

***MECANISMOS INTRACELULARES Y
EXTRACELULARES QUE REGULAN EL
RECLUTAMIENTO DEL RECEPTOR GABA_A***

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

por

Bioquímica María Inés RIBERI

Directora: Dra. Nancy Alicia SALVATIERRA

**Cátedra de Química Orgánica Biológica
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS Y
TECNOLOGICAS-CONICET
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2013

COMISIÓN ASESORA

Dr/a Nombre y Apellido: Suarez, Marta Lugar de Trabajo: Cátedra de Fisiología Animal,
FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba.

Dr/a Nombre y Apellido: Roberto, Rovasio Lugar de Trabajo: Centro de Biología Molecular
y Celular, FCEFyN, Universidad Nacional de
Córdoba.

Dr/a Nombre y Apellido: Nancy, Salvatierra Lugar de Trabajo: Cátedra de Química Orgánica-
Biológica, FCEFyN, Universidad Nacional de
Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

A Gherman , a mis padres.

Agradecimientos

A mi Directora de Tesis Dra Nancy Salvatierra por el tiempo dedicado a mi formación profesional con dedicación y paciencia. Por todos los consejos y los favores que me brindó.

A mis compañeras de laboratorio y amigas Mariana, Soledad y Romina por la ayuda incondicional, las sugerencias y el buen humor de todos los días.

A la Dra Marta Suarez y al Dr Roberto Rovasio miembros de la comisión asesora, que me acompañaron durante toda la tesis, con buena predisposición y valiosas sugerencias que contribuyeron a mi formación doctoral.

A la Dra Mariela Perez, Dra Claudia Bregonzio y Dra María Carolina Monti, por la colaboración en los ensayos farmacológicos.

Al Dr Daniel Mascó por haberme permitido trabajar en su laboratorio y al Dr Agustín Anastasia por haberme capacitado en la técnica de inmunohistoquímica, con desinterés y buena voluntad .

A SECyT y Conicet por el soporte económico para realizar este trabajo de Tesis Doctoral.

A mi familia que siempre creyó en mí, me apoyó en todo momento y sin ellos no podría haber logrado esta meta.

A mis amigas de siempre por escucharme y alentarme Sol, Cari, Fernanda, Gaby y Jimena.

A todos muchas gracias.

Comisión Asesora

Dra Nancy A. Salvatierra (Cátedra de Química Orgánica-Biológica, FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba)

Dra Marta Suarez (Cátedra de Fisiología Animal, FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba).

Prof. Dr. Roberto Rovasio (Centro de Biología Celular y Molecular FCEFyN, Universidad Nacional de Córdoba)

INDICE GENERAL

Página

Abreviaturas	I
Resumen	III
Summary	V
1. Introducción.....	1
1.1- Receptores GABA _A	3
1.2- Trafico del GABA _A	8
1.2.1 –Exocitosis del RGABA _A	9
1.2.2- Endocitosis del R GABA _A	12
1.3- Fosforilación de los R GABA _A	14
1.4- Concepto de estrés	16
1.4.1- El estrés en relación al sistema nervioso.....	18
1.4.2 - Estrés agudo y R GABA _A	22
1.4.3- Sistema noradrenérgico en relación al estrés.....	24
1.4.5- Insulina central y estrés.....	27
1.5 – Localización de R GABA _A y receptores noradrenérgicos en sistema nervioso central.....	29
2. Hipótesis.....	32
3. Objetivos.....	33
4. Materiales y métodos.....	35
4.1- Animales	35
4.2- Drogas	35
4.3- Procedimientos experimentales.....	36
4.3.1- Inyecciones intracerebroventriculares.....	36

4.3.2- Inyecciones intraperitoneales.....	39
4.4- Técnica neurofarmacológica.....	39
4.4.1- Curvas dosis respuesta.....	39
4.4.1.1- Curva dosis respuesta de noradrenalina.....	40
4.4.1.2- Curva dosis respuesta de antagonistas noradrenergicos.....	40
4.5- Campo Abierto.....	41
4.6- Procedimiento de decapitación	42
4.7- Preparación de sinaptosomas.....	42
4.8- Determinación de la densidad del R GABA _A flunitrazepam-sensible a 37 °C	43
4.9- Determinación de glucosa plasmática	44
4.10- Cuantificación de proteínas	45
4.11- Inmunohistoquímica	45
4.12- Análisis estadístico	47
5. Resultados.....	48
5.1- Efectos de diferentes dosis de noradrenalina inyectadas icv en un Campo Abierto.....	48
5.2- Antagonismo noradrenérgico	51
5.2.1- Efectos de diferentes dosis de fentolamina inyectas ip en el comportamiento en un Campo Abierto.....	51
5.2.2- Efecto de 0,250 μmol/kg de fentolamina (antagonista α-adrenérgico no selectivo) administrada sistémicamente sobre el comportamiento de aves estresadas y las distintas dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricularmente	52
5.2.3- Efectos de diferentes dosis de yohimbina (antagonista α ₂ -adrenérgico) administrada sistémicamente en pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto.....	54
5.2.4- Efecto de 15 nmol/kg de yohimbina (antagonista α ₂ -adrenérgico selectivo) administrada sistémicamente sobre el comportamiento de aves estresadas y las distintas dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricularmente	55
5.2.5- Efecto de diferentes dosis de propranolol (antagonista β ₁₋₂ -adrenérgico no selectivo) administrado sistémicamente en pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto.....	57

5.2.6- Efecto de 250 nmol/kg de propranolol (antagonista $\beta_{1,2}$ -adrenérgico no selectivo) administrado sistémicamente sobre el comportamiento de aves estresadas y las distintas dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricularmente	58
5.2.7- Efecto de diferentes dosis de insulina inyectada icv en el comportamiento de pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto.....	60
5.3- Ensayo de radioligando.....	61
5.3.1- Efectos de diferentes dosis de noradrenalina sobre la densidad de RGABA _A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollos estresados y no estresados.....	62
5.3.2- Efectos de yohimbina en la densidad del RGABA _A - flunitrazepam-sensible en sinaptosomas de pollos no estresados y estresados.....	65
5.3.3- Efectos de propranolol en la densidad del RGABA _A -flunitrazepam-sensible en sinaptosomas de pollos no estresados y estresados.....	69
5.4- Insulina.....	71
5.4.1- Efectos de diferentes dosis de insulina sobre la densidad de RGABA _A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollo estresados y no estresados.....	71
5.5- Inmunohistoquímica	74
5.5.1-Interacción inducida la noradrenalina sobre la expresión de la subunidad α_1 del RGABA _A en Nidopallium y Medial Estriatum en pollos estresados	75
5.5.2-Interacción inducida por la noradrenalina sobre la expresión de la subunidad $\beta_{2,3}$ del RGABA _A en Nidopallium y Medial Estriatum en pollos estresados	76
6. Discusión.....	79
-Consideraciones finales.....	87
- Proyecciones futuras.....	88
7. Referencias bibliográficas.....	89

Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
ANOVA	Análisis de la varianza
Akt	Serin-treonin-kinasa
AP2	Complejo de adaptina
ATP	Adenosintrifosfato
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BIG	Brefeldina inhibited GDP-GTP factor
BZD	Benzodíacepinas
CAMK-II	Proteína kinasa dependiente de calcio-calmodulina
CCV	Vesículas cubiertas de clatrina
CRH	Corticotropin-releasing hormone
DAG	Diacilglicerol
DO	Densidad óptica
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ER	Retículo endoplasmático
Fmáx	Fijación máxima
FNZ	Flunitrazepam
GABA	Acido γ -aminobutírico
GABARAP	Proteína asociada al R GABA _A
GAD	Glutamato decarboxilasa
GAT	Glutamato transaminasa
GOD-POD	Glucosa oxidasa
GODZ	Golgi apparatus-specific protein with the DHHC zinc finger domain
GRIF-1	GABA _A receptor-interacting factor 1
HAP1	Proteína asociada a hungtingina
[³ H]-FNZ	[³ H]-Flunitrazepam
ICD	Dominio intracelular
IHQ	Inmunohistoquímica
IGF-1	Insuline growth factor 1
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
icv	Intracerebroventricular
ip	Intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
Kd	Constante de disociación aparente
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
MF	Microfilamentos
MT	Microtúbulos
NA	Noradrenalina
N	Nidopallium
NK	Newman Keuls
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida

MSt	Medial Striatum
PI	Fosfoinosítidos
PI3-K	Fosfoinositido 3-kinasa
PKA	Protein-kinasa A
PKC	Protein-kinasa C
PL	Fosfolípidos
PLIC	Protein like ubiquination
PP – α_1	Proteinfosfatasa α_1
PPO	P-difenil oxazol
PRIP	Phospholipase C-related but catalytically inactive protein type 1
PVN	Núcleo paraventricular
RGABA _A	Receptores GABA _A
RGABA _B	Receptores GABA _B
RGABA _C	Receptores GABA _C
S.E.M	Error estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
SNARE	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors
TM	dominios transmembrana del receptor
VGAT	Vesículas de almacenamiento de GAT

RESUMEN

Las sinapsis inhibitorias del sistema nervioso central están mediadas principalmente por los receptores GABA_A asociados a un canal activado por Cl⁻, los cuales presentan variados sitios modulatorios. La regulación dinámica de su composición, distribución y expresión tiene consecuencias funcionales relevantes en la excitabilidad neuronal bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Un evento estresante produce cambios neuronales que dependen de neurotransmisores y hormonas, los cuales activan diversos mecanismos de señalización intracelular y extracelular. Se conoce que adrenalina periférica y noradrenalina central liberadas durante un estrés agudo, a nivel cerebral, activan diferentes subtipos de receptores adrenérgicos. Por lo tanto, esta liberación de noradrenalina central podría modular diferencialmente la inserción de receptores GABA_A a la membrana postsináptica, dependiendo de la vía noradrenérgica activada. En el presente trabajo de Tesis se estudiaron los efectos de diferentes dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricular sobre el comportamiento de pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto. Se observó que las dosis de noradrenalina más bajas (entre 0,025 y 0,10 µg) y las más altas (5,00 y 10,00 µg) indujeron una disminución sobre la latencia para comenzar a ambular en la prueba indicando una respuesta ansiogénica. Por lo tanto, el sistema noradrenérgico estaría participando en la inducción de la ansiedad quizás a través de la activación de vías noradrenérgicas que incrementan el “*arousal*” o estado de vigilia ante el ambiente nuevo. La administración intraperitoneal de 15 nmol/kg de yohimbina, antagonista selectivo α₂-adrenérgico, bloqueó el incremento inducido por noradrenalina en la latencia para ambular solamente a una dosis de 5,00 µg, mientras que la administración sistémica de 250 nmol/kg de propranolol, antagonista competitivo no selectivo β-adrenérgico, anuló este incremento sólo en la dosis de 0,025 µg de noradrenalina, hasta valores comparables con el grupo de aves administrado con solución fisiológica. Además, se observó que dosis de 2,50; 5,00 y 10,00 µg de noradrenalina incrementaron el reclutamiento de receptores GABA_A sensibles a flunitrazepam en sinaptosomas provenientes de cerebro anterior de pollos neonatos. Asimismo, la yohimbina coadministrada con noradrenalina bloqueó el incremento inducido por el estrés agudo de la prueba y las dosis altas de noradrenalina sobre los valores de densidad máxima de receptores GABA_A a valores alcanzados con noradrenalina sola, es decir que el reclutamiento de receptores GABA_A estaría siendo modulado a través de la

activación de receptores α_2 -adrenérgicos. Sin embargo, la administración de propranolol no modificó los valores de densidad máxima en aves estresadas respecto de los obtenidos con noradrenalina sola, es decir que a las dosis más bajas de noradrenalina no intervendrían los subtipos de receptores β -adrenérgicos sobre el reclutamiento de receptores GABA_A. Estudios de inmunohistoquímica revelaron que dosis de 0,025 y 5,00 μ g de noradrenalina incrementaron la expresión de la subunidad α_1 de receptores GABA_A en Nidopallium, mientras que en Medial Striatum sólo se observó un aumento a la dosis de 5,00 μ g respecto de aves inyectadas con solución fisiológica. Estas áreas están involucradas fuertemente en la respuesta emocional al estrés, por lo tanto, el incremento en la expresión de la subunidad α_1 de receptores GABA_A en estas zonas podría estar asociado al efecto ansiogénico inducido por la administración central de noradrenalina y la exposición a un Campo Abierto. Por otro lado, se investigó el efecto de diferentes dosis de insulina administrada centralmente sobre el comportamiento de pollos expuestos a un Campo Abierto y sobre el reclutamiento de receptores GABA_A. Sólo la dosis de 2,5 mUI/ μ l indujo un aumento significativo en la latencia de ambulación, mientras que diferentes dosis de insulina ensayadas incrementaron el reclutamiento de receptores GABA_A en aves no estresadas, quizás al estimular la fosforilación de los receptores y/o de sus proteínas y en consecuencia al incrementar el tráfico y la posterior inserción del receptor a la membrana. En conclusión, la noradrenalina central tendría un importante rol en la respuesta emocional y neuroquímica orquestando diversas actividades en el cerebro de pollos neonatos al modular dinámicamente la fuerza sináptica inhibitoria GABAérgica dependiendo del subtipo de receptor adrenérgico activado y de la localización de los receptores GABA_A involucrados.

SUMMARY

Inhibitory synapses in the central nervous system are primarily mediated by GABA_A receptors activated by Cl⁻ channels, which possess various modulatory sites. The dynamic regulation of its composition, distribution and expression has important functional consequences on neuronal excitability under physiological and pathophysiological conditions. A stressful event induces neuronal changes being dependent of neurotransmitters and hormones, which activate various signalling intra- and extra-cellular mechanisms. It is known that peripheral adrenaline and central noradrenaline released during acute stress, at cerebral level, activate different noradrenergic receptor subtypes. Therefore, the central noradrenaline release could differentially modulate the recruitment of GABA_A receptors to postsynaptic membrane, depending of the noradrenergic via activated. In this thesis, we studied the effects of different doses of noradrenaline injected intracerebroventricularly on the behavior of neonatal chicks exposed to an Open Field. It was observed that the lowest doses of noradrenaline (0.025 and 0.10 µg) and the highest ones (5.00 and 10.00 µg) induced a decrease of the latency to begin to ambulate indicating an anxiogenic-like response. Therefore, the noradrenergic system may be participating in the induction of anxiety perhaps through activation of noradrenergic pathways that increase the "arousal" or waking state to novelty. Intraperitoneal administration of 15 nmol/kg of yohimbine, selective α₂-adrenergic antagonist, blocked the noradrenaline-induced increase on the latency to ambulate only at a dose of 5.00 µg, whereas systemic administration of 250 nmol/kg propranolol, competitive non-selective antagonist β-adrenergic, suppressed the increase only at 0.025 µg of noradrenaline until values comparable to saline group. Furthermore, it was observed that doses of 2.50, 5.00 and 10.00 µg of noradrenaline increased flunitrazepam-sensitive GABA_A receptor recruitment in forebrain synaptosomes from neonatal chicks. Also, yohimbine co-administered with noradrenaline blocked the rise induced by acute stress and by the higher doses of noradrenaline on the maximum binding until values with noradrenaline alone, therefore GABA_A receptor recruitment would be modulated by activation of α₂-adrenergic receptors. However, the administration of propranolol did not change the maximum density values in stressed birds respect to noradrenaline alone, therefore at the lowest doses of noradrenaline would not participate subtypes of β-adrenergic receptors on the recruitment of GABA_A. Immunohistochemical studies revealed that doses of 0.025 and 5.00 µg of

noradrenaline increased the expression of subunit α_1 of GABA_A receptor in Nidopallium, while in Medial Striatum a single dose of 5.00 μg increased this expression compared to saline group. These areas are strongly involved in the emotional response to stress, therefore, the increased expression of the α_1 subunit of GABA_A receptors may be associated with the anxiogenic-like effect induced by central noradrenaline and exposure to an Open Field. On the other hand, we investigated the effect of different doses of insulin administered centrally on the behavior of chicks exposed to an Open Field and on the recruitment of GABA_A receptors. It was observed that only dose of 2.5 mIU/ μl induced a significant increase in latency of ambulation, whilst different doses of insulin increased GABA_A receptor recruitment in unstressed birds, perhaps by stimulating receptor phosphorylation and/or their proteins and, consequently by increasing traffic and subsequent insertion of the membrane receptor. In conclusion, the central noradrenaline would play an important role in the emotional response and neurochemistry orchestrating several activities in neonatal chick brain to dynamically modulate GABAergic inhibitory synaptic strength depending of adrenoceptor subtype activated and of localization of GABA_A receptors involved.

1-INTRODUCCION

El principal sistema de neurotransmisión inhibitorio en el Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados e invertebrados es el sistema GABAérgico y su actividad esta mediada por el ácido γ -aminobutírico (GABA). El GABA es uno de los neurotransmisores más abundantes en el cerebro, está encargado de regular la excitabilidad neuronal y por lo tanto está implicado en numerosos procesos fisiológicos como patológicos. Las interneuronas GABAérgicas están ampliamente distribuidas en todo el cerebro, se localizan en corteza, hipocampo, hipotálamo, cerebelo, estructuras límbicas y su función está asociada a distintitos subtipos de receptores. Desde la década del '50, se estudia el importante rol de las sinapsis GABAérgicas en el desarrollo de diversas patologías. Se conoce que un déficit en la expresión funcional de los receptores GABAérgicos, principalmente los receptores GABA_A, están asociados con epilepsia, desórdenes de ansiedad, déficit cognitivo, esquizofrenia, depresión y otras alteraciones psiquiátricas (Jacob y col, 2008).

El GABA es sintetizado a partir del aminoácido glutamato y esta reacción es catalizada por la enzima *glutamato decarboxilasa* (GAD), así es introducido en vesículas y acumulado en las neuronas presinápticas. El GABA que no interacciona con los receptores postsinápticos puede seguir dos caminos: *i*) ser recaptado por la neurona presináptica o por células gliales ó *ii*) ser catabolizado por la enzima *glutamato transaminasa* (GAT) a succinato (Ganong y col, 2010). En la figura 1, se observa un esquema de este mecanismo de transmisión inhibitoria mediada por el sistema GABAérgico.

