B. 2000. Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade. *Neurobiol Learn Mem*:259-66.

CASTILLO, J. 2000 Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Rev Neurol* 30: 459-64.

CHAPMAN, C.; TREPEL, C.; IVANCO, TL.; FROC, D.; WILSON, K.; RACINE, R. 1998. changes in field potentials and membrane currents in rat sensorimotor cortex following repeated tetanization of the corpus callosum in vivo. *Cereb CORTEX*, 8:730-42.

CHEUNG, N.; CARROLL, F.; LARM; GIARDINA, S. 1998. Kainate-induced apoptosis correlates with c-jun activation in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 52: 69-82.

CONTI, F.; FABRI, M.; MANZONI, T. 1988. Immunocytochemical evidence for glutamatergic cortico-cortical connections in monkeys. *Brain Res*, 462:148-53.

CROWE, S.; NG, K.; GIBBS, M. 1990. Memory consolidation of weak training experiences by hormonal treatments. *Pharmac. Biochem. Behav.* 37: 729-734.

CZUCZWAR, S. 2000. Glutamate receptor antagonists as potential antiepileptic drugs. *Neurol Neurochir Pol* 34: 41-6.

DUDEK S, M.; BEAR, M. 1989 A biochemical correlate of the critical period for synaptic modification in the visual cortex. *Science* 246: 673-675.

FLETCHER, E.; KALLONIATIS, M. 1997 Neurochemical Development of the degenerating Rat Retina. *The J Com Neurol* 388: 1-22.

FRÉGNAC, Y.; SHULZ, D. 1994. Models of synaptic plasticity and cellular analogs of learning in the developing and adult vertebrate visual cortex. In: *Advances in neural and behavioral development* (Casagrande VA, Shinkman PG, eds), pp 149-252. Norwood, NJ: Ablex.

FRERKING, M.; NICOLL, R. 2000. Synaptic Kainate Receptor. *Current Opinion in Neurobiology*. 10: 342-351.

GENEVIEVE, N.; PIANTA, M.; KALLONIATIS, M. 1999 Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. *Visual Neurosci* 16: 149-158.

GIBBS, M. 1991. Behavioral and pharmacological unravelling of memory formation. *Neurochem. Res.* 16 : 715-726.

GIBBS, M.; SUMMERS, R. 2000. Separate roles for β_2 and β_3 adrenoceptors in memory consolidation. *Neuroscience* 95: 913-922.

GLAVIN, G. 1985. Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* Summer;9(2):233-43.

GRIGORYAN, G.; PETERS, S.; GRAY, J.; HODGES, H. 1994. Interactions between the effects of propranolol and nicotine on radial maze performance of rats with lesions of the forebrain cholinergic projection system. *Behav Pharmacol.*:265-280.

GUYTON, A.; HALL, J. 1997. La corteza cerebral; funciones intelectuales del cerebro; aprendizaje y memoria. **In:** *Tratado de fisiología médica*. 9º ed. México D.F., México. pp . 793-809.

HARMER, C.; HILL, S.; TAYLOR, M.; COWEN, PJ.; GOODWIN, GM. 2003. Toward a neuropsychological theory of antidepressant drug action: increase in positive emotional bias after potentiation of norepinephrine activity. *Am J Psychiatry*:990-2.

HAYASHI, T. 1952. A physiological study of the epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn J Physiol* 3: 46-64.

HEALY D. MEADOR-WOODRUFF J. 2000. Iontropic Glutamate Receptor Modulation Preferentially Affects NMDA Receptor Expression in Rat Hippocampus. *Synapse* 38: 294-304.

HEBB, D. 1958. (en línea) A textbook of psycholog.

<http://www.questia.com/> (diciembre 2004)

HERRMAN, K. 1996. Diferential distribution of AMPA receptors and glutamate during pre and postnatal development in the visual cortex of ferrets. *J Comp Neurol*, 375:1-17.

HOLSCHER, C.; GIGG, J.; O'MARA, S. 1999. Metabotropic glutamate receptor activation and blockade: their in long term potentiation, learning and neurotoxicity. *Neurosci Biobehav Rev*: 399-410.

HOUZAN, H.; KANNO, M; KIKUCHI, S. 1998. AMPA/Kainate receptor activation inhibits neuronal delayed rectifier K current via Na entry in rat cortical neurons. *Biochem and Biophys Res Comm* 243: No. 2..

HOPKINS, W.; JOHNSTON, D. 1988. Noradrenergic enhancement of long-term potentiation at mossy fiber synapses in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 59 : 667-687.

HUME, R.; DINGLEDINE, R.; HEINEMANN, S. 1991. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253: 1028-1030.

HUETTNER, J. 2001. Kainate Receptors: Knocking out plasticity. *TINS.* 24: N° 7, 365-366.

JINZHAO, J.; XUEHAN, Z.; BAOMING, L. 2003. β -adrenergic modulation of in vivo long-term potentiation in area CA1 and its role in spatial learning in rats. *Science.* vol. 46 n° 6, 605-614.