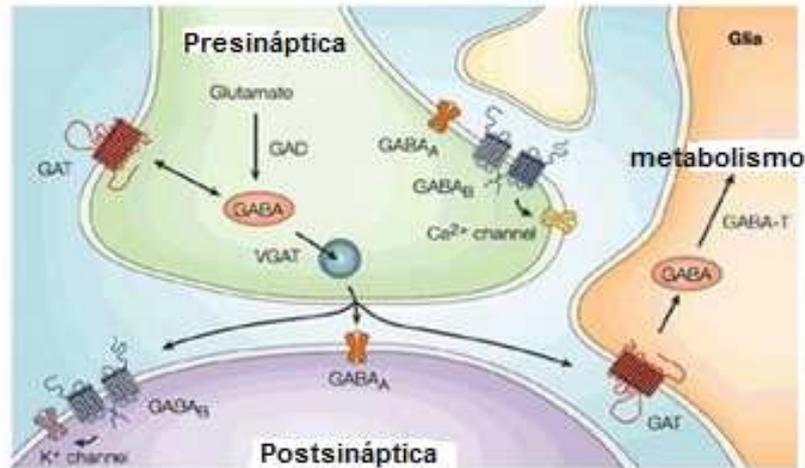


Figura 1- Síntesis y recaptación del neurotransmisor GABA. El GABA es un producto del metabolismo del Glutamato, el cual es almacenado en vesículas (VGAT), es liberado tras la despolarización sináptica, luego se une a receptores postsinápticos y presinápticos, para finalmente ser inactivado por diferentes mecanismos. Por un lado es recaptado por proteínas transportadoras, para ser metabolizado por enzimas específicas (GAT) en las células gliales o unirse a receptores de la membrana presináptica, y ser internalizado nuevamente en la neurona. Fuente: Owens y Kriegstein (2002).

El GABA una vez liberado al espacio sináptico puede interactuar con los receptores GABA_A, GABA_B y/o GABA_C. Los receptores GABA_A (RGABA_A) son receptores ionotrópicos pertenecientes a la superfamilia de receptores con actividad asociada a un canal activado por ligando (Schofield y col, 1987), que también incluye al receptor nicotínico de acetilcolina, al receptor de glicina sensible a estricnina y al receptor de serotonina tipo 3 (5-hidroxi-triptamina₃) (Kaila, 1994; Mehta y Ticku, 1999; Arias y col, 2002). Los RGABA_A forman un canal aniónico permeable al Cl⁻, cuya apertura es inducida por la unión del ligando GABA al receptor, provocando la consecuente hiperpolarización de la membrana postsináptica y de esta manera impidiendo la transmisión del impulso nervioso. Este neurotransmisor también puede unirse a los RGABA_B (receptores metabotrópicos) asociados a proteína G, aumentando la permeabilidad al K⁺ y transmitiendo la señal a través de segundos mensajeros. Estos receptores están localizados en la membrana pre y postsináptica, son estructuras oligoméricas formadas por las subunidades GABA_{B1a} o GABA_{B1b} y una subunidad GABA_{B2} (Bettler y Tiao, 2006). El avance de técnicas genéticas y moleculares, permitieron detectar la existencia de una familia auxiliar del RGABA_B y definir que los

mismos estarían compuestos por complejos de las subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2}, los cuales estarían fuertemente unidos a subunidades auxiliares, formando tetrámeros. Las subunidades auxiliares forman parte de la subfamilia de KTCD (*potassium channel tetramerization domain-containing*), y estas cambian significativamente las propiedades de los RGABA_B. Por lo tanto, la composición de los distintos subtipos de RGABA_B serían los responsables de la farmacocinética y farmacodinamia de este receptor (SchweNewman Keulsky col, 2010).

Los RGABA_C pertenecen a la familia de receptores con actividad asociada a un canal activado por ligando, formado por pentámeros de las subunidades ρ_{1-3} , pueden ser homoméricos, heteroméricos o pseudo-heteroméricos y la combinación de las cinco subunidades forman un canal de Cl⁻. Están localizados en SNC y en órganos periféricos. Cuando estos receptores se activan pueden producir la inhibición neuronal a nivel presináptico (despolarización) o postsináptico (hiperpolarización) (Perfilova y Tiurenkov, 2011).

En resumen, podemos señalar que el GABA cuando se une a sus diferentes subtipos de receptores produce que el impulso nervioso no se transmita por distintos mecanismos con una consecuencia funcional similar, debida al aumento de la diferencia de potencial entre el lado interno y externo de la neurona, por lo tanto, la excitabilidad de la neurona a otros estímulos se encuentra disminuida (Ganong y col, 2010).

1.1-Receptor GABA_A

Los RGABA_A están compuestos por 5 proteínas integrales de membrana y la heterogeneidad de este receptor estaría asociada con la combinación de las distintas subunidades ensambladas formando un canal de Cl⁻, cuya apertura es inducida por el ligando natural GABA (Fig.2). Se han identificados 19 genes que codifican para las 16 subunidades (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3}) que conforman los distintos subtipos de RGABA_A (Simon y col, 2004; Olsen y Sieghart, 2009). Estudios inmunohistoquímicos y de hibridización *in situ* mostraron que la combinación más frecuente del RGABA_A en el cerebro es la compuesta por las subunidades α , β y γ con una estequiometría de 2:2:1. Además, se observó que la subunidad γ puede ser sustituida por otras subunidades δ , ϵ , θ y

π según su localización (Pirker y col, 2000). Por lo tanto, hasta ahora se conoce que los receptores nativos pueden estar conformados por la composición α , β , γ o por la combinación α , β , δ ubicados en sitios sinápticos y extrasinápticos, respectivamente (Sieghart y Sperk, 2002).

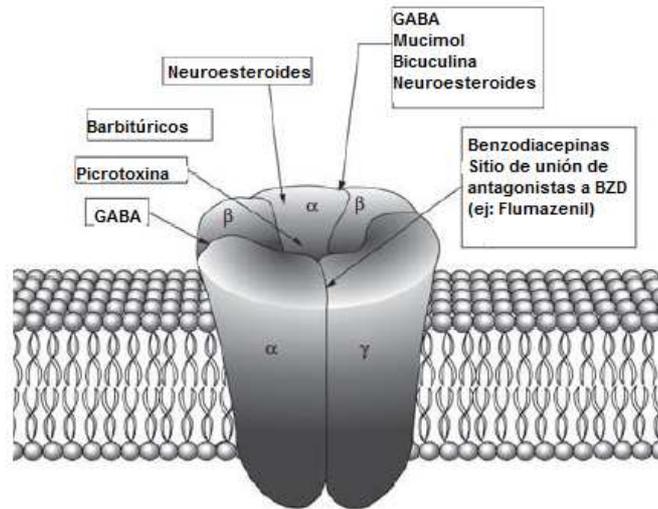


Figura 2- Estructura del RGABA_A. Este modelo del receptor GABA_A está compuesto por cinco subunidades, dos subunidades α , dos β , y una γ siendo esta combinación la más abundante en el cerebro. Además, se observa que en la interfase entre las subunidades α , y β está el sitio de unión al GABA, mientras que en la interfase entre α , y γ el sitio de unión a las benzodiazepinas. Asimismo, se pueden unir al receptor numerosos fármacos con acción agonista como el muscimol, y diferentes tipos de antagonistas como la picrotoxina, bicuculina o flumazenil. También se pueden unir neuroesteroides, barbitúricos, anestésicos, entre otros. Fuente: Makkar y col. (2010).

Las subunidades del RGABA_A están compuesta por una larga región extracelular aminoterminal, seguida por 4 dominios transmembrana hidrofóbicos llamados TM1, TM2, TM3, TM4, que finaliza en un dominio carboxiloterminal extracelular. Se conoce que en los dominios intracelulares entre TM3 y TM4 se encuentra el dominio intracelular el cual sufre modificaciones posttranscripcionales, además posee sitios de fosforilación por diversas quinasas además de sitios de interacción con numerosas proteínas citosólicas implicadas en la regulación y tráfico del receptor hacia la membrana (Vithlani y col, 2011). Estos sitios están esquematizados en la figura 3.

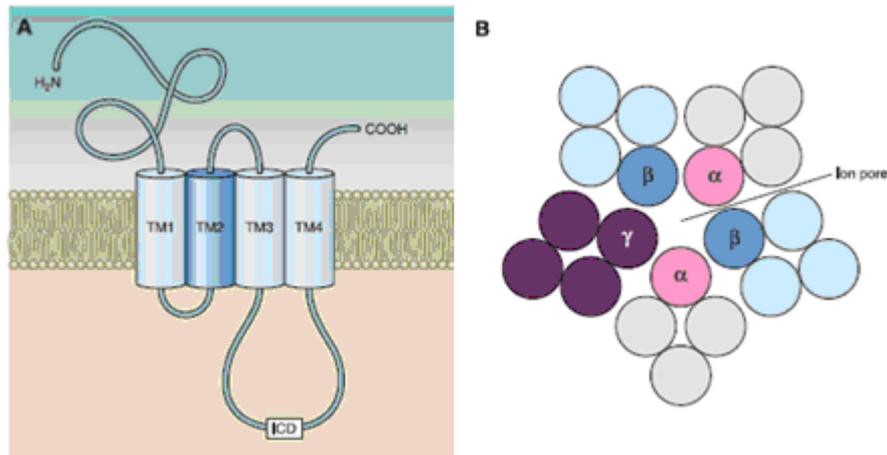


Figura 3. A) Estructura de las subunidades del RGABA_A: se puede observar la región extracelular aminoterminal, seguida por los dominios transmembrana TM1-TM4 que poseen una estructura α -helice, y luego por la región carboxiloterminial extracelular. Cada subunidad del receptor contiene un dominio intracelular (ICD) que se encuentra entre TM3 y TM4, que media un gran número de interacciones proteína-proteína y sufre modificaciones post-transcripcionales. B) Vista transversal del ensamblaje de las subunidades del RGABA_A formando el canal iónico permeable al Cl⁻. Fuente: Vithlani y col. 2011.

El sitio de unión al GABA estaría ubicado en la interfase de las subunidades α y β , cuando el ligando se une produce la apertura del canal con un influjo de Cl⁻ hacia el interior neuronal, causando la hiperpolarización de la membrana y marcando el final de la transmisión nerviosa. Los RGABA_A además del sitio de reconocimiento al GABA poseen sitios para la unión numerosos ligandos alostéricos, como esteroides, barbitúricos y benzodiazepinas (BZD) entre otros (Mohler, 2006). La actividad de los RGABA_A puede ser modulada por agonistas de GABA como el muscimol que aumenta la actividad del canal o puede ser bloqueada por antagonistas como bicuculina o picrotoxina (Macdonald y Olsen, 1994; Sieghart, 1995). El muscimol es un agonista del RGABA_A, cuyo sitio de unión se encuentra en la interfase de las subunidades α y β (Mehta y Ticku, 1999) y como consecuencia de esta unión habría un aumento de la inhibición neuronal (Johnston, 1996). El sitio de unión de las benzodiazepinas se localiza en la porción extracelular N-terminal del receptor en la interfase entre las subunidades α y γ , siendo la subunidad γ

fundamental para producir receptores con sensibilidad a la modulación por benzodiazepinas (Benson y col, 1998).

Los barbitúricos y neuroesteroides se unen en otros sitios en el receptor, y estos serían capaces de potenciar el efecto producido por el GABA sobre el canal de Cl⁻ (Mehta y Ticku, 1999). La unión de BZD a su sitio en el receptor involucra un aumento de la frecuencia de la apertura del canal de Cl⁻ sin mostrar alteraciones en el tiempo de apertura, mientras que los barbitúricos producen un mayor tiempo de apertura del canal (Mc Donald y col, 1989; Steinbach y col, 2001). Por lo tanto, ambos moduladores aumentarían la fuerza sináptica de la neurotransmisión GABAérgica. Se conoce que los efectos del diazepam (agonista del sitio BZD) ocurren sobre receptores con diferente conformación, se reportó que los efectos sedativos y anticonvulsivantes estarían relacionados con los receptores con la conformación $\alpha_1, \beta, \gamma_2$ (Rudolph y col, 1999; Mc Kernan y col, 2000), mientras que los efectos ansiolíticos serían mediados principalmente por receptores compuestos por $\alpha_2, \beta, \gamma_2$ (Löw y col, 2000). Los antagonistas del RGABA_A, como la bicuculina, competiría con la unión del GABA al receptor, mientras que la picrotoxina tendría su sitio de unión sobre el canal de Cl⁻ produciendo el cierre del mismo y de esta manera por diferentes mecanismos ambos producirían la disminución de la transmisión inhibitoria (Johnston, 1996) (Fig. 2).

Desde el comienzo de las investigaciones científicas el RGABA_A estuvo asociado con inhibiciones rápidas o fásicas del SNC mediante la interacción con receptores postsinápticos, sin embargo se conoce que el RGABA_A también es capaz de participar en inhibiciones sinápticas lentas o tónicas mediadas por subtipos de receptores localizados fuera o cerca del botón sináptico (Mody y Pearce, 2004; Farrant y Nusser, 2005). Esta ampliamente descrito que el RGABA_A posee una compleja heterogeneidad, la cual estaría dada por la combinación de las distintas subunidades que dan origen a los diferentes subtipos de receptor con diferente abundancia y localización en el cerebro. Con diferentes técnicas de inmunomarcación se determinó que los receptores localizados en sitios sinápticos están compuestos principalmente por subunidades con la combinación $\alpha_{1/3}, \beta_{2/3}, \gamma_2$ (Chang y col, 1996; Fisher y col, 1997). Además, ha sido descrito que los receptores compuestos por subunidad α_2 están fuertemente expresados en zonas axonales, y aquellos que contienen la subunidad α_1 están ubicados en la zona somadendrítica de la sinapsis

(Lüscher y Keller, 2004). En referencia a la subunidad β , se conoce que el subtipo β_1 es el menos expresado, mientras que β_2 y β_3 están fuertemente expresados aunque β_2 sería la más abundante y estaría extensamente distribuida (Sur y col, 2001). En cerebelo la subunidad γ_2 está asociada a conformaciones del receptor en zonas postsinápticas, mientras que las subunidad δ se encontró casi exclusivamente en zonas extrasinápticas siendo abundante en dendritas y somas extrasinápticos, pero no se detectó expresión de esta subunidad en localizaciones sinápticas (Nusser, 1998). Ha sido reportado que los receptores que contienen la subunidad δ producen una corriente inhibitoria tónica, ya que son sensibles a muy bajas concentraciones de GABA en el orden nanomolar y mantienen abierto el canal de Cl⁻ más tiempo (Saxena y Macdonald, 1994). Por lo tanto, se postula que la inhibición tónica producida por los receptores extrasinápticos estaría mediada por RGABA_A con la composición $\alpha_{4-6}, \beta, \delta$ con distinta distribución (Brickley y col, 1999). Se reportó que los receptores ubicados en sitios extrasinápticos son insensibles a BZD (Olsen y Sieghart, 2009) y que las subunidades α_4 y α_6 se ensamblan formando complejos con las subunidades δ , por lo tanto los receptores con la composición $\alpha_4, \beta_3 \delta$ y $\alpha_6, \beta_3 \delta$ se localizan exclusivamente en sitios extrasinápticos y median la inhibición tónica en cerebelo y tálamo (Nusser, 1998). La subunidad α_5 del RGABA_A pudo identificarse en zonas sinápticas y extrasinápticas, contribuyendo tanto a la inhibición fásica como tónica (Bruning y col, 2002; Caraiscos y col, 2004; Serwanski y col, 2006). Sin embargo, se considera que los receptores extrasinápticos compuestos por las subunidades α_5 y δ son los principales receptores que median las sinapsis inhibitorias tónicas (Jacob y col, 2008).

Fig.4.

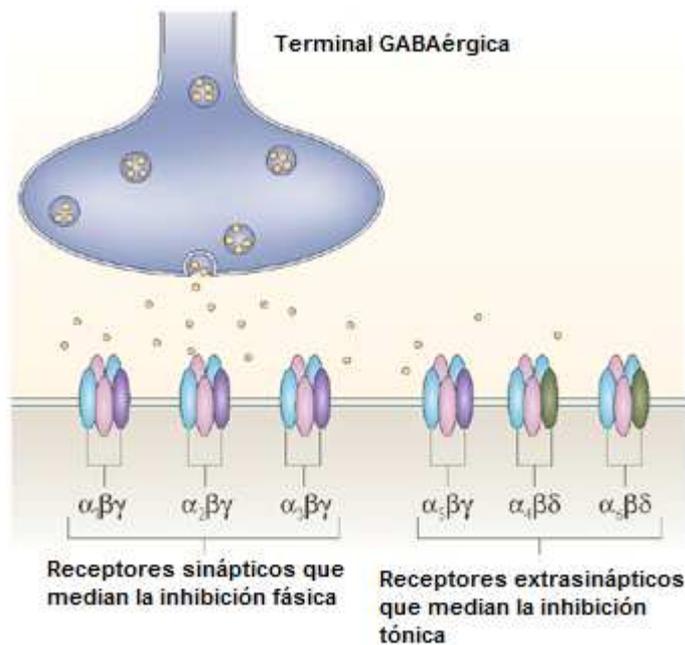


Figura 4- Composición de los RGABA_A según su localización en la sinapsis: los RGABA_A compuestos por las subunidades $\alpha_{1-3}, \beta_2, \gamma_2$ están localizados principalmente en sitios sinápticos, y median las inhibiciones rápidas o fásicas. Mientras que los compuestos por $\alpha_{4-6}, \beta_3, \delta$ se encuentran localizados extensamente en zonas extrasinápticas, y están involucrados en las inhibiciones lentas o tónicas. Fuente: Jacob y col. (2008)

1.2- Tráfico del RGABA_A

La síntesis, el ensamblaje y la posterior inserción de RGABA_A sobre la membrana postsináptica es un proceso cuidadosamente regulado, en el cual intervienen numerosas proteínas de diversa naturaleza y función. Este proceso es altamente dinámico, involucra la exocitosis y endocitosis del receptor y este ciclo continuo es el que regula la fuerza de la inhibición neuronal (Vithrani y col, 2011). Comprende dos fases bien diferenciadas *i*) la exocitosis del receptor y su inserción en la membrana plasmática y *ii*) la endocitosis del receptor desde la membrana hacia el interior celular y su degradación.

1.2.1- Exocitosis del RGABA_A

Los procesos de síntesis y el ensamblaje de las diferentes subunidades del receptor se producen dentro del retículo endoplasmático y a pesar de que existen numerosas combinaciones teóricas de subtipos de receptor que pueden ser sintetizados, solo un número limitado de receptores maduros puede expresarse en la membrana postsináptica. Combinaciones incorrectas del receptor que pueden estar formadas por homómeros o heterómeros conformados por dos subunidades son retenidas y luego degradadas por proteosomas (Kittler y col, 2002; Vithrani y col, 2011). Por lo tanto, en el retículo endoplasmático se produce un minucioso control del ensamblaje que involucra principalmente chaperonas y calnexina, que sufren un proceso de poliubiquitinación para después ser degradadas (Connolly y col, 1996). Existen proteínas capaces de inhibir este proceso denominadas *protein like ubiquination* (PLIC), en especial la PLIC-1 estaría asociada a estabilizar las conformaciones correctamente sintetizadas y ensambladas del receptor, por ejemplo las subunidades α y β , aumentando el tiempo de vida media en el retículo endoplasmático así como facilitando la acumulación del RGABA_A en la sinapsis (Bedford y col, 2001; Vithrani y col, 2011). Luego de sufrir este proceso de selección altamente específico, las subunidades correctamente sintetizadas y ensambladas pasan al complejo de Golgi donde se unen a un complejo de proteínas específicas asociadas con la subunidad γ de los RGABA_A llamadas GABARAP (*GABA receptor-associated protein*) con la capacidad de unirse a otras estructuras presentes en el citoesqueleto como los microtúbulos y a un factor muy importante en este proceso que es el NSF (*Nethylmaleimide-sensitive factor*). Dentro del Golgi se forma un complejo receptor-GABARAP-NSF que facilita su posterior inserción en la membrana plasmática. Existen evidencias de que el complejo de proteínas GABARAP estaría fuertemente relacionado con la subunidad α_2 , ya que estudios realizados en cultivos neuronales mostraron que una sobreexpresión de las GABARAP, producía un aumento de inhibición neuronal con isoformas del receptor que involucran la subunidad α_2 (Leil y col, 2004). Además se publicó que las GABARAP estarían asociadas con la inserción de los RGABA_A en la membrana plasmática y con el tiempo que estos se mantienen expuestos en la superficie (Mardsen y col, 2007). Conjuntamente suceden otras reacciones dentro del Golgi, como por ejemplo la unión de la subunidad β con NSF y BIG-2 (*brefeldina inhibited GDP-GTP factor*) que modula el tráfico del receptor, posteriormente la enzima GODZ (*Golgi specific DHHC zinc finger domain protein*) es una palmitoiltransferasa que regula la palmitoilación de las subunidades α , siendo este un paso crítico en la inserción del receptor

a la membrana plasmática. Finalmente el receptor interactúa con otras proteínas relevantes para su tráfico y correcta inserción en la superficie, estas son las PRIP (*phospholipase C catalytically inactive*), que modulan los RGABA_A funcionales regulando su fosforilación. Se ha demostrado que la fosforilación es un proceso altamente dinámico que puede modular los RGABA_A funcionales, siendo la subunidad β el sustrato para la PKC (*protein kinase C*) y PKA (*protein kinase A*) dependiente de AMP cíclico (Kittler, 2003). Las PRIP-1 regulan el tráfico del receptor conjuntamente con las GABARAP, hay evidencias de que una de las funciones de las PRIP sería asegurarse que solo los receptores de conformación α, β, γ sean correctamente insertados en la membrana. Además, se ha observado que las PRIP-1 se pueden unir al dominio intracelular del receptor sirviendo como una proteína adaptadora de una fosfatasa (PP-α1) implicada en la modulación fosfo-dependiente de la expresión de los RGABA_A funcionales (Teruma y col, 2004). La defosforilación de los RGABA_A es determinada por la PP-α1 y esta fosfatasa es inactivada cuando se une a PRIP-1 (Yoshimura, 2001). Se reportó que otra isoforma de PRIP (PRIP-2) también se puede unir a GABARAP y la PP-α1, sugiriendo que el rol principal de las diferentes isoformas de PRIP sería modular la expresión de RGABA_A funcionales (Uji, 2002) Fig.5.

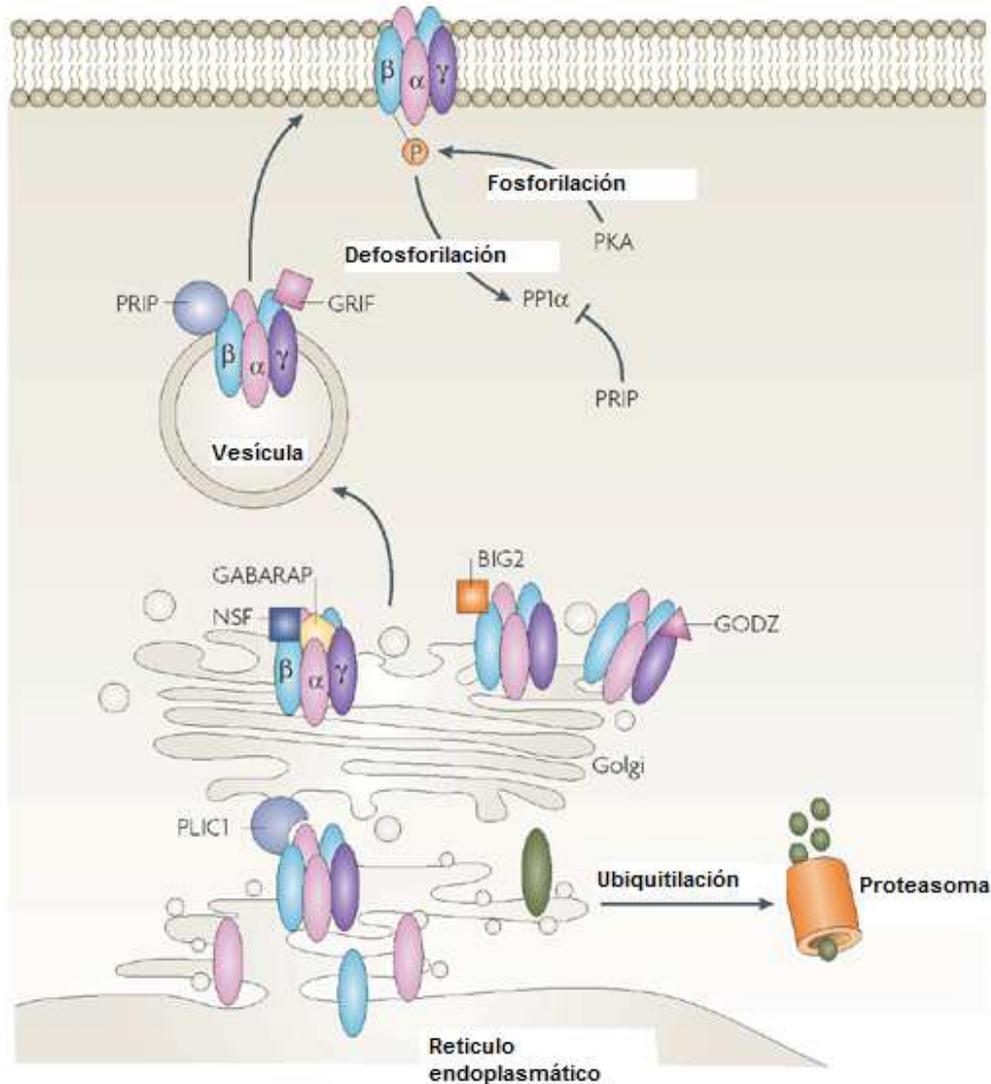


Figura 5- Esquema de la síntesis, ensamblaje y posterior inserción del RGABA_A maduro en la membrana plasmática. Se muestra como las subunidades del RGABA_A son sintetizadas y ensambladas en el retículo endoplásmico. Este es un proceso regulado cuidadosamente. Luego las diferentes subunidades del receptor pueden ser moduladas por ubiquitilación y finalmente son degradación por los proteasomas. Las subunidades del RGABA_A ubiquitiladas pueden ser moduladas por las PLIC 1, las cuales facilitan la acumulación de los receptores en la sinapsis previniendo la degradación de los RGABA_A ubiquitilados. Posteriormente salen del aparato de Golgi los receptores correctamente ensamblados, para luego ser expuestos en la membrana plasmática. Proteínas asociadas al RGABA_A facilitan su salida del Golgi y su tráfico hasta la membrana. Entre las más importantes, se encuentran la GABARAP que puede asociarse a la subunidad γ₂, el NSF y la BIG-2 (localizados en el Golgi) que se asocian a la subunidad β del receptor y regulan su tráfico. Las subunidades δ sufren el proceso de palmitoilación, por medio de una palmitoiltransferasa (GODZ), el cual es un factor determinante para la posterior inserción del receptor en la membrana plasmática. Otras proteínas que están involucradas en la fosforilación del receptor son las PRIP y PKA, mientras que las PP-α1 están asociadas a la defosforilación, como se explica anteriormente. Fuente: Jacob y col. (2008).

1.2.2- Endocitosis del RGABA_A.

El mecanismo de internalización del GABA unido a RGABA_A involucra una endocitosis clatrina-dependiente. Existe un grupo de receptores acumulados en sitios específicos de la membrana plasmática que son reconocidos y luego invaginados en una vesícula cubierta por clatrina. En este proceso intervienen otras moléculas que son importantes para la endocitosis del receptor, entre ellas la dinamina (componente del citoesqueleto) y el complejo proteico AP2 (*clatrin-adaptor-protein*), por lo tanto las interacciones entre estos componentes resulta finalmente en la formación de las vesículas formadas por clatrina y proteínas que recubren al receptor. Se conoce que los dominios intracelulares de las subunidades (β_{1-3} y γ) interaccionan con el complejo AP2, hay evidencias que las subunidades β_2 poseen sitios señalizados por un motivo leucina-leucina que son reconocidos por la AP2 y son muy importantes para la endocitosis mediada por clatrina (Hass y Macdonald, 1999; Herring, 2003). Además, se pudo identificar un motivo atípico en AP2 que puede unirse a los dominios intracelulares de la subunidad β del RGABA_A, que contienen los principales sitios fosforilables por PKA y PKC (Kittler y col, 2005). Se identificó un péptido de un motivo de AP2 que es capaz de unirse con alta afinidad a la subunidad β_3 del RGABA_A solo cuando éste es defosforilado (Kittler y col, 2005). En conjunto estos resultados sugieren que la fosforilación de las subunidades del RGABA_A unidas a diferentes sitios de la AP2 podrían regular la estabilidad del receptor en la superficie, así como la fuerza de la inhibición sináptica. Asimismo, estos resultados podrían describir el mecanismo por el cual el neurotransmisor y/o los factores de crecimiento regulan la actividad de las quinasas y fosfatasa, influenciando en la eficacia de la transmisión sináptica inhibitoria regulada por la fosforilación del RGABA_A y su endocitosis. (Yan y col, 1997; Kittler y col, 2003; Cheng y col, 2006).

Una vez internalizado el receptor, las vesículas pierden la cubierta de clatrina y se fusionan para formar un endosoma temprano, los receptores endocitados pueden seguir dos caminos, *i*) ser rápidamente reciclados ó *ii*) ser degradados vía lisosomal. En este proceso está involucrada la proteína HAP-1 (*Huntinting associated protein*) la cual puede interactuar con subunidades β del RGABA_A y promover su reciclaje hacia la membrana al inhibir su degradación. Existen estudios realizados en ratas mostraron que una supresión selectiva hipotalámica de las HAP-1 estaban relacionadas con una disminución en el apetito de estos animales, tal vez inducidos por una menor densidad de RGABA_A expuestos en membrana (Sieghart, 2006). Otra proteína relacionada con el proceso de endocitosis es la

Gefirina. Existen numerosas evidencias de que la gefirina interactúa con moléculas del citoesqueleto como la actina y tubulina, y de forma indirecta con proteínas motoras como la dineína (Ernst y col, 2005). Se ha localizado a la gefirina en neuronas de hipocampo y corticales, observándose una alta concentración de esta proteína en sitios postsinápticos (Vithrani y col, 2011). Estudios moleculares permitieron establecer la ubicación subcelular de la gefirina, sugiriendo que la gefirina puede anclar los RGABA_A en la membrana plasmática, actuaría de manera directa anclando e inmovilizando los receptores por medio de un entrecruzamiento con tubulina y actina (Rudolph y Mohler, 2004), pero también podría actuar de manera indirecta uniéndose a otras proteínas motoras del citoesqueleto, como la dineína y microfilamentos (Ernst y col, 2005). En 2008, se demostró por primera vez en experimentos *in vitro* que la gefirina puede unirse directamente en los dominios intracelulares de la subunidad α_2 del RGABA_A, bajo estas mismas condiciones experimentales se observó una unión muy débil a las subunidades β_3 y γ_2 , sugiriendo que la subunidad α tendría un rol muy importante en la acumulación sináptica de los RGABA_A por su habilidad para unirse directamente con gefirina (Tretter y col, 2008) Fig 6.

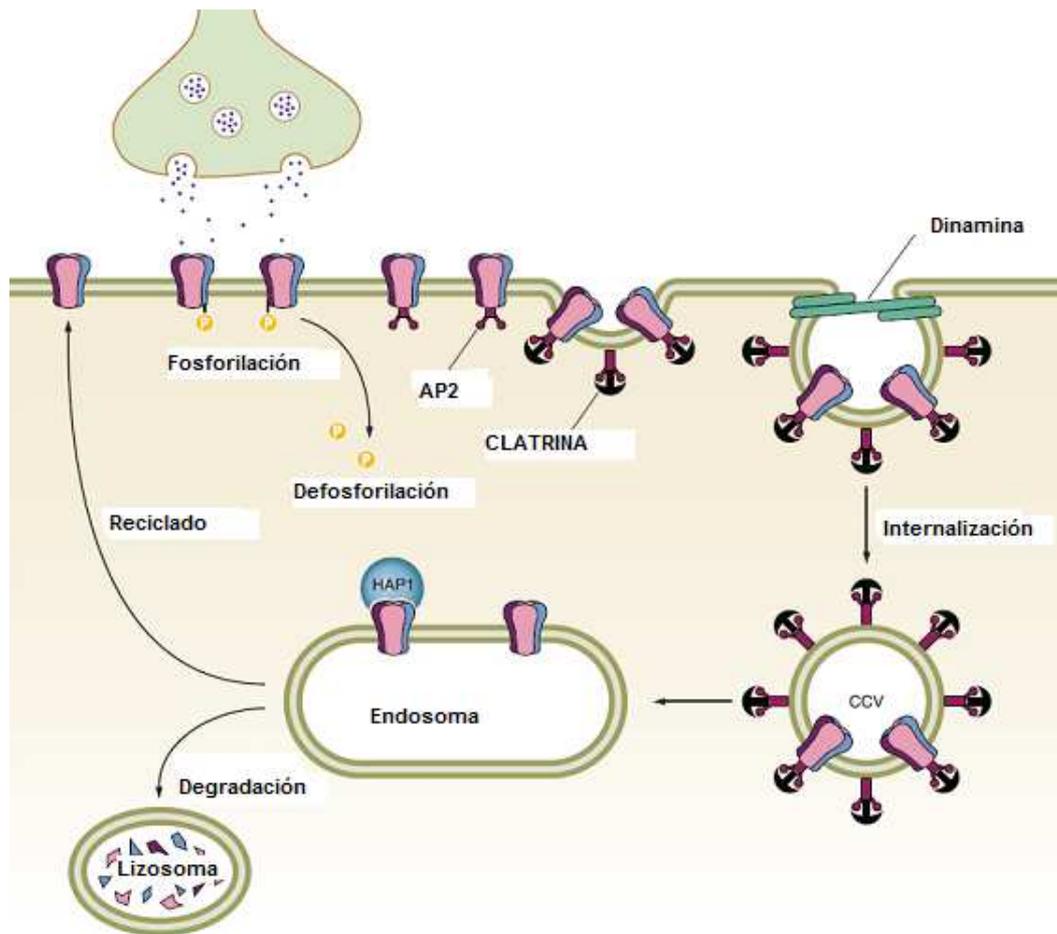


Figura 6- Mecanismo de endocitosis de RGABA_A dependiente de clatrina. Los receptores se acumulan en estructuras especializadas de la membrana cubiertas de clatrina, las cuales se invaginan y luego forman las vesículas cubiertas de clatrina (CCV), este proceso es dependiente de dinamina. La proteína adaptadora de clatrina (AP2) es crítica en este paso, ya que interviene en la unión de las proteínas de la membrana plasmática y la clatrina. Posteriormente las vesículas se fusionan con endosomas tempranos. Por lo tanto, los receptores internalizados sufren un reciclaje rápido ó son el blanco para la degradación lisosomal. El proceso endocítico de los RGABA_A esta regulado por las HAP-1. Fuente: Vithlani y col. (2011).

1.3-Fosforilación del RGABA_A

Las proteínas implicadas en el proceso de fosforilación son fundamentales para la señalización celular. La reacción de fosforilación comprende la transferencia de un grupo fosfato desde ATP a un residuo serina, treonina o tirosina catalizados por proteínas kinasas, mientras que el proceso de defosforilación es catalizado por fosfatasas. Estudios

electrofisiológicos en cultivos neuronales, donde se activa el canal por aplicación de GABA sugieren que el RGABA_A tiene una conformación activa y otra inactiva, las cuales estarían fosforilada y defosforilada respectivamente (Mehta y Ticku, 1999). La activación de las proteínas kinasas implicadas en la fosforilación del RGABA_A podrían generar un mecanismo de señalización intracelular que afectaría directamente el tráfico y la función de estos receptores (Moss y Smart, 1996; Brandon y col. 2002; Kittler y Moss, 2003). Se conoce que el tiempo que permanece expresado el RGABA_A en la membrana postsináptica depende de la fosforilación del receptor y de proteínas asociadas a éste (Kittler y Moss, 2003). La fosforilación del receptor también está asociada a diversos procesos que alteran la conductancia o cinética del canal iónico, la farmacocinética del receptor a distintos fármacos, así como el tráfico de éste hacia la membrana plasmática (Vithlani y Moss, 2009). Por ejemplo, se ha observado que la fosforilación del RGABA_A en las subunidades β y γ_2 afectan la apertura del canal de Cl⁻ alterando las corrientes iónicas y este efecto fue inducido por PKC, PKA y tirosina kinasa (Moss y col, 1995; Moss y Smart, 1996; Brandon y col, 2000).

Se ha observado una gran variedad de efectos inducidos por la PKC en el receptor GABAérgico provocadas por diferencias de temperatura, de sistema experimental, entre otros factores. Estudios *in vitro* mostraron que la PKC está relacionada con la expresión del receptor en membrana, y que las subunidades β y γ_2 en la forma no fosforilada eran encontradas junto con la AP2 (Conolly y col, 1999; Filippova y col, 2000). Sin embargo, los efectos más relevantes de la PKC estarían relacionados directamente con la fosforilación de la subunidad β e indirectamente con la subunidad γ_2 (Kittler y Moss, 2003; Moss y col, 1995). Además, la PKC puede intervenir en la modulación positiva de neuroesteroides sobre el RGABA_A (Brandon y col, 2002). Se mostró que la PKA puede fosforilar directamente al RGABA_A y modular su actividad (Ives y col, 2002; Brandon y col, 2003). Se conoce que la regulación de las sinapsis inhibitorias ocurre por un mecanismo de fosforilación de los RGABA_A mediado por PKA, que depende del tipo celular y de las subunidades que componen los receptores en la membrana postsináptica (Nusser y col, 1999). Se identificó que la fosforilación selectiva de las subunidades β_1 y β_3 del receptor por la PKA regulan de manera diferencial la función de los RGABA_A (Brandon y col, 2003).