KALB, R.; FOX, A. 1997. Synchronized overproduction of AMPA, Kainate, and NMDA Glutamate Receptors During Human Spinal Cord Development. *J Comp Neurol* 384: 200-210.

Kandel, E. 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science* 294: 1030-1038.

KAMATSU, Y. 1996. GABAB receptors, monoamine receptors and postsynaptic inositol triphosphate-induced Ca²⁺ release are involved in the induction of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J. Neurosci* 16: 6342-6352.

KATY, S. 1972. *Res publ assoc res nerv ment dis* 50, 378-389.

KATO, N. 1993. Mechanisms of beta-adrenergic facilitation of LTP in rat visual cortex. *Neuroreport*:1087-90.

KIRKWOOD, A.; BEAR M. 1994. Hebbian synapses in visual cortex. *J Neurosci* 14:1634-1645.

LERMA, J.; MORALES, M.; VICENTE, M.; HERRERAS, O. 1997. Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *TINS* Vol. 20, No. 1.

LEE, A.; WISSEKERKE, AE.; ROSIN, DL.; LYNCH, K. 1998. Localization of α 2-adrenergic receptor immunoreactivity in catecholaminergic neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 84: 1085-1096.

LINK, R.; DAUNT, D.; BARSH, G.; CHRUSCINSKI, A.; KOBILKA, B. 1992. Cloning of two mouse genes encoding α 2-adrenergic receptor subtypes and identification of a single aminoacid in the mouse α 2-c10 homolog responsible for an interspecies variation in antagonist binding. *Molec. Pharmac.* 42: 16-27.

MALENKA, R.; NICOLL, R. 1999. Long term potentiation - A decade of progress. *Science* 285:1870-1874.

- McCORMICK D.; PAPE, H.; WILLIAMSON, A.** 1991. Actions of norepinephrine in the cerebral cortex and thalamus: implications for function of the central noradrenergic system. *Prog Brain Res.*;88:293-305.
- McLEAN, J.; PALMER, A.** 1998 Plasticity of neuronal response properties in adult cat striate cortex. *Vis Neurosci* 15:177-196.
- MELDRUM, B.** 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130: 1007-10152.
- MICHAELIS, E.** 1998. Molecular Biology of Glutamate Receptors in The Central Nervous System and their role in Excitotoxicity, oxidative stress and Aging. *Progr Neurobiol* 54: 369-451.
- MONDACA, M.; HERNANDEZ, A.; PEREZ, H.; VALLADARES, L.; SIERRALTA, W.; FERNANDEZ, V.; SOTO-MOYANO, R.** 2004. α -adrenoceptor modulation of long-term potentiation elicited in vivo in rat occipital cortex. *Br. Research.* 292-296.
- NATHANIEL, B.; SAWTELL, KIMBERLY, M.; HUBER, JOHN C. RODER, AND MARK F. BEAR.** 1999. Induction of NMDA Receptor-Dependent Long-Term Depression in Visual Cortex Does Not Require Metabotropic Glutamate Receptors. *J Neurophysiol* 82, 3594-3597.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC).** 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. Publication n^o 85-23 (revised). National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- NISOLI, E.; TONELLO, E.; BENARESE, M.; CARRUBA, M.** 1995. Rat frontal cortex beta 1-adrenoceptors are activated by the beta 3-adrenoceptor agonista Sr 58611^a and Sr 58878^a but not by BRL 37344 or ICI 215, 001. *J. Neurochem.* 65: 1580-1587.
- NOWICKY, A.V.; CHRISTOFI, G.; BINDMAN, L.T.** 1992. Investigation of beta-adrenergic modulation of synaptic transmission and post synaptic induction of

associative LTP in layer V neurones in slices of rat sensorimotor cortex. *Neurosci. Lett.*;137(2): 270-273.

OLESEN, J. 1986. Beta-adrenergic effects on cerebral circulation. *Cephalalgia*; 6 Suppl 5:41-6.

OLESEN, J.; HOUGARD, K.; HERTZ, M. 1978. Stroke. Isoproterenol and propranolol: ability to cross the blood-brain barrier and effects on cerebral circulation in man:344-9.

PARDRIDGE, W.; SAKIYAMA, R.; FIERER, G. 1983. Transport of Propranolol and Lidocaine through the Rat Blood-Brain Barrier. PRIMARY ROLE OF GLOBULIN-BOUND DRUG. *J Clin Invest.* 71: 900-908.

PELLEGRINO, L.; CUSHMAN, A. 1967. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain.* New York: Appleton-Century-Crofts, 22pp. Two systems of coordinates supplied: deGroot and deGroot modification.

RACINE, RJ; WILSON, D; CAMPBELL, G; MILGRAM, N. 1994. Post-activation potentiation in the neocortex: I. Acute preparations. *Brain Res*, 637:73-82.

RADISAVLJEVIC Z, CEPEDA, C.; PEACOCK, W.; BUCHIWALD, W.; LEVINE, M. 1994. Norepinephrine modulates excitatory amino acid-induced responses in developing human and adult rat cerebral cortex. *Int. J. Del. Neurosci* 12: 353-361.