La proteína kinasa dependiente de calcio-calmodulina (CAMK-II), es una quinasa que responde al aumento intracelular de Ca²⁺ (Soderling y col, 2002; Hudmon y

Schulman, 2002; FiNewman Keulsy Meyer, 2002). Se conoce que la fosforilación de la CaMK II depende de la composición de las subunidades del RGABA_A, así como su localización en sitios sinápticos o extrasinápticos (Houston y col, 2009). Estudios de inmunofluorescencia en cerebelo mostraron que las sinapsis inhibitorias podrían ser mediadas por los receptores con subunidades β_2 ó β_3 . En el giro dentado la localización de las subunidades β_2 sería preferentemente en sitios extrasinápticos, mientras que los receptores que contiene las subunidades β_3 en zonas sinápticas (Herd y col, 2008). Estudios *in vitro* mostraron que la CaMK II puede fosforilar residuos de serina y de treonina de la subunidad α_2 , implicados en procesos neuronales (Houston y Smart, 2006).

Por lo tanto, la fosforilación del RGABA_A involucra la actividad de diversas proteínas kinasas que desencadenarían mecanismos intracelulares que afectan de una manera directa y rápida, tanto el tráfico como la función de los receptores expuestos en la membrana plasmática, localizados en sitios sinápticos o extrasinápticos.

1.4- Concepto de estrés

La palabra **estrés** proviene del latín *stringere* que significa tensión, presión. En la década del '30 Hans Selye fue uno de los primeros médicos fisiólogos en estudiar los efectos producidos por el estrés en pacientes internados. En los '50 Selye publica sus primeros estudios y define al estrés en términos de respuesta: "*El estrés es una respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda que se le imponga*", se refiere a la demanda como el estímulo estresor, y la respuesta que elabora el organismo puede ser psicológica o fisiológica (Selye, 1956). Actualmente, el estrés puede ser definido como un fenómeno complejo que comprende una respuesta específica, que depende de un evento en particular, de la percepción del organismo de un estresor y de la habilidad para mantener la homeostasis (Goldstein, 2001). Por lo tanto, el concepto de estrés implica la respuesta comportamental o fisiológica ante cualquier estímulo, sea físico, psicológico, externo o interno, para mantener un estado de equilibrio del organismo consigo mismo y con el ambiente. Según esta respuesta se clasifica al estrés de dos formas: *eustrés* o *distrés*. El término *eustrés* se usa para representar aquellos estímulos que producen una respuesta positiva o beneficiosa en el individuo, como por ejemplo el éxito laboral, o la alegría del nacimiento de un hijo, un trabajo agradable, etc. El individuo es motivado y puede

manifestarlo en su comportamiento, con mayor eficiencia y rendimiento en el trabajo, mayor iniciativa, mostrando bienestar y equilibrio psicoemocional derivado de experiencias agradables. Por otro lado, tenemos el *distrés* que hace referencia a un estado de angustia, pena o aflicción, que es desencadenado por estímulos desagradables que provoca un desequilibrio fisiológico y psicológico del individuo, que incluye cambios en los estados de ánimo, disminución de la actividad del individuo, aparición de enfermedades psicosomáticas o envejecimiento acelerado, entre otros (Lazarus y Folkman, 1984). La psicología define al estrés como un proceso adaptativo, que es imprescindible para la supervivencia de los seres humanos, y considera que el estrés no es una emoción sino un generador de emociones (Bensabat, 1987). Entonces, en términos psicológicos el estrés es una relación entre la persona y su ambiente, donde el individuo percibe una amenaza potencial o real y elabora una respuesta para enfrentarse a ellas según sus propios recursos para tratar de mantener su bienestar (Lazarus y Folkman, 1984). Por lo tanto, la valoración del estrés como positivo o negativo va a depender de cada individuo y de sus estrategias para mantener el equilibrio del organismo. Sin embargo, sabemos que el ambiente está en constante cambio y que los individuos deben tener una reinterpretación del nuevo contexto para elaborar una respuesta y manifestar un comportamiento (Olga y Terry, 1997). Sterling y Eyer proponen usar la palabra “*Alostasis*” para referirse a aquellos procesos activos donde el organismo interacciona con su ambiente y produce cambios fisiológicos notables para mantener la homeostasis. Sin embargo, si el estresor persiste los disturbios generados a nivel fisiológico o psicológico pueden tener una respuesta más drástica generando diversas patologías (Sterling y Eyer, 1988). De acuerdo a esto se introdujo otro término como es la “*carga alostática*”, que se refiere a cambios psicológicos, fisiológicos o comportamentales originados por un estresor y la respuesta (adaptativa o ineficiente) del organismo (McEwen, 1998). Debido a que cada individuo posee diferentes estrategias de afrontamiento frente a un estresor, Charney introduce el término “*resiliencia*” y hace referencia a la capacidad de recuperación del organismo a nivel psicológico y fisiológico después de un evento estresante, y su relación con el desarrollo y tratamiento de psicopatologías (Charney, 2004). Las estrategias de afrontamiento depende de cada individuo, su predisposición genética, su historia de vida, su temperamento, cuidados maternos, y otros factores que a su vez disparan una respuesta neuroendócrina y comportamental con variaciones individuales (Mormède y col, 2000).

Por lo tanto, según los conceptos anteriormente expuestos podemos expresar que el estrés involucra tres componentes el psíquico, el social y el biológico. Un estresor es capaz de desencadenar una serie de eventos muy complejos a nivel psicológico, fisiológico y comportamental con el fin de elaborar una respuesta adaptativa y mantener el equilibrio del organismo. Los individuos perciben de diferente manera las situaciones estresantes, usan habilidades y recursos particulares a fin de controlar esas situaciones potencialmente estresantes.

1.4.1- El estrés en relación al sistema nervioso

Cuando un animal es enfrentado a un estímulo estresante (ya sea una exposición aguda o crónica) se elaboran diversas respuestas adaptativas que involucran cambios a nivel sináptico, desde la liberación de neurotransmisores hasta las modificando en las conexiones neuronales. Un evento estresante induce la activación del sistema neuroendócrino y autónomo de forma coordinada, que reacciona frente al estímulo de manera específica, con el fin de mantener la homeostasis del organismo, aumentar el óptimo funcionamiento y asegurar la supervivencia del mismo (McEwen, 2008). Numerosas evidencias indican que un estrés agudo involucra la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal y del sistema noradrenérgico, junto con la participación de neurotransmisores y numerosas redes neuronales. Si bien el cerebro es el principal órgano encargado de evaluar un estímulo estresor y elaborar diferentes respuestas psicológicas, fisiológicas y comportamentales con el fin de mantener la homeostasis, cuando se produce una demanda excesiva el organismo falla en producir una respuesta adaptativa y se genera un daño (McEwen, 2008). Este autor asevera que “el estrés comienza en el cerebro y afecta al cerebro, como al resto del organismo”. La respuesta efectora está mediada por la activación de vías neuronales en el SNC, tanto de estructuras límbicas como corticales, las cuales son las encargadas de evaluar emocional y cognitivamente al estrés modulando los mecanismos efectores (Millan, 2003).

Cuando el organismo reacciona ante un estresor se activa el sistema nervioso autónomo, se produce un aumento en la liberación de ACTH (hormona

adrenocorticotrófica) estimulándose el sistema neuroendócrino, liberando catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) y cortisol siendo consideradas las principales hormonas del estrés. Asimismo, se conoce que los glucocorticoides, a nivel periférico, son capaces de alterar los niveles de glucosa plasmática, mientras que la noradrenalina y adrenalina estarían implicadas en las alteraciones observadas en la presión y frecuencia cardíaca (Ganong y col, 2010). El cuerpo responde a un evento estresante liberando hormonas, en general se observa un aumento en la liberación de noradrenalina y adrenalina que producen cambios fisiológicos como un aumento del ritmo cardíaco y de la presión arterial, así como alteraciones gastrointestinales e inmunológicas (McEwen y col, 1995). Asimismo, la noradrenalina y adrenalina estimulan el sistema nervioso y ejercen efectos metabólicos que incluyen glucogenólisis hepática y muscular, movilización de ácidos grasos, y estimulación de la tasa metabólica. Tanto la noradrenalina, como la adrenalina aumentan la fuerza y frecuencia cardíaca. La noradrenalina produce vasoconstricción en casi todos los órganos, mientras que la adrenalina provoca vasodilatación de los vasos sanguíneos del músculo esquelético y en el hígado, aumentan el estado de vigilia, provocando ansiedad y temor (Ganong y col, 2010). A nivel central, se conoce que el estrés activa el locus coeruleus lo que produce un aumento de liberación de noradrenalina. El locus coeruleus puede ser activado por estresores intrínsecos, como hipoglucemia, disminución del volumen y la presión sanguínea, alteración en la termorregulación corporal, y por estresores extrínsecos como amenazas o factores ambientales (Charney, 1999). El estrés agudo puede activar el locus coeruleus y el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, facilitando la elaboración de la respuesta al estresor que comienza en amígdala. Luego la amígdala inhibe la corteza prefrontal y estimula la secreción de CRH (hormona liberadora de corticotrofina), resultando en un incremento en la actividad del locus coeruleus y el eje hipotálamo hipofisario. Por lo tanto, la retroalimentación entre corteza prefrontal, amígdala, hipotálamo y sistema noradrenérgico constituyen los elementos principales para elaborar una respuesta al estresor (Gold y col, 2002). Un estrés agudo afecta los niveles de cortisol, noradrenalina y adrenalina actuando a nivel de SNC, los glucocorticoides pueden aumentar la actividad en amígdala y en hipocampo, mediante el aumento de la liberación de CRH (Makino y col, 1994), mientras que la adrenalina estimula aferencias vagales produciendo un aumento de noradrenalina a nivel central por un incremento de actividad en amígdala y estos eventos estarían relacionados con la formación de memoria emocional (Mc Gaugh y col, 2002).

Los términos “*alostasis*” y “*carga alostática*” se refieren a cambios fisiológicos del organismo, y también a cambios comportamentales (Fig 7). Ha sido reportado que los individuos que sufren estrés crónico tienen alteraciones en el comportamiento como por ejemplo, interrupción del sueño, disminución de la ingesta de alimentos, aumento del consumo de alcohol, disminución de interacción social etc. Por otro lado, se conoce que los glucocorticoides y las catecolaminas son los principales mediadores químicos que se alteran frente a un evento estresante. Sin embargo, el sistema nervioso parasimpático también es activado para regular estas respuestas fisiológicas (Thayer y Lane, 2000). Se ha descrito que el incremento en la liberación de hormonas ayuda a elaborar una respuesta eficiente, pero no existe una relación lineal entre la liberación de los mediadores químicos y las fuentes de estrés que la producen, ya que para elaborar una respuesta compensatoria se activan numerosas vías neuronales que involucran la actividad de mediadores químicos excitatorios e inhibitorios. Asimismo, se reportó que una sobrecarga alostática produce la disminución del sistema parasimpático, provocando un aumento del cortisol, insulina y glucosa plasmáticas, que pueden causar privación del sueño y aumento de ingesta de alimentos calóricos (Dallman y col, 2003; McEwen, 2006). El cortisol es el encargado de regular la energía del organismo, existen reportes donde se relaciona al cortisol con un estrés psicológico, y el incremento de esta hormona produce un aumento del estado de alerta y vigilancia, promueve la formación de la memoria, así como puede afectar de manera negativa otros sistemas, como el reproductor y el inmunológico (Gold y col, 2002). Además, se produce la activación del sistema parasimpático e inmunológico que interactúan con las hormonas del estrés para regular la respuesta fisiológica. Se ha reportado que los glucocorticoides y la activación del sistema parasimpáticos inhiben la producción de citoquinas pro-inflamatorias mientras que las catecolaminas las incrementan (Sapolsky y col, 2000; Thayer y Lane 2000).

A nivel de SNC ocurren importantes cambios en áreas como hipocampo, corteza prefrontal y amígdala que pueden involucrar un recambio de neuronas o la remodelación de dendritas (McEwen, 1999). El estrés produce remodelaciones neuronales promoviendo el aprendizaje y la memoria de eventos específicos. El hipocampo es una región muy sensible a estos cambios y tiene un rol muy importante en los procesos cognitivos, cuando se produce un estrés agudo se puede observar un aumento en las ramificaciones que conectan la corteza entorrinal, el *girus dentado* y la región CA3, resultando en un incremento de la amplificación de las redes neuronales implicadas en procesos

excitatorios, y en menor proporción en las redes de sinapsis inhibitorias (McEwen, 1999). También se reportaron cambios estructurales de las neuronas en *gyrus dentado*, donde se observaron reemplazo de astrocitos por neuronas granulares (Seri y col, 2001). Existen diversas hormonas y neuroquímicos involucrados en la neurogenesis y supervivencia neuronal en esta area, que incluye estradiol, IGF-1 (*insuline growth factor- 1*), y glucocorticoides (Kempermann y Gage, 1999; McEwen, 2010) asi como también el ejercicio físico (van Prahan y col, 1999). Otro de los cambios estructurales y funcionales identificados en cerebro en respuesta a un evento estresante, es la plasticidad neuronal (McEwen, 2010). Estudios moleculares y de inmunomarcacion realizados en animales con estrés agudo mostraron que hubo un incremento de espinas dendriticas sin cambios en el largo neuronal en Amígdala, (Mitra y col, 2005) mientras un estrés crónico causa un aumento del largo y de la densidad de espinas (Vyas y col, 2002). Bajo repetidas sesiones de inmovilización los animales presentaron un acortamiento de estas neuronas en corteza prefrontal, como una respuesta adaptativa (Vyas y col, 2002; Mc Ewen, 2010). Por lo tanto, cambios estructurales en diferentes regiones cerebrales son consideradas como un mecanismo de adaptación que incrementan la plasticidad neuronal y protegen al cerebro de los efectos deletéreos inducidos por el estrés (Mc Ewen, 2010). Se ha reportado que el estrés agudo produce cambios epigeneticos reversibles, detectados como una rápida disminución de histonas que componen la heterocromatina facultativa, y al mismo tiempo un incremento en histonas que conforman la heterocromatina constitutiva que se mantienen alrededor de 24 horas (Hunter y col, 2009). Es decir, que el estrés produciría cambios detectados a nivel genómico generando cambios estructurales de corta duración. Ha sido reportado que experiencias estresantes en edad temprana pueden ocasionar efectos en la capacidad de respuesta a fururos estresores, dependiendo de la regulación neuroendócrina, autonómica y metabólica afectando el comportamiento en la edad adulta (Anda y col, 2010).

Por lo tanto, un estresor induce cambios fisiológicos que son mediados por eje hipotálamo-hipofiso-adrenal con la consecuente liberación de hormonas que ocasionan cambios a nivel de SNC. En cerebro se producen cambios en la estructura y función de las neuronas que dependen de hormonas, factores neurotróficos y neurotransmisores que activan mecanismos de señalización intra y extracelulares.

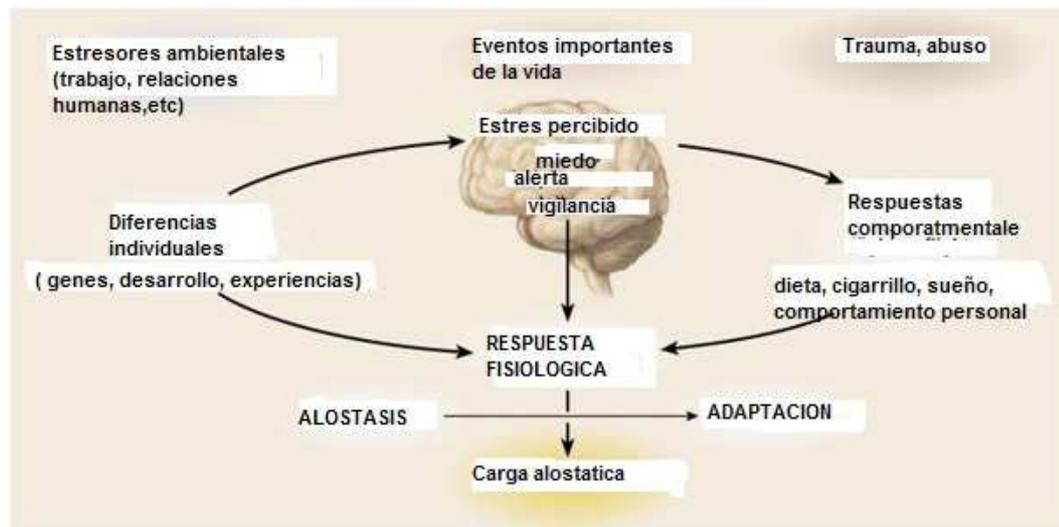


Figura 7- Rol central del cerebro en respuesta a un estresor. En este esquema se puede observar como el cerebro percibe el evento de estrés, luego elabora una respuesta comportamental, influenciada por las experiencias individuales de cada organismo. La alostasis y la carga alostática, intervienen regulando la respuesta. Fuente: McEwen, 2007.

1.4.2 -Estrés agudo y RGABA_A

El estrés induce una respuesta fisiológica mediada por el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y el GABA tiene un importante rol en la regulación de este eje. Se mostró que las neuronas implicadas en la liberación de CRH (*Corticotropin-releasing hormone*), reciben una fuerte inervación GABAérgica (Decave y van den Pol; 1990,1992; Herman y col, 2004; Cullinam y col, 2008). Los RGABA_A con diferentes composición de subunidades han sido identificados en zonas del núcleo paraventricular (PVN), que proyecta eferencias al eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (Fritschy y Mohler, 1995). Se reportó que eventos de estrés producen cambios en la composición de subunidades del RGABA_A que son región específicos. En PVN se identificó una disminución en las subunidades β_1 y β_2 , sin cambios en las subunidades α_1 , α_3 , γ_1 ó γ_3 (Verkuyt y col, 2004). Mientras que en hipocampo se observó un aumento de β_1 y β_2 (Cullinam y Wolfe, 2000), y una disminución de la expresión de γ_2 (Maguire y Mody, 2007). Ha sido reportado que el estrés produce cambios significativos en las inhibiciones mediadas por el sistema GABAérgico, observándose que las alteraciones de los niveles hormonales y de

neuroesteroides provocarían cambios en la expresión y composición del RGABA_A (Mody y Maguire, 2012).

Estudios de radioligando mostraron que un estrés agudo genera cambios rápidos y significativos en la densidad de los RGABA_A expuestos en membrana. Se encontraron discrepancias entre los reportes debidos a diferencias de protocolos experimentales, así como el paradigma de estrés usado en cada caso. Estudios tempranos en roedores sometidos a natación forzada y aislamiento mostraron que no había cambios significativos en la densidad de receptores sensibles a flunitrazepam (Braedstrup y col, 1979, Park y col, 1993). Sin embargo, una descarga eléctrica en la pata indujo un aumento en la densidad de receptores sensibles a flunitrazepam en regiones corticales de cerebro anterior (Braedstrup y col, 1979). Además, se conoce que estos cambios son específicos de una región cerebral, experimentos en ratas mostraron que un estrés por natación puede ocasionar aumentos en la densidad de RGABA_A sensibles a flunitrazepam en corteza (Soubrie y col, 1980; Rago y col, 1989, Motohashi y col, 1993) sin observarse cambios significativos en hipocampo o cerebelo (Motohashi y col, 1993). Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron un incremento consistente en la densidad del RGABA_A flunitrazepam sensibles de sinaptosomas provenientes de cerebro anterior de pollos empleando diferentes paradigmas de estrés. Se registraron aumentos en estos sitios del RGABA_A en respuesta al estrés que acompaña un esquema de evitación pasiva de una sola prueba (Martijena y col, 1986), a un esquema de impronta (Salvatierra y col, 1994), a un esquema de discriminación de alimento (Salvatierra y col, 1997), y luego de una exposición a un ambiente nuevo (*novelty*) (Salvatierra y Arce, 2001) y por inmersión parcial en agua (Cid y col, 2008). De acuerdo a estos resultados se propuso que el reclutamiento rapido del RGABA_A después de un evento de estrés agudo podría involucrar mecanismos de tráfico del receptor, sin implicar la biosíntesis o la degradación. Se observó que el reclutamiento del receptor por estrés fue anulado por la presencia de colchicina y fosfatasa alcalina en el lumen sinaptosomal y el agregado *in vitro* de citocalasinas incrementó la densidad del receptor tanto en aves estresadas como no estresadas, lo cual sugiere que la depolimerización de microfilamentos debido a citocalasinas podría inducir la fusión a membrana postsináptica de un tercer “*pool*” de RGABA_A, localizado en citoplasma bajo una forma vesiculada (Benavidez y Arce, 2002).

1.4.3- Sistema noradrenérgico en relación al estrés

El sistema noradrenérgico es uno de los principales circuitos nerviosos que actúan de manera sincronizada con las hormonas liberadas por el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal en respuesta a un estresor agudo (Morilak y col, 2005). La noradrenalina (NA) liberada puede causar diversos efectos en el cerebro según la activación de diferentes subtipos de receptores noradrenérgicos. Usando técnicas moleculares pudieron clasificarse 9 subtipos de receptores adrenérgicos (α_1 A, B, D, α_2 A, B, C, y $\beta_{1, 2,3}$), los cuales poseen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteína G, además cada subtipo de receptor tiene características farmacológicas propias (Gibbs y Summers, 2000). Estos receptores están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso y tienen múltiples roles fisiológicos, estando implicados en la respuesta cardiovascular, las aferencias sensoriales, la regulación de la temperatura corporal, entre otras (Morilak y col, 1987). Hay numerosas evidencias que indican que se produce una fuerte liberación de noradrenalina seguida a un evento estresante (Morilak y col, 1987; Page y col, 1992). Experimentos realizados en ratas inmovilizadas mostraron un aumento fásico de la liberación de NA entre los 5-30 minutos, seguidos por una fase de recuperación y observándose la misma tendencia para la hormona ACTH (Morilak y col, 2005). En pollos sometidos a un Campo Abierto se observó que el CRH aumenta la corticosterona plasmática, mientras que la noradrenalina la disminuye (Zhang y col, 2003).

La NA en cerebro anterior de pollos y en mamíferos se encuentra en las terminales nerviosas de los cuerpos celulares localizados en locus coeruleus y su liberación esta relacionada con eventos de *arousal*, atención y estrés (Berridge y Waterhouse, 2003). En ratas se observó que un estrés agudo puede inducir una disminución en la actividad exploratoria en un laberinto en cruz elevado (Cechi y col, 2003). Experimentos de microdiálisis mostraron que un estrés agudo activa la liberación de NA en varias regiones del cerebro de ratas y que esta liberación induce una serie de respuestas comportamentales similares a la ansiedad, como una exploración reducida en un laberinto en cruz (Mosaavi, 2007). Faure y col. (1983) describieron que pollos sometidos a un Campo Abierto tienen una inhibición de patrones comportamentales inducidos por el miedo a la misma prueba, caracterizado por una etapa de congelamiento, corrida de pánico, y posteriormente vuelos cortos como intento de escape. Estudios farmacológicos realizados en pollos mostraron que una inyección intracerebroventricular de NA y la exposición a un Campo Abierto

produce efectos dosis dependiente, observándose una disminución de la actividad locomotora y las vocalizaciones de distres, así como la inducción de un comportamiento similar al sueño (*sleep-like behavior*) (sentado con los ojos cerrados) a altas dosis de NA (Zhang y col, 2003).

Ha sido reportado que la formación de la memoria se relaciona con un subtipo específico de receptor noradrenérgico. Experimentos en pollos recién nacidos mostraron que la NA promueve la memoria a largo plazo, cuando se estimulan los receptores $\beta_{2,3}$ se observa la consolidación de la memoria, mientras que cuando actúan los α_1 habría una inhibición de la memoria usando una prueba de evitación pasiva (Gibbs y Summers, 2000). Asimismo se conoce que la NA liberada centralmente puede unirse a receptores α_2 - y β -adrenérgicos produciendo diversos efectos fisiológicos y comportamentales (Gibbs y col, 2010). Se reportó que bajas dosis de NA promueven la memoria vía β -adrenérgica, mientras que altas dosis producen un desmejoramiento de la formación de la memoria actuando la vía α_2 - adrenérgica en pollos neonatos (Gibbs, 2003). Por lo tanto, la activación de diferentes tipos de receptores adrenérgicos conlleva a tener diferentes clases de efectos en la misma célula o en el mismo sistema estudiado y hasta se pueden observar efectos opuestos.

Por otro lado, se conoce que la yohimbina es un antagonista α_2 - adrenérgico que administrada de forma sistémica puede producir efectos a nivel central y bloquear cambios fisiológicos o comportamentales inducidos por la noradrenalina. Con respecto al comportamiento en pollos se conoce que la yohimbina bloquea la estimulación del apetito en pollos inducida por NA (Tachibana y col, 2009). Además, se conoce que promueve la consolidación de la memoria según la región y el subtipo de receptor α_2 - adrenérgico que se active (Gibbs y col, 2010). Ha sido reportado que la administración sistémica de yohimbina en ratas puede provocar cambios fisiológicos, como por ejemplo aumentar los niveles de corticosterona y ACTH plasmáticos. Además, puede atenuar los efectos inducidos por diazepam (Strac y col, 2012). Por otro lado, el propranolol es un antagonista β -adrenérgico no selectivo, que posee la capacidad de unirse con igual afinidad a los receptores β_1 , como a los β_2 . Ha sido reportado que puede pasar la barrera hematoencefalica con facilidad (Brunton y Parker; 2006). El propranolol actúa centralmente y se ha descrito que es capaz de disminuir el miedo y la ansiedad. Se observó que el propranolol puede reducir la ansiedad en ratas expuestas a un Campo Abierto, de una forma dosis dependiente (Angrini y col, 1998) así como reducir el miedo en un contexto

condicionado (Davis y col, 1979). Estudios en memoria y aprendizaje mostraron que los receptores β -adrenérgicos son un importante sustrato neuronal para la consolidación de la memoria (McGaugh, 2004). Experimentos en ratas mostraron que si se bloquea la vía β -adrenérgica en amígdala se inhibe la consolidación de la memoria y la reconsolidación (Debiec y Ledoux, 2004; Roozendaal y col, 2008), mientras que un agonista β -adrenérgico puede aumentar la consolidación de manera dosis dependiente (Roozendaal y col, 2006, 2008). Además, se reportó que inyecciones sistémicas de propranolol produjo una disminución significativa de los disparos espontáneos en neuronas prelimbicas (Rodríguez-Romanguera y col, 2009). En pollos neonatos la administración intracereventricular de NA y la administración sistémica de propranolol mostraron que según las dosis de NA, pueden activarse los receptores β_2 - ó β_3 -adrenérgicos y ambos estarían implicados en la consolidación de la memoria (Gibbs, 2000). Por lo tanto, la noradrenalina actuaría activando diferentes subpoblaciones de receptores, lo cual originaría diferentes respuestas según la vía activada.

Se conoce que el sistema GABAérgico y noradrenérgico trabajan de manera coordinada para regular la excitabilidad neuronal producida por un evento estresante. Existen evidencias que bajas dosis de noradrenalina suprimen los potenciales inhibitorios espontáneos y miniatura por activación de receptores α_2 - adrenérgicos, mientras que sólo suprimen los potenciales inhibitorios miniatura si se activan los β -adrenoreceptores, lo que sugiere que la inhibición del RGABA_A es modulada por el sistema noradrenérgico dependiendo de la concentración de noradrenalina y de los subtipos de receptores noradrenérgicos activados (Nai y col, 2009). También se observó que los RGABA_A podrían aumentar la activación de ambos subtipos de adrenoreceptores y de esta forma la fuerza de la inhibición neuronal estaría dada por una modulación dinámica entre el sistema noradrenérgico y los RGABA_A (Ciranna y col, 2004).

1.4.5 - Insulina central y estrés

La presencia de receptores de insulina en el cerebro sugiere que este órgano es blanco para insulina. La acción central de insulina es la regulación de la homeostasis de la glucosa, la energía corporal y la ingesta de alimentos. Ha sido descrito la insulina actua

uniéndose a sus receptores IR (*insuline receptor*), los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro. Por lo tanto, la insulina puede ejercer funciones neuroreguladoras, neuromoduladoras y neurotróficas (Gerozissis, 2004). La insulina central está relacionada con procesos cognitivos, así como mecanismos que involucran la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal (Recio-Pinto, 1986; Kremerskothen y col, 2002). Se propuso que la insulina central podría estimular la síntesis de proteínas neuronales, produciendo un incremento en el crecimiento neuronal, regeneración de fibras de mielina y también estaría involucrado en los procesos de desarrollo neuronal (Schulingkamp y col, 2000; Dickson y col, 2003; Sugimoto y col, 2003).

Las acciones centrales de insulina-IR pueden regular el comportamiento y las funciones cognitivas en animales (Zhao y Alkon, 2001). Ensayos en ratas mostraron que la insulina central puede regular la ingesta de alimentos, así como el peso corporal, el metabolismo y la reproducción (Zhao y Alkon, 2001). Se reportó que la insulina en SNC estaría asociada con procesos cognitivos y con la edad. En cerebro de pacientes con Alzheimer, se vio que había una menor concentración de insulina central, así como menor densidad en los IR, comparado con pacientes de mediana edad, lo que sugiere que una disminución de insulina-IR está asociada a desmejoramiento de la memoria. (Craft y col, 1998). Se ha reportado que la administración de insulina promueve el aprendizaje y la formación de la memoria en ratas (Freude y col, 2005; Benedict y col, 2004). Se conoce que diversos paradigmas de estrés pueden aumentar las concentraciones de glucosa e insulina plasmáticas. En ratas se observó un incremento de glucosa e insulina plasmáticas después de una inmersión parcial en agua (Boer y col, 1999), mientras que ruidos agudos provocaron una disminución de ambas (Armario y col, 1984). También se publicó que un estrés por inmovilización puede producir un aumento de insulina, que retorna a valores basales rápidamente (Yamada y col, 1993). Recientemente se publicó que un estrés agudo eleva las concentraciones de insulina y glucosa plasmática, mientras que un estrés crónico no produjo cambios en las mismas (Rostamkhani y col, 2012). Ha sido publicado que microinyecciones de insulina en hipocampo a bajas dosis no tienen efecto en el déficit de memoria producido por el estrés, mientras que altas dosis de insulina protegen al animal del efecto deletéreo producido por un evento estresante, sugiriendo que la insulina juega un rol neuroprotectivo frente al estrés (Moosavi, 2007).

La insulina central puede activar diversos mecanismos de señalización intracelular, que involucra PI-3Kinasa-fosfotido dependiente, así como la proteína quinasa B-Akt

(Bevan y col, 2001). Se conoce que la insulina estaría involucrada en la translocación rápida del RGABA_A y su posterior inserción en la membrana postsináptica, mediante el incremento de la fosforilación de residuos tirosina en la subunidad β_2 del receptor y este mecanismo sería regulado por la PI3-kinasa (*Fosfoinositol 3-kinasa*) y la Akt (*serin-treonin-kinasa*) (Wang y col, 2003; Xu y col, 2006). Este modelo también involucra la formación de un complejo ternario Akt-PRIP-subunidad β_2 del RGABA_A que en conjunto actuarían para aumentar la inserción del RGABA_A en la membrana plasmática estimulados por la unión de la insulina a su receptor. Este proceso sería fuertemente influenciado por la presencia de PRIP, ya que en ausencia de esta proteína no se observaron cambios en la fosforilación del receptor, así como no hubo un aumento del número de RGABA_A expuestos en la membrana (Fujii y col, 2010). Se conoce que la insulina podría aumentar la internalización de los RGABA_A produciendo alteraciones de la inhibición neuronal y promoviendo la plasticidad sináptica (Zhao y col, 2004). Un posible mecanismo de neuroprotección podría involucrar la fosforilación de la PI3K/Akt por el IGF-1 y de esta manera inactivar el mecanismo de caspasas que producen muerte neuronal (Leninger y col, 2004). Existen evidencias que la insulina aumenta el número de RGABA_A expuestos en la membrana plasmática, y este efecto podría estar mediado por la fosforilación de la PI3K (una kinasa involucrada en ambos sistemas) (Vetiska y col, 2007; Wan y col, 1999). Ha sido reportado que la insulina ejerce un efecto rápido sobre los RGABA_A que potencian las sinapsis inhibitorias. Se observó que el efecto de insulina dependería de las concentraciones de GABA en el espacio sináptico y de las subunidades que conforman el RGABA_A (Williams, 2008).

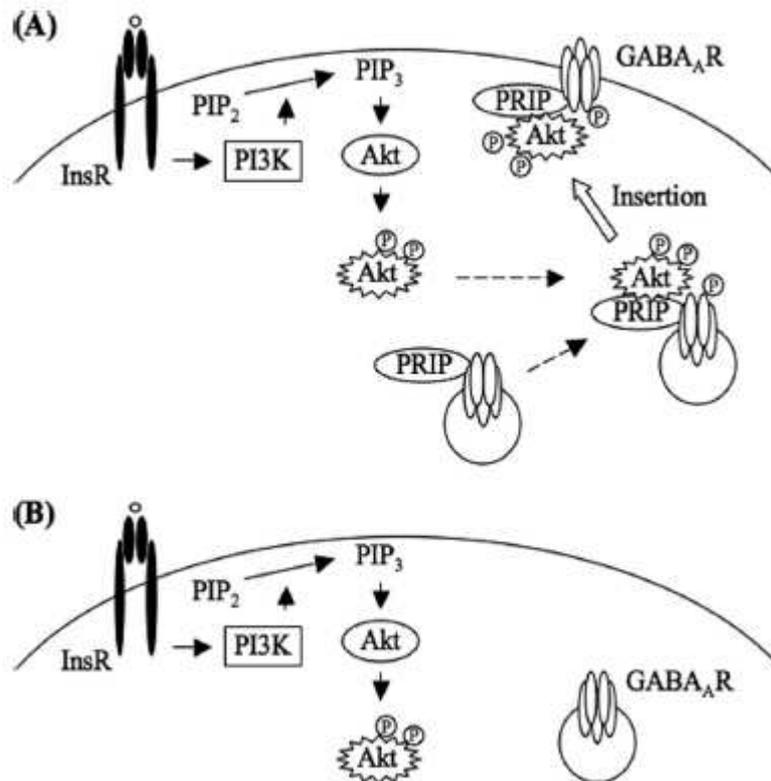


Figura 8. Representación esquemática del aumento del RGABA_A inducido por la unión de Insulina a su receptor. A) La insulina estimula la activación de la PI-3K, consecuentemente se produce la fosforilación de la Akt y la formación del complejo Akt-PRIP - subunidad $\beta 2$ del RGABA_A, lo cual facilita la inserción del receptor en la membrana postsináptica. B) La ausencia de PRIP produjo una falla en la unión de la Akt con la subunidad $\beta 2$ del RGABA_A, por lo tanto no se expuso el receptor en la membrana. Fuente: Fujii y col, 2010.

1.5- Localización de RGABA_A y receptores noradrenérgicos en Sistema Nervioso Central.

Basados en estudios de inmunomarcación, inmunoprecipitación y con el avance de técnicas de biología molecular, como estudios en ratones (*knockout*) deficientes en una proteína o ensayos de recombinantes del RGABA_A se pudieron estudiar las diferentes combinaciones del receptor y su distribución en cerebro de mamíferos y aves. Se pudo identificar que la subunidad $\alpha 2$ es la más expresada en muchas regiones cerebrales, constituyendo aproximadamente un 80% de los RGABA_A, mientras que las subunidades

γ_1 y γ_3 tienen un patrón de expresión mucho más reducido (Within y col, 2000; Ernst y col, 2005). Asimismo se conoce que la subunidad α_1 tiene un fuerte y extenso patrón de expresión altamente conservado en cerebro de rata y de aves (Pirker y col, 2000; Aller y col, 2003). Estudios de inmunohistoquímica revelaron que en neocorteza se encuentra expresada extensa e intensamente la subunidad α_1 , mientras que las subunidades α_{2-3} se localizan en forma más discreta. Sin embargo, en hipocampo se vio que las subunidades α_2 y α_5 son más abundantes que las otras isoformas, observándose cambios en la intensidad de expresión en estados perinatales y adultos (Yu y col, 2006). Estudios de inmunohistoquímica realizados en cerebro de pollo describen que la subunidad α_1 está más expresada en zonas del telencéfalo, tálamo y cerebelo, mientras que la presencia de la subunidad γ_2 es más fuertemente expresada en tectum óptico y parte posterior del cerebro. Además, se informó que el patrón de expresión para la subunidad α_1 varía según las diferentes áreas analizadas, por ejemplo en Nidopallium (N) se pudo observar esta subunidad en el soma neuronal y en dendritas con una intensidad de expresión moderada, mientras que en Medial Striatum (MSt) la subunidad α_1 mostró una tinción muy intensa pero difusa donde no se puede reconocer el soma de cada célula. Por otro lado, la subunidad γ_2 mostró un patrón similar, pero con diferente intensidad de marca en estas áreas (Aller y col, 2003). Conjuntamente se reportó que en N y en MSt habría una importante concordancia entre la alta intensidad de expresión de los sitios de unión a BZD y de la subunidad α_1 (Aller y col, 2003). Estas estructuras telencefálicas como N y MSt expresan de forma específica y diferencial las distintas subunidades del RGABA_A mostrando que los sitios de unión a BZD serían muy abundantes en cerebro de aves. En referencia a la subunidad β , se reportó que el subtipo β_1 es el menos expresado, mientras que el β_2 tiene una distribución extensa y abundante, y la β_3 estaría confinada a ciertas áreas con fuerte intensidad de marca (Olsen y Sieghart, 2008). También ha sido descrito que la subunidad β del RGABA_A se encontraría más densamente expresada en estadios perinatales que en cerebros adultos (Zhang y col, 1991). Estudios de inmunoprecipitación sugieren que la subunidad β se expresaría en una sola isoforma por receptor y solo se encontraría en RGABA_A funcionales (Within y col, 2000).