RIOULT-PEDOTTI, M.; FRIEDMAN, D.; HESS, G.; DONOGHUE, J. 1998. Strengthening of horizontal cortical connections following skin learning. *Nat. Neurosci.* 1: 230-234.

RIOULT-PEDOTTI, M.; FRIEDMAN, D.; DONOGHUE, J. 2000. Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 290: 533-536.

RODRIGUEZ-MORENO, A.; LERMA, J. 1998. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* 20: 1211-1218.

- RUPPIN, E.** 2000. NMDA receptor delayed maturation and schizophrenia. *Med Hyp* 54:No. 5, May.
- SARA, S.; DEVAUGES, V.** 1989. Idazoxan, an α -2 antagonist, facilitates memory retrieval in the rat. *Behav. Neural Biol.* 51:401-411.
- SEEBURG, P.** 1993. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *TINS.* 16:N° 9.
- SEEBURG, P.; SINGLE, F.; KUNER, T.; HIGUCHI, M.; SPRENGEL, R.** 2001. Genetic manipulation of key determinants of ion flow in glutamate receptor channel in the mouse. *Brain Res* 907: 233-243.
- SEIDENBECHER, T. ; REYMANN, K.; BALSCHUN, D.** 1997. A post-tetanic time window for the reinforcement of long-term potentiation by appetitive and aversive stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 1494-1499.
- SHAO, Y.; McCARTHY, K.** 1993. Regulation of astroglial responsiveness to neuroligands in primary culture. *Neuroscience*:991-1001.
- SIEBER, F.; BROWN, P.; WU, Y.; KOEHLER, R.; TRAYTSMAN, R.** 1993. Cerebral blood flow and metabolism in dogs with chronic diabetes. *Anesthesiology*:1013-21.
- SINGER, W.** 1995. Development and plasticity of cortical processing architectures. *Science* 270:758-759.
- STERNBERG, D.; KOROL, D.; NOVACK, G.; MCGAUGH, J.** 1986. Epinephrine-induced memory facilitation: attenuation by adrenoceptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 129: 189-193.
- SOTO-MOYANO. R.; BELMAR, J.; PEREZ, H.; RUIZ, S.; HERNANDEZ, A.** 1995. Central noradrenergic hyperactivity early in life: a hypothesis on the origin of morpho-functional brain disorders induced by malnutrition. *Biol Res.*;28:105-11.

SOTO-MOYANO, R.; ALARCÓN, S.; HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ, H.; RUIZ, S.; CARREÑO, P.; KUSCH, C.; BELMAR, J. 1998. Prenatal nutrition-induced functional alterations in callosal connections and in interhemispheric asymmetry are prevented in the rat by reduction of noradrenaline synthesis during gestation. *J Nutr* 128: 1224-1231.

SOUTHWICK, S.; BREMNER, J.; RASMUSSEN, A.; MORGAN, C.; ARNSTEN, A.; CHARNEY, D. 1999. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry*.46:1192-204.

SUNDSTROM, E.; WHITTEMORE, S.; MO, L.; SEIGER, A. 1997. Analysis of NMDA Receptors in the Human Spinal Cord. *Exp Neurol*. 148: 407-413.

TIONG, A.; RICHARDSON, J. 1989. Characterization of rat cerebral cortical beta adrenoceptor subtypes using (-)-[125I]-iodocyanopindolol. *J Recept Res*. 90:495-508.

TRIST, D. 2000. Excitatory amino acid agonist and antagonist: pharmacology and therapeutic applications. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 74: 221-229.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID. 2000. Tratado multidisciplinar sobre la actividad cerebral, los procesos mentales superiores y nuestro comportamiento. [en línea]. <<http://www.biopsicologia.net/inicio.php4>> [consulta: junio, 2004].

UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA. 1995.[en línea].<http://www.iladiba.com.co/revista/1995/02/breve.asp> [consulta: julio, 2004].

VICKERY, RM.; MORRIS, S.; BINDMAN, L. 1997. Metabotropic glutamate receptors are involved in long-term potentiation in isolated slices of rat medial frontal cortex. *J. Neurophysiol* 78: 3039-3046.

VOLGUSHEV, M.; MITTMANN, T.; CHISTIAKOVA, M.; BALABAN, P.; EYSEL, U. 1999. Interaction between intracellular tetanization and pairing-

induced long-term synaptic plasticity in the rat visual cortex. *Neuroscience* 93: 1227-1232.

WANG, S.; COUTINHO, V.; SIHRA, T. 2002. Presynaptic cross-talk of beta-adrenoreceptor and 5-hydroxytryptamine receptor signalling in the modulation of glutamate release from cerebrocortical nerve terminals. *Br J Pharmacol.*137:1371-9.

WALLING, S.; HARLEY, C. 2004. Locus ceruleus activation initiates delayed synaptic potentiation of perforant path input to the dentate gyrus in awake rats: a novel beta-adrenergic- and protein synthesis-dependent mammalian plasticity mechanism. *J Neurosci.* Jan 21;24:598-604.

WEINBERGER, N.1995. Dynamic regulation of receptive fields and maps in the adult sensory cortex. *Annu Rev Neurosci* 18:129-158.