Además, ha sido descrito que las neuronas GABAérgicas colocalizan con neuronas noradrenérgicas. Se observó la distribución de los distintos tipos de α_2 -adrenoreceptores en cerebro de pollos, mostrando que habría una distribución homogénea de estos receptores en estructuras telencefálicas, sin embargo en cerebelo y tectum óptico

habría un predominio de la subunidad α_{2C} y en bulbo la α_{2A} (Diez-Alarcia y col, 2009). También se reportó que en diferentes zonas hipotálamicas se localizarían α_2 -adrenoreceptores en axones de neuronas GABAérgicas, y en conjunto con datos electrofisiológicos mostrarían la modulación noradrenérgica sobre la transmisión GABAérgica en condiciones fisiológicas como de estrés agudo (Bali y col, 2005; Shin y col, 2007).

2- HIPÓTESIS

- 1) Los cambios fisiológicos, bioquímicos y farmacológicos observados en pollos después de un evento estresante podrían deberse a :
 - a) la noradrenalina aumenta significativamente en Sistema Nervioso Central en respuesta a un estrés agudo;
 - b) existe una interacción entre el sistema GABAérgico y el sistema noradrenérgico
 - c) el incremento observado sobre la densidad de RGABA_A en sinaptosomas inducido por un estrés agudo estaría modulado por el sistema noradrenérgico.

- 2) El sistema noradrenérgico modularía de forma dual el reclutamiento de RGABA_A en membrana de sinaptosomas a través de distintos subtipos de receptores noradrenérgicos, que actuarían de manera selectiva de acuerdo a la concentración de noradrenalina en el espacio sináptico.

- 3) La insulina administrada centralmente provocaría un aumento de la densidad de RGABA_A en las sinapsis, este incremento estaría asociado a que la insulina adicionada por vía sistémica acrecienta la densidad del receptor en la superficie de las neuronas y por un mecanismo similar al estrés.

3-OBJETIVOS

3.1- OBJETIVOS GENERALES

Profundizar y mejorar el conocimiento sobre las bases neurobiológicas, bioquímicas y fisiológicas del miedo y el estrés agudo en aves en relación con el reclutamiento del RGABA_A. Avanzar en la comprensión de los mecanismos moduladores noradrenérgicos, la interacción con insulina y su posible sinergismo sobre la densidad de RGABA_A en sinaptosomas de cerebro anterior de pollo.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Examinar la acción farmacológica de diferentes dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricular sobre el comportamiento de pollos neonatos en un Campo Abierto.

2- Investigar la participación de los subtipos α - y β -adrenoreceptores en el comportamiento de ansiedad mediante la administración de antagonistas selectivos.

- a) efectuar un análisis comportamental de la acción farmacológica de las diferentes dosis de noradrenalina coadministradas con bloqueantes de la vía α - o β -adrenérgica medidas en un Campo Abierto.

3- Examinar la acción farmacológica de antagonistas selectivos α y β -adrenérgicos sobre el reclutamiento del RGABA_A mediante:

- a) Ensayo de radioligando de RGABA_A-flunitrazepam sensible en sinaptosomas de cerebro anterior de pollos.
- b) la expresión de las subunidades (α_1 y β_{2-3}) del RGABA_A en cortes de tejido de cerebro anterior de pollo mediante inmunohistoquímica en pollos neonatos tratados con noradrenalina y sometidos a un estresor agudo.

4- Evaluar el efecto de distintas dosis de insulina inyectadas (icv) sobre:

- a) el comportamiento de ansiedad de pollos neonatos sometidos a un Campo Abierto.
- b) la densidad de RGABA_A reclutados en sinaptosomas mediante la unión del [³H]-flunitrazepam a los sitios de reconocimiento a RGABA_A-flunitrazepam sensible, luego de un estrés agudo.

4- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1) Animales

Se utilizaron pollos Cobb (*Gallus gallus domesticus*) de ambos sexos de 4-6 días de edad. Los pollos recién nacidos, obtenidos en la granja de cría INDACOR S.A (provincia de Córdoba) fueron criados en un bioterio climatizado a una temperatura de $31 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad constante. La habitación de cría posee una superficie de 6 m^2 y esta aislada de ruidos. Los pollos recién nacidos fueron mantenidos en grupos de 20 en cajas de cria de madera (90x40x60 cm) pintadas de blanco con un comedero y un bebedero por caja. Los animales estuvieron expuestos a ciclos regulares naturales de luz/oscuridad, con libre disponibilidad de alimento balanceado para pollos BB (Cargill, parrillero BB, 20% mínimo de proteína cruda 12,34 mJ/kg) y agua. Los pollos fueron criados socialmente y permanecieron en estas condiciones hasta el día de experimentación. Los cambios de comida y las tareas de mantenimiento se realizaron a las 10:00 hs. Todos los experimentos se hicieron entre las 10:00 y 14:00 hs.

Los pollos que se usaron para investigar la posible modulación de insulina y noradrenalina sobre el reclutamiento de los RGABA_A en relación al estrés tenían entre 4 y 6 días de edad.

4.2) Drogas

En primer lugar se realizaron las inyecciones intracerebroventricular de Noradrenalina (Laboratorios Fada Pharma). La misma fue disuelta en una solución 0,1% de Azul de Evans en solución fisiológica (0,85% NaCl) y fue inyectada en dosis de 0,025; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 y 10,00 μg . Para los estudios con insulina se usaron distintas dosis de insulina humana semisintética (Betalin H-U 100, Laboratorios Beta S.A.), que fue disuelta en una solución 0,1% de Azul de Evans en solución fisiológica (0,85% NaCl). Las dosis ensayadas fueron de 0,0125; 0,0625; 0,33; 0,66; 1,00 y 2,50 mUI/ μl .

Para los estudios de subtipos de receptores adrenérgicos se utilizaron las siguientes drogas: Fentolamina (REGITINA) de Sigma (St. Louis, MO) antagonista α -adrenérgico no

selectivo, Yohimbina de Sigma (St. Louis, MO) antagonista α_2 -adrenérgico selectivo, y como un antagonista β -adrenérgico no selectivo Hidrocloruro de DL-Propranolol de Sigma (St. Louis, MO). Todas estas drogas fueron disueltas en una solución fisiológica (0,85% NaCl) e inyectadas intraperitonealmente para realizar los ensayos neurofarmacológicos.

La glucosa plasmática se determinó con un kit comercial de glucosa oxidasa (Wiener Lab, Argentina).

El [³H]-flunitrazepam ([³H]-FNZ) (85 Ci/mmol) fue adquirido en New England Nuclear (Boston, MA, USA).

4.3) Procedimientos experimentales

4.3.1) Inyecciones intracerebroventriculares:

Las inyecciones intracerebroventriculares se realizaron en el tercer ventrículo según Carvajal y col, (2009) a fin de lograr una mayor difusión a todas regiones del cerebro. Fueron realizadas sin el uso de un posicionador estereotáxico (*head holder*) debido que el uso del mismo esta descrito como un estresor que disminuye la velocidad de inyección y aumenta el tiempo de manipulación de cada pollo (Sandi y Rose, 1994). Por lo tanto, los pollos fueron fijados manualmente e inyectados con una jeringa Hamilton, de agujas 26 ga, con un volumen final de 10 μ l. La profundidad de la inyección fue de 3 mm alcanzada en la aguja mediante un tope plástico. El procedimiento de inyección de cada pollo tomó, aproximadamente, 40-60 seg. La aguja fue dejada en el interior durante un periodo de 5 seg con el objeto de evitar posibles reflujos de la solución, como así también posibles hemorragias por la perforación del epitelio y las meníngeas.

La Figura 9 muestra el sitio de inyección, establecido según el atlas estereotáxico Kuenzel y Masson (1988). El 90% de las inyecciones fueron realizadas en el lugar correcto. El 10% restante fue descartado de los ensayos por posición incorrecta o hemorragia profusa de la zona.

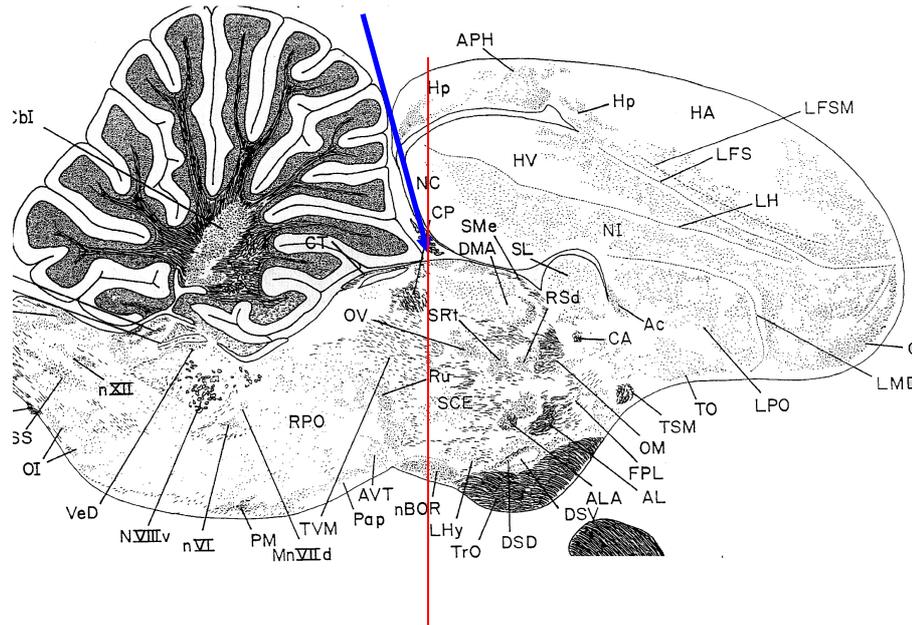


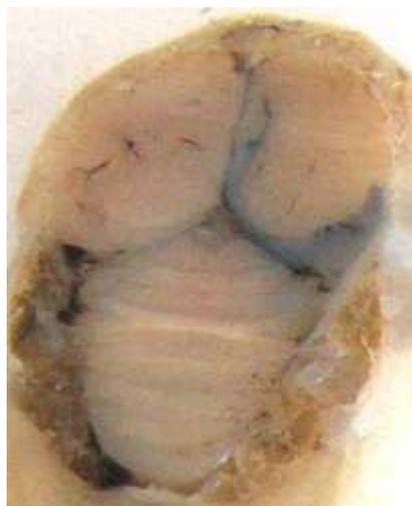
Figura 9. Corte sagital de cerebro de pollo de 4-6 días de edad. La línea azul representa la trayectoria de la aguja empleada para las inyecciones, la línea roja muestra la sección de corte de la Fig. 3b. Tomada y adaptada de Kuenzel y Masson (1988).

A los 4-6 días de edad, los pollos pueden ser inyectados logrando una gran difusión de la droga con un mínimo daño, ya que existen grandes espacios extracelulares a nivel cerebral (Gibbs y Summers, 2002).

A continuación se muestra una imagen del sitio de inyección en pollos de 4-6 días de edad.



Figura 10- Sitio de inyección en la cabeza de un pollo de 4-6 días de edad. EL punto de ingreso de la aguja (P), se encuentra cerca de la sutura de los huesos craneales.



a



b



c

Figura 11 (a, b y c) muestra una serie de cortes transversales de una cabeza de pollo. El 90% de los pollos inyectados correctamente, mostraron una difusión homogénea por todos los ventrículos.

4.3.2) Inyecciones intraperitoneales

Se eligió la ruta sistémica para administrar los antagonistas con el propósito de reducir daños en la región cerebral involucrada, disminuir el tiempo de manipulación de los animales y aumentar la velocidad de inyección. Debido a que la barrera hematoencefalica esta pobremente desarrollada en pollos de esta edad, las drogas antagonistas pudieron pasar libremente desde la circulación periférica hacia el cerebro. Las inyecciones intraperitoneales (ip), se realizaron introduciendo una aguja intradérmica con un ángulo de 30°, ligeramente a la izquierda de la línea media del ombligo, a medio camino de la sínfisis pubiana y el apéndice xifoides del esternón. El tope de la penetración se hizo cuando la solución inyectada comenzó a fluir libremente en la cavidad abdominal (Zúñiga, 2001). Los antagonistas fueron administrados en un volumen final de 0,2 ml con una aguja de 8 mm de largo y 0,3 mm de calibre y una jeringa de 1ml. El tiempo de inyección de los antagonistas que se utilizaron para poner a punto este protocolo fue de 15 minutos, según la bibliografía (Gibbs y Summers, 2002).

4.4) Técnicas neurofarmacológicas

4.4.1) Curvas dosis-respuesta

A los fines de investigar la acción de estas drogas sobre el comportamiento de pollos sometidos a un estresor agudo agudo, fue de suma importancia determinar una dosis óptima de trabajo. Se realizó una curva dosis-respuesta para noradrenalina y para los antagonistas empleados para los estudios faramco-comportamentales asi como los ensayos neuroquímicos.

Se puso a punto en nuestro laboratorio un protocolo de coadministración de NA y distintos bloqueantes noradrenérgicos, con el objetivo de realizar los ensayos fármaco-comportamentales. Se utilizaron pollos de 4-6 días de edad, criados en el bioterio bajo las condiciones que se detallaron anteriormente. Primero se inyectó un volumen de 0,2 ml de Yohimbina, Fentolamina ó Propranolol por vía (ip). Los tiempos usados para realizar el bloqueo de cada vía fue de 15 minutos, retornando los pollos inyectados a la caja de cría. Posteriormente, se administró un volumen de 10 ul por via (icv) de solución fisiológica o de las diferentes dosis de NA, e inmediatamente después se sometieron los animales a una Prueba de Campo Abierto, durante 10 minutos.

4.4.1.1- Curva dosis-respuesta de Noradrenalina

Se administraron icv 8 dosis de NA descritas en 4.2 para estudiar el efecto de un amplio rango de concentraciones en pollos sometidos a un estresor agudo. Las dosis que mostraron diferencias significativas comparadas con el control inyectado con solución fisiológica fueron usadas para realizar los análisis fármaco-comportamentales y para el ensayo de radioligando e inmunohistoquímica.

4.4.1.2) Curva dosis-respuesta de antagonistas noradrenérgicos

Para iniciar los estudios de antagonismo noradrenérgico se realizaron las curvas dosis-respuesta de cada uno de los antagonistas α y β -adrenérgico con la finalidad de determinar las dosis no tuvieran acción *per se*. Los análisis de datos se realizaron teniendo en cuenta la Latencia de ambulaci3n medida en segundos.

La curva dosis-respuesta para **Fentolamina** se realizó con las siguientes dosis: (0,000; 62,5; 125; 250; 5.300; 10.600; 32.800; 65.600 nmol/kg de peso corporal) en solución fisiológica. En este caso la dosis máxima fue (65.600 nmol/kg), determinada por el aumento significativo de la latencia de ambulaci3n, comparados con los pollos inyectados con solución fisiológica. De acuerdo a esta curva se optó por una dosis de (**250 nmol/kg** de peso corporal) para antagonizar la acci3n farmacologica de noradrenalina.

Tambi3n se usó un antagonista α_2 -adrenérgico selectivo, **Yohimbina**. Siguiendo el mismo protocolo de administraci3n de drogas que el descrito anteriormente, se realizó la correspondiente curva dosis-respuesta para determinar la dosis de trabajo. Las dosis de Yohimbina ensayadas fueron (0,0052; 15,00; 78,00; 156,00; 1.092 nmol/kg). Se eligió una dosis de **15 nmol/kg**, para los ensayos fármaco-comportamentales.

La curva dosis-respuesta de **Propranolol** se realizó con las siguientes dosis (0,00; 62,50; 125,00; 250,00; 5000; 10000 nmol/kg de peso corporal). Las dosis de (5000 y 10000 nmol/kg de peso corporal) el antagonista β -adrenérgico ejercieron un efecto *per se*,

en las latencias de ambulaci3n en pollos de 4-6 d3as expuestos a un Campo Abierto. Por lo tanto, se escogi3 una dosis de trabajo de (250 nmol/kg de peso corporal).

4.5) Campo Abierto

Fue desempeñada de acuerdo a la metodolog3a descrita por Gallup y Su3rez (1980) y Salvatierra y Arce (2001). Pollos de 4-6 d3as de edad fueron retirados de la caja comunitaria y transportados a una sala de experimentaci3n. Se analizaron grupos de 10-12 pollos por d3a y la observaci3n del comportamiento se hizo en forma directa. Los pollos fueron colocados individualmente en el centro de una caja de paredes de acrilico blancas de 60 cm de lado x 35 cm de altura, con el piso subdividido en cuadrados de 12 x 12 cm e iluminada de manera uniforme, por una l3mpara de 100 W. Cada sesi3n tuvo una duraci3n de 10 minutos. El Campo Abierto fue limpiado con una soluci3n de etanol 70% entre sesiones. El lugar de la inyecci3n fue confirmado histol3gicamente. Aquellas aves que no fueron inyectadas correctamente fueron descartadas.

Los siguientes par3metros fueron cuantificados: Latencia para empezar a ambular (se consider3 que un pollo hab3a finalizado la latencia para ambular cuando el mismo daba dos pasos en la misma direcci3n), Ambulaci3n (n3mero de cuadrados cruzados), latencia para defecar (tiempo que tarda en realizar una deposici3n), n3mero de defecaciones, y n3mero de escapes (vuelos cortos que realiza el animal, generalmente en las esquinas de la caja).

Las inyecciones de NA e Insulina se realizaron como se explica en 4.3.1, mientras que los diferentes antagonistas usados se administraron por v3a intraperitoneal, de acuerdo a lo descrito en 4.3.2. Aquellos animales que fueron usados para los ensayos f3rmaco-comportamentales retornaron a la caja de cr3a durante 15 minutos, para realizar el bloqueo especifico de cada v3a, y posteriormente expuestos a una prueba de Campo Abierto por 10 minutos. Para los ensayos de radioligando se utilizaron dos grupos de animales, no estresados y estresados. Los pollitos de ambos grupos fueron inyectados con soluci3n fisiol3gica, con diferentes dosis de NA o tratados con los diferentes antagonistas noradren3rgicos seg3n 4.3.1.y 4.3.2. Inmediatamente despu3s, el grupo de aves “no estresadas” fueron retornadas a su caja de cr3a durante 10 minutos mientras que el grupo “estresados” fueron expuestos individualmente a un Campo Abierto durante el mismo

tiempo. Posteriormente, los pollos de cada grupo fueron decapitados y se procedió a la preparación de los sinaptosomas de cada cerebro anterior como se describe posteriormente.

4.6) Procedimiento de decapitación

Al final de cada experimento, los pollos se sacaron de las cajas de experimentación e inmediatamente se mataron por decapitación con una tijera. El procedimiento de decapitación se realizó en 10 s para evitar un estrés adicional. Luego, los cerebros se extrajeron y rápidamente se disecaron en hielo los hemisferios. Los hemisferios cerebrales son estructuras telencefálicas que son neuroquímicamente y funcionalmente comparables a la neocorteza de mamíferos, claustrum, y amígdala palial además de otras áreas paliales como el hipocampo (Reiner y col, 2004).

4.7) Preparación de sinaptosomas

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C de acuerdo Sábato y col. (1986) modificado por Martijena y col (1992). La fracción de sinaptosomas se obtuvo homogeneizando el tejido proveniente de cada cerebro anterior en 20 volúmenes de sacarosa 0,32 M usando un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón (Potter-Elvehjem) 15 golpes de émbolo. Luego se realizó una centrifugación diferencial para obtener la fracción deseada. Procediendo de la siguiente forma, primero se centrifugó a 1.000 x g durante 11 min, se recolectó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 10.000 x g durante 20 minutos. El sedimento se resuspendió en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 con una concentración final de proteínas de 0,30 mg/ml (Los preparados de membrana se congelaron y fueron usados a los días de preparación).

4.8) Determinación de la densidad del RGABA_A al sitio de benzodiazepinas

La fijación específica de [³H]-Flunitrazepam ([³H]FNZ) (85 Ci/mmol, New England Nuclear) al sitio de benzodiazepinas del RGABA_A se determinó por filtración. La

fijación se realizó a 4°C en presencia de [³H]FNZ a concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 nM. Cada ensayo se realizó por triplicado, usando alícuotas de 0,20 ml de fracción sinaptosomal. La fijación inespecífica se midió en presencia de diazepam (Hoffman La Roche) en una concentración final de 10 μM para desplazar el ligando marcado del receptor. La incubación se realizó durante 60 minutos protegido de la luz y luego fueron rápidamente filtrados a través de filtros de vidrio Whatman GF/B en un filtrador automático multimuestra Brandel M-24R y lavados tres veces con 4 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM (frío). Los filtros fueron secados a temperatura ambiente y posteriormente colocados en tubos de polietileno en 2,5 ml de una mezcla de centelleo conteniendo tres partes de tolueno por una parte de Tritón X-100 y 0,3% P/V de p-difeniloxazol (PPO). La actividad específica se contó en un contador de centelleo líquido LKB-1214-RACK BETA con una eficiencia de aproximadamente 60% para Tritio. La fijación específica consistió en restar la fijación inespecífica de la fijación total. Posteriormente se calculó la fijación máxima (F_{máx}) y la constante de disociación (K_d) por medio de un ajuste no lineal de la curva de saturación. Cálculos posteriores de fijación se estandarizaron utilizando la cantidad de proteínas por muestra obtenida por medio de la técnica de Lowry y col. (1951) expresando la F_{máx} en fmoles de [³H]-FNZ unido/mg de proteínas.

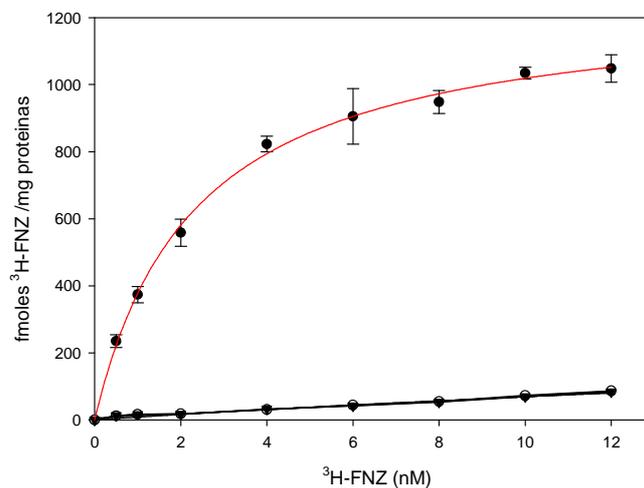


Figura 12- Curva de saturación típica, a 4°C, de la fijación del [³H]-FNZ al RGABA_A en sinaptosomas de cerebro anterior de pollos no estresados. En rojo: unión específica, en negro: unión inespecífica (n=3).

4.9) Determinación de la glucosa plasmática

Los pollos testeados fueron decapitados, y la sangre yugular se recolectó en tubos cónicos con anticoagulante etilendiaminotetracético (EDTA). Luego las muestras de sangre se centrifugaron (1000 x g durante 20 min a 4° C), se recogió el plasma y la glucosa plasmática se cuantificó usando un kit comercial de glucosa oxidasa según indicaciones del fabricante (Wiener Lab, Argentina). La técnica utilizada para cuantificar Glucosa es un procedimiento enzimático a punto final y se basa en la reacción indicadora de peróxido de hidrógeno que une 4-aminoantipirina a un compuesto fenólico (Método de Trinder). La glucosa se oxida por acción de la glucosa oxidasa para dar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Luego, el peróxido de hidrógeno reacciona en presencia de peroxidasa con HBA y con 4-aminoantipiridina (4-AAP) para dar lugar a un tinte de quinonimina rojo. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa y se mide fotométricamente entre 460 y 560 nm.

El método glucosa – oxidasa (método GOD-POD) está basado en las siguientes reacciones.

1. *Glucosa oxidasa*



2. *Peroxidasa*



Figura 13- La glucosa oxidasa oxida a la D-glucosa originando ácido D-glucónico y H₂O₂

4.10) Cuantificación de proteínas

Se usó la técnica de Lowry (1951) para cuantificar proteínas. Esta técnica se basa en las siguientes reacciones: en la primera etapa los iones Cu²⁺, en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces

peptídicos. Estos complejos Cu⁺⁺-proteína (color azul claro) provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina. En la segunda etapa se produce la reducción (en medio básico) del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico (color amarillo), que es reducido por los grupos fenólicos formando un complejo de color azul intenso que es medido espectrofotométricamente a 750 nm. La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Se tomaron 0,2 ml de las muestras (sinaptosomas crudos), 0,2 ml de testigo de Albumina sérica bovina (SIGMA) y 0,2 ml de buffer Tris-HCl (blanco de reactivos), que fueron incubados con 2,00 ml de EDTA-Cu⁺⁺ por 30-60 minutos. Posteriormente se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu (ANEDRA) diluido a la mitad con agua destilada, y se lo incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se realizaron por triplicado. Posteriormente, la absorbancia del color azul desarrollado se midió a 750 nm en un espectrofotómetro. El testigo fue preparado en buffer Tris-HCl 50 mM.

4.11) Inmunohistoquímica

Se usaron pollos de 4-6 días de edad, que fueron administrados icv con NA e inmediatamente expuestos a un Campo Abierto como se describió anteriormente. Se eligieron las dosis de NA (0,025; 0,10; 0,50; 5,00 y 10,00 µg) en las cuales previamente se observó un aumento de la densidad de RGABA_A mediante el ensayo de radioligando y en dosis en las cuales no se vieron efectos significativos. Una vez extraídos, los cerebros fueron mantenidos en la solución fijadora de 4% paraformaldehído-sulfito de sodio-bórax-acido bórico a pH 7,4 durante 5 días y luego sumergidos en sacarosa al 30% P/V durante 48 hs. o hasta que bajaran al fondo del frasco. Se realizaron cortes coronales seriados de rostral a caudal de cerebro anterior de pollo de 36 µm de espesor con un crióstato, tomando como referencia desde la lámina 56 hasta la 59 del atlas de Kuenzel y Mason (1988), que incluyen las áreas *Nidopallium* y *Medial Striatum* (Fig.18). Los cortes fueron recolectados y mantenidos en una solución crioprotectora (30% etilenglicol y 25% glicerina en PBS 0,1M) a -20°C. Los cortes flotantes fueron lavados con PBS, y se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de H₂O₂ 3% en PBS 0,1M con 10% de

Metanol por 20 min a temperatura ambiente. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas se usó leche descremada 5% en PBS durante 90 min a temperatura ambiente (bajo condiciones no permeabilizantes a fin de observar los receptores expuestos en la membrana). Posteriormente, se incubó con anticuerpo monoclonal primario, antesubunidad α_1 y β_{2-3} del RGABA_A (Chemicom-Millipore) en una concentración final de 1:50 y 1:2000 respectivamente, durante 24hs a 4°C en la solución de incubado BSA 1% en PBS 0,1M. Se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado específico anti-mouse (Sigma, St Louis) en dilución de 1:200 durante 2 hs en agitador a temperatura ambiente. A continuación se lavaron e incubaron los cortes con Streptavidina - Peroxidasa (Sigma, St Louis) en una dilución de 1:200 durante 2 hs a temperatura ambiente. La actividad peroxidasa fue puesta de manifiesto con 3,3´diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis), sulfato de níquel y amonio en buffer acetato (0,1 M; pH 6) a temperatura ambiente. Luego del revelado, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados, aclarados con Xileno y cubiertos con cubreobjetos para su observación al microscopio. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio Eclipse TE-U2000-cámara D-100, Nikon, Tokyo, Japon, y tratadas con el programa Image J (NIH). Los resultados obtenidos se expresan como: Densidad Optica (Modificado de Anastasia y col, 2009).

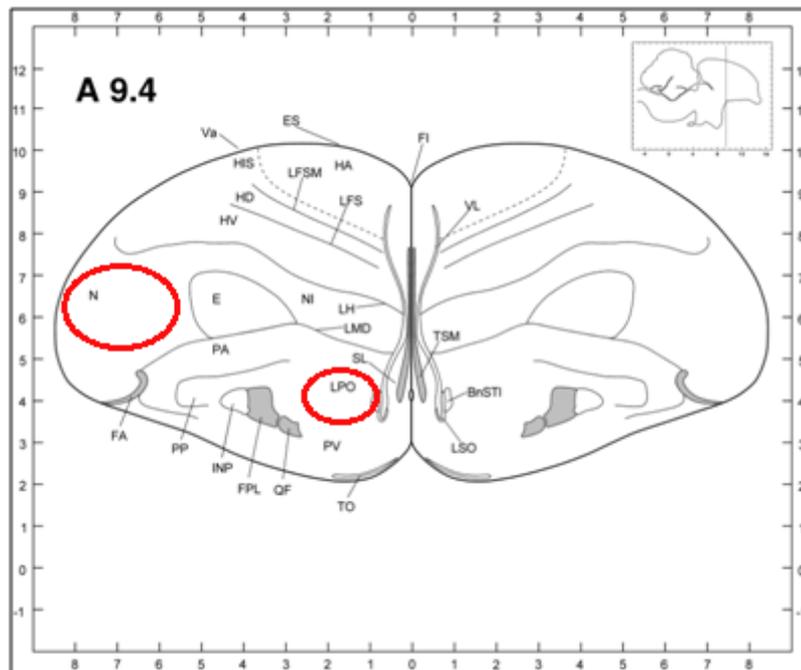


Figura 14- Corte coronal de cerebro anterior de pollo. Los círculos rojos representan las áreas analizadas por microscopia de campo claro, para la determinación del número de células y D.O. Tomado y adaptado de Kuenzel y Mason (1988). Abreviaturas: N (Neostriatum), LPO (Lobulus paraolfactorius). Nueva nomenclatura: Nidopallium (N) y Medial Striatum (MSt), respectivamente (Reiner y col, 2004).

4.12 - Análisis Estadísticos

Los datos comportamentales obtenidos fueron analizados mediante un test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido de una prueba *a posteriori* de Dunn (comparaciones múltiples). Cuando los criterios de homogeneidad de varianzas y normalidad se alcanzaron, los datos fueron analizados por un ANOVA de una o dos vías, según el caso, seguido de una comparación de medias individuales de Newman-Keuls. El criterio de significancia empleado en todos los casos fue $p < 0,05$.

5- RESULTADOS

5.1- Efecto de diferentes dosis de noradrenalina inyectada icv en el comportamiento en un Campo Abierto.

A los fines de analizar la acción farmacológica de diferentes dosis de noradrenalina sobre el comportamiento de pollos neonatos sometidos a un estrés agudo, pollos de 4-6 días de edad se inyectaron icv con 8 dosis de NA (0,025; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 2,50; 5,00 y 10,00 ug) y fueron expuestos a un Campo Abierto durante 10 minutos.

Los resultados comportamentales fueron analizados con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que reveló un efecto significativo entre los diferentes grupos de las aves inyectadas ($H=77,24$, $p < 0.001$). Una prueba *a posteriori* de Dunn mostró que la latencia de ambulación de las dosis de más bajas (0,025; 0,050; 0,10 μg) y más elevadas (5,00 y 10,00 μg) de NA fueron significativamente diferentes al grupo inyectado con solución fisiológica ($p < 0,05$). En la fig. 15 se observa que las diferentes dosis de noradrenalina inducen un efecto dosis dependiente en forma de U en el comportamiento de aves estresadas.

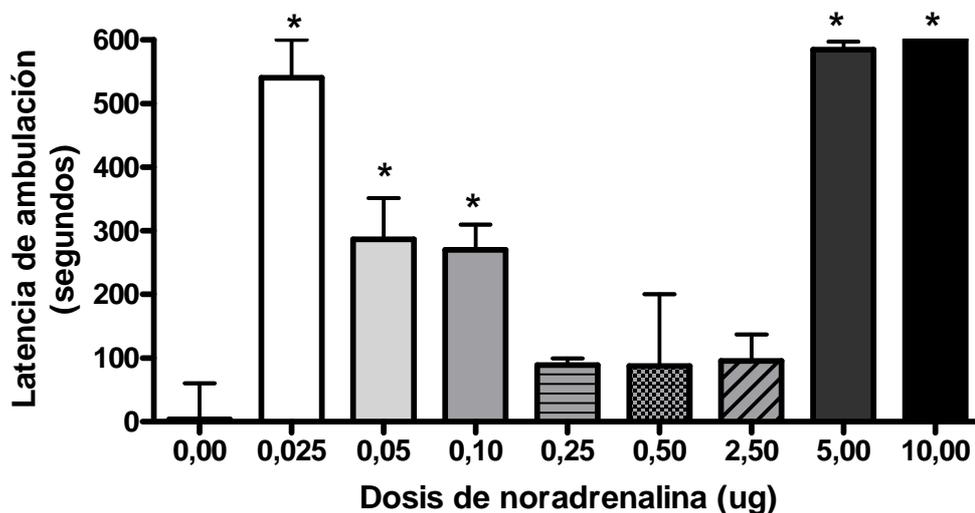


Figura 15- Efecto de la inyección icv de diferentes dosis de noradrenalina en la latencia para iniciar la ambulación en pollos de 4-6 días de edad en un Campo Abierto. Las barras representan la mediana \pm rango. $n = 14-25$. * $p < 0,05$ significativamente diferente del grupo inyectado con solución fisiológica (Dunn).

Se analizaron otros parámetros comportamentales en aves estresadas, como número de ambulaciones, latencia de defecación, número de defecaciones y número de escapes. Una prueba de Kruskal-Wallis mostró un efecto significativo del número de ambulaciones $H=34,13$ ($p < 0,001$), latencia de defecación $H=33,24$ ($p < 0,05$) número de defecaciones $H=17,84$ ($p < 0,05$) y escapes $H=27,07$ ($p < 0,05$). Una prueba *a posteriori* de Dunn reveló que las dosis de NA (5,00 y 10,00 μg) tienen una disminución significativa en el número de cuadrados ambulados comparados con el grupo que fue inyectado con solución fisiológica, indicando que las concentraciones mas elevadas tienen un efecto más pronunciado en la actividad locomotora de pollos sometidos a un Campo Abierto. También, se observó una disminución significativa en el número de escapes entre el grupo inyectado con solución fisiológica y las dosis de NA (0,025; 0,05; 0,10; 5,00; 10,00 μg). Además, mostró un descenso significativo en el número de defecaciones en la dosis de 10,00 μg comparado con las aves inyectadas con solución fisiológica.

Tabla 1. Parámetros comportamentales de pollos de 4-6 días sometidos a un Campo Abierto e inyectados con diferentes dosis de noradrenalina.

Noradrenalina icv (µg)	Número de ambulaciones	Latencia de defecación	Número de defecaciones	Número de de escapes
0,00 (solución fisiológica)	27 ± 10-80	74 ± 12-310	1 ± 1-2	1.5 ± 0-7
0,025	18 ± 3-47	90 ± 43-600	1 ± 1-1.5	0 ± 0-0*
0,05	8 ± 0-67	142 ± 28-600	1 ± 1-1	0 ± 0-0*
0,10	15 ± 12-56	415 ± 118-600*	2 ± 1-2	0 ± 0-0*
0,25	5 ± 3-16	278 ± 200-310	1 ± 1-1.5	0 ± 0-0.5
0,50	25 ± 8-60	518 ± 141-600*	1 ± 1-2	1.0 ± 0- 6
2,50	18 ± 3-52	171 ± 3-600	1 ± 1-1	3.0 ± 0-8
5,00	2 ± 0-12*	44 ± 3-72	1 ± 1-1.5	0 ± 0-0*
10,00	0 ± 0-1*	565 ± 95-600*	0 ± 0-1*	0 ± 0-0*

Cada valor muestra la mediana ± rango. n=10-20 pollos/grupo. (*p < 0.05) significativamente diferente del mismo grupo inyectado con solución fisiológica.

Los resultados fármaco-comportamentales muestran que las dosis mencionadas de NA inducen un efecto inhibitor del comportamiento de forma dosis dependiente en pollos neonatos sometidos a un estrés agudo.

5.2- Antagonismo de receptores adrenérgicos

De acuerdo a los resultados obtenidos en aves inyectadas con noradrenalina y sometidas a un estrés agudo, se propusieron nuevos experimentos fármaco-comportamentales para analizar si las diferencias encontradas a distintas concentraciones fueron debidas a una posible modulación dual de distintos subtipos de adrenoreceptores.

5.2.1- Efecto de diferentes dosis de fentolamina inyectada (ip) en el comportamiento en un Campo Abierto

La prueba de Kruskal-Wallis reveló un efecto significativo ($H= 15,20$; $p < 0,01$) entre el grupo salino y los grupos inyectados con diferentes dosis de fentolamina. Una prueba *a posteriori* de Dunn mostró que las dosis de 32.800 nmol/kg y 65.6000 nmol/kg tuvieron un aumento significativo ($p < 0,05$) en el tiempo para comenzar a ambular del grupo de aves inyectadas con el antagonista α_{1-2} adrenergico con respecto al grupo inyectado con solución fisiológica, en las dosis bajas de fentolamina no se observaron cambios significativos. Por lo tanto, se eligió 250 nmol/kg como dosis de trabajo. Fig.16

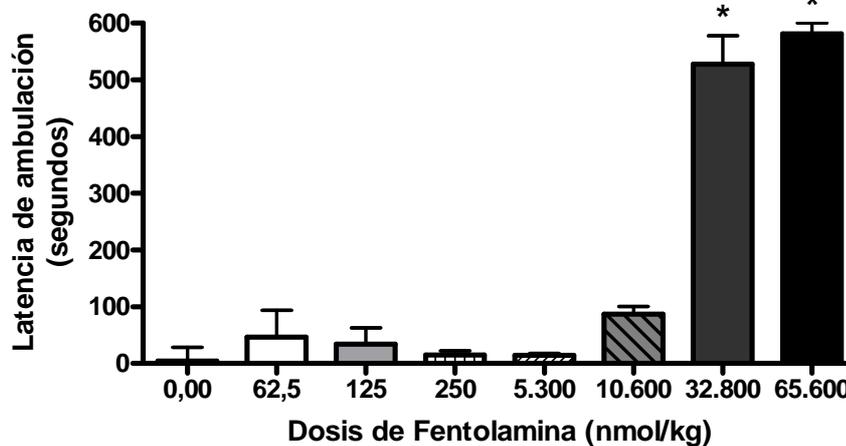


Figura 16- Efecto de la inyección ip de diferentes dosis de fentolamina en la latencia para iniciar la ambulación en un Campo Abierto de pollos de 4- 6 días de edad. Las barras representan la mediana \pm rango. $n = 5-8$. * $p < 0,05$ significativamente diferente del solución fisiológica (Dunn).

5.2.2- Efecto de 250 nmol/kg de fentolamina (antagonista α -adrenérgico no selectivo) administrada sistémicamente sobre el comportamiento de aves estresadas y las distintas dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricularmente .

Una prueba de Kruskal-Wallis reveló un efecto significativo ($H= 75,49$; $p < 0,001$) de las inyecciones del antagonista fentolamina en la latencia de ambulaci3n de pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto con diferentes dosis de noradrenalina. La prueba *a posteriori* de Dunn mostr3 que hubo un aumento de la latencia para comenzar a ambular en pollos inyectados con fentolamina y las dosis 5,00 y 10,00 μg de NA ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las latencias de ambulaci3n entre los grupos de pollos inyectados con diferentes dosis de NA (Fig.15) y los grupos que recibieron la coadministraci3n de fentolamina y distintas dosis de NA (Fig. 17).

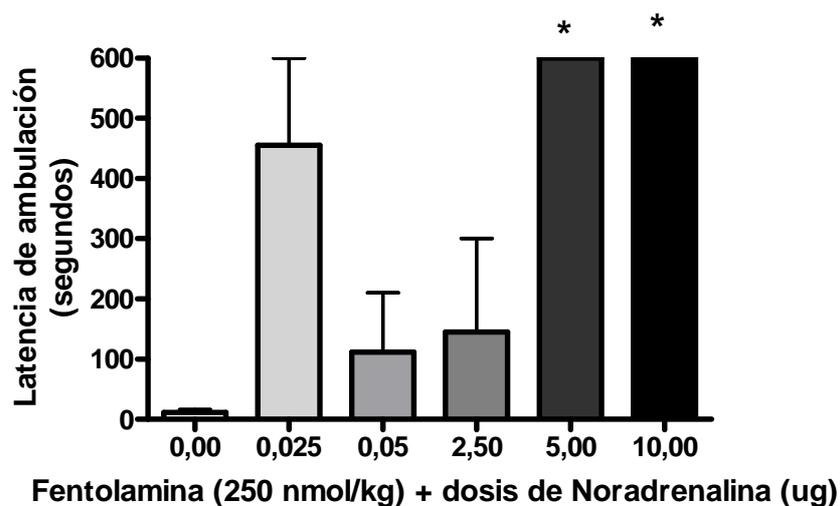


Figura 17- Efectos de 250 nmol/kg de fentolamina (ip) sobre la latencia para iniciar la ambulaci3n en un Campo Abierto de pollos de 4- 6 d3as de edad y las distintas dosis de NA (icv). Las barras representan la mediana \pm rango. $n = 5-8$. * $p < 0,05$ significativamente diferente del grupo inyectado con soluci3n fisiol3gica (Dunn).

La Tabla 2 muestra el efecto de fentolamina inyectada ip sobre el comportamiento de pollos de 4-6 d3as de edad expuestos a una prueba de Campo Abierto y diferentes dosis de noradrenalina inyectadas icv. Una prueba de Kruskal-Wallis mostr3 un efecto significativo en el n3mero de ambulaciones ($H = 41,44$, $p < 0,01$) donde se observ3 una

disminución significativa de los cuadrados ambulados entre el grupo de pollos inyectados con fentolamina y con las dosis de 5,00 y 10,00 ug de NA con respecto al grupo de aves inyectadas con solución fisiológica. Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en la latencia de defecación ($H = 13,29$, $p < 0,05$), ni en el número de defecaciones ($H = 26,14$, $p < 0,05$) y tampoco en el número de escapes ($H = 42,84$, $p < 0,01$) entre los grupos de aves que fueron inyectados con fentolamina y distintas dosis de NA y el grupo inyectado con solución fisiológica.

Tabla 2. Parámetros comportamentales de pollos de 4-6 días inyectados con 250 nmol/kg de fentolamina y diferentes dosis de noradrenalina expuestos a un Campo Abierto

Fentolamina (250 nmol/kg) + Dosis de noradrenalina (µg)	Número de ambulaciones	Latencia de defecación	Número de defecaciones	Número de escapes
0,000	100 ± 73-150	65 ± 15-90	1 ± 1-1	5 ± 0-7
0,025	6 ± 0-27	284 ± 100-543	1 ± 0.5-1	1 ± 0-2
0,050	17 ± 3-61	70 ± 15-110	1 ± 0,5-1	0 ± 0-1
2,50	17 ± 1-47	350 ± 195-600	0.5 ± 0 -1	1 ± 0-3
5,00	0 ± 0-4*	25 ± 20-330	1 ± 1-1	0 ± 0-1
10,00	0 ± 0-0*	258 ± 156-600	0.5 ± 0-1	0 ± 0-1

Tabla 2. Cada valor de los datos comportamentales representa la mediana ± rango. n = 5-8 pollos /grupo. *p < 0.05 respecto del mismo grupo inyectado con solución fisiológica.

Estos resultados muestran que la administración de fentolamina, antagonista no selectivo (α_{1-2} adrenérgico) no revierte el efecto ansiogénico producido por NA en el rango de concentraciones ensayadas.

5.2.3- Efectos de diferentes dosis de yohimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) administrada sistémicamente en pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto

Una prueba de Kruskal-Wallis reveló un efecto significativo $H= 40,15$ ($p < 0,0001$) sobre la latencia de ambulaci3n en los pollos de 4-6 días inyectados con diferentes dosis de yohimbina. La prueba *a posteriori* de Dunn mostr3 que los grupos de aves inyectados con 156 y 1.092 nmol/kg del antagonista α_2 -adrenérgico tuvieron un aumento significativo de la latencia para comenzar a ambular con respecto al grupo inyectado con soluci3n fisiol3gica ($p < 0,05$). Por lo tanto, se us3 una dosis intermedia (15 nmol/kg) para realizar el tratamiento con noradrenalina (Fig.18).

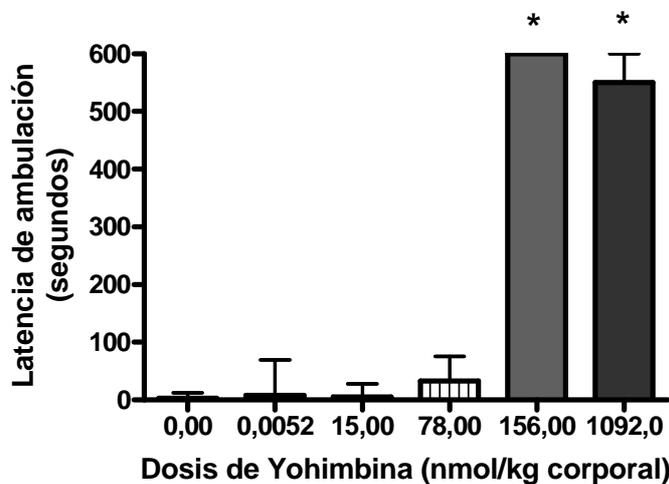


Figura 18- Efecto de la inyecci3n sistémica de diferentes dosis de yohimbina y la latencia para iniciar la ambulaci3n en un Campo Abierto de pollos de 4- 6 días de edad. Las barras representan la mediana \pm rango. $n =12-15$ pollos por grupo. * $p < 0,05$ significativamente diferente del grupo inyectado con soluci3n fisiol3gica (Dunn).

5.2.4- Efecto de 15 nmol/kg de yohimbina (antagonista α_2 -adrenérgico selectivo) administrada sistémicamente sobre el comportamiento de aves estresadas y las distintas dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricularmente .

Una prueba de Kruskal-Wallis mostró un efecto significativo $H=136,90$ ($p < 0,001$) sobre la latencia de ambulaci3n entre los grupos inyectados con el antagonista yohimbina y diferentes dosis de NA. La prueba *a posteriori* de Dunn revel3 que hubo un aumento significativo en la latencia de ambulaci3n en el grupo de pollos que fueron inyectados con yohimbina y 10,00 μg de NA con respecto al grupo de pollos inyectados con soluci3n fisiol3gica (Fig. 19). Adem3s, se registr3 una disminuci3n significativa de 600 a 31 segundos s3lo en el grupo de aves inyectadas con yohimbina y 5,00 μg de NA con respecto al grupo de aves inyectadas con distintas dosis de noradrenalina ($p < 0,05$) Fig. 15.

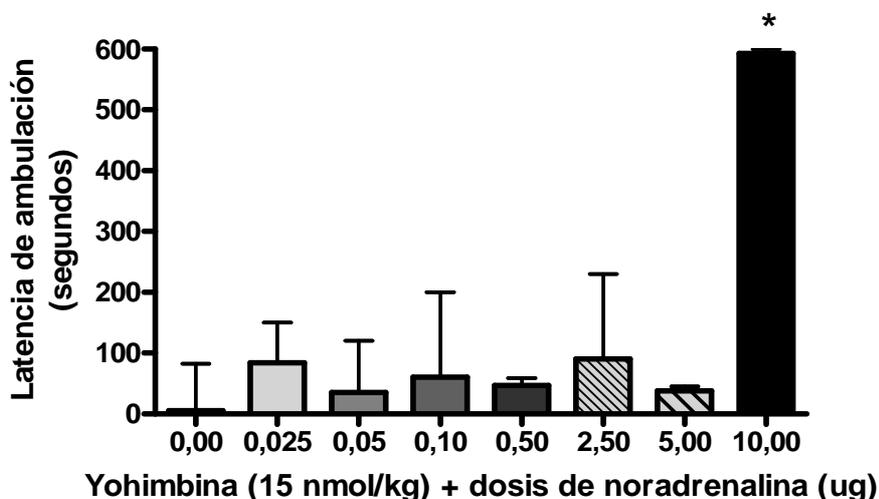


Figura 19- Efecto de una inyecci3n (ip) de 15 nmol/kg de yohimbina y diferentes dosis de noradrenalina inyectada (icv) sobre la latencia para iniciar la ambulaci3n en un Campo Abierto en pollos de 4-6-d3as. Las barras representan la mediana \pm rango. $n = 12-20$ pollos por grupo. * $p < 0,05$ significativamente diferente del grupo inyectado con soluci3n fisiol3gica (Dunn).

La siguiente tabla muestra el efecto de yohimbina inyectada ip sobre el comportamiento de pollos de 4-6 d3as de edad expuestos a un Campo Abierto y diferentes

dosis de noradrenalina inyectadas icv. Una prueba de Kruskal-Wallis mostró un efecto significativo en el número de ambulaciones $H = 75,29$ ($p < 0,01$), en la latencia de defecación $H = 91,50$ ($p < 0,01$) y en el número de defecaciones $H = 31,30$ ($p < 0,05$). Una prueba a posteriori de Dunn reveló una anulación del número de ambulaciones y del número de defecaciones en el grupo de aves inyectadas con yohimbina y 10,00 μg de NA con respecto al grupo inyectado con solución fisiológica ($p < 0,05$). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en el número de escapes $H = 57,04$ ($p < 0,05$) entre los pollos inyectados con yohimbina y diferentes dosis de NA con respecto al grupo que fue inyectado con solución fisiológica.

Tabla 3. Parámetros comportamentales de pollos de 4-6 días inyectados con 15 nmol/kg de yohimbina y diferentes dosis de noradrenalina expuestos a un Campo Abierto.

Yohimbina (15 nmol/kg)+Dosis de noradrenalina (μg)	Número de ambulaciones	Latencia de defecación	Número de defecaciones	Número de escapes
0,000	70 \pm 15-175	48 \pm 5-184	1 \pm 1-2	3 \pm 0-6
0,025	75 \pm 3-22	41 \pm 2-360	1 \pm 1-2	0 \pm 0-1
0,050	16 \pm 10-175	14 \pm 2-325	1 \pm 0-1.5	0 \pm 0-1
0,10	12 \pm 3-64	34 \pm 6-195	1 \pm 0-1	0 \pm 0-2
0,50	67 \pm 28-90	174 \pm 72-508	1 \pm 0-1	0 \pm 0-2
2,50	6 \pm 0-69	600 \pm 160-600*	1 \pm 1-2	0 \pm 0-1
5,00	45 \pm 13-170	147 \pm 50-600	1 \pm 1-1	0 \pm 0-3
10,00	0 \pm 0-0*	600 \pm 80-600*	0 \pm 0-1*	0 \pm 0-1

Cada valor de los datos comportamentales representa la mediana \pm rango. $n = 5-8$ pollos / grupo. * $p < 0,05$ respecto del mismo grupo inyectado con solución fisiológica.

Estos resultados muestran que la inyección de yohimbina revirtió el efecto ansiogénico inducido por noradrenalina hasta valores del grupo inyectado con solución fisiológica, sólo cuando es coadministrada con 5,00 µg de noradrenalina.

5.2.5- Efecto de diferentes dosis de propranolol (antagonista β₁₋₂-adrenérgico no selectivo) administrado sistémicamente en pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto

Una prueba de Kruskal-Wallis mostró un efecto significativo $H = 30,44$ ($p < 0,001$) sobre la latencia de ambulación en los pollos de 4-6 días inyectados con diferentes dosis del antagonista propranolol. La prueba *a posteriori* de Dunn reveló un incremento significativo sobre la latencia de ambulación entre los grupos de aves inyectados con 5.000 nmol/kg y 10.000 nmol/kg de propranolol con respecto al grupo de aves inyectados con solución fisiológica ($p < 0,05$). De acuerdo a estos resultados se determinó que la dosis de trabajo es de 250 nmol/kg para realizar el tratamiento con noradrenalina (Fig.20).

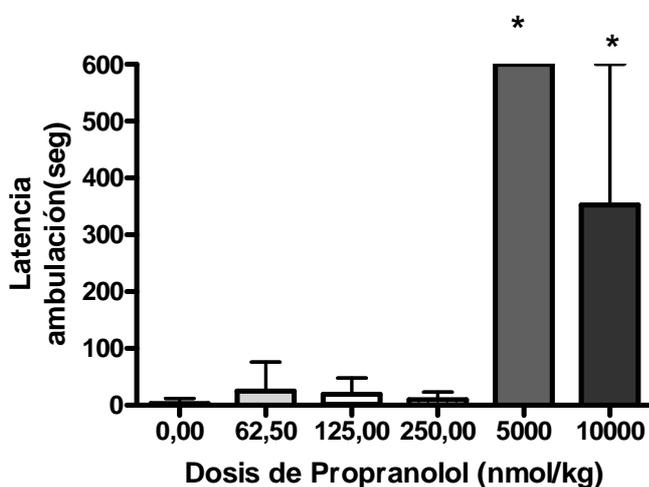


Figura 20- Efectos de diferentes dosis de propranolol inyectadas (ip) sobre la latencia para iniciar la ambulación en un Campo Abierto de pollos de 4- 6 días de edad. Las barras representan la mediana ± rango (25-75%). n = 6-9 pollos por grupo. *p < 0.05 respecto del mismo grupo inyectado con solución fisiológica (Dunn).

5.2.6- Efecto de 250 nmol/kg de propranolol (antagonista β_{1-2} -adrenérgico no selectivo) administrado sistémicamente sobre el comportamiento de aves estresadas y las distintas dosis de noradrenalina inyectadas intracerebroventricularmente .

Una prueba de Kruskal Wallis reveló un efecto significativo $H = 29,33$ ($p < 0,001$) sobre la latencia de ambulación en los grupos de pollos inyectados con una dosis fija del antagonista propranolol y diferentes dosis de noradrenalina. Una prueba a posteriori de Dunn mostró un aumento significativo sobre la latencia para comenzar a ambular entre los grupos de pollos coinyectados con propranolol y las dosis de 5,00 y 10,00 μg de NA con respecto al grupo inyectado con solución fisiológica ($p < 0,05$)(Fig.21). Además, se observó que hubo una disminución significativa desde 540 segundos a 44 segundos en el grupo de pollos inyectados con propranolol y 0,025 μg de NA con respecto al grupo de pollos que fue inyectado con esta misma dosis de NA ($p < 0,05$) (Fig.15).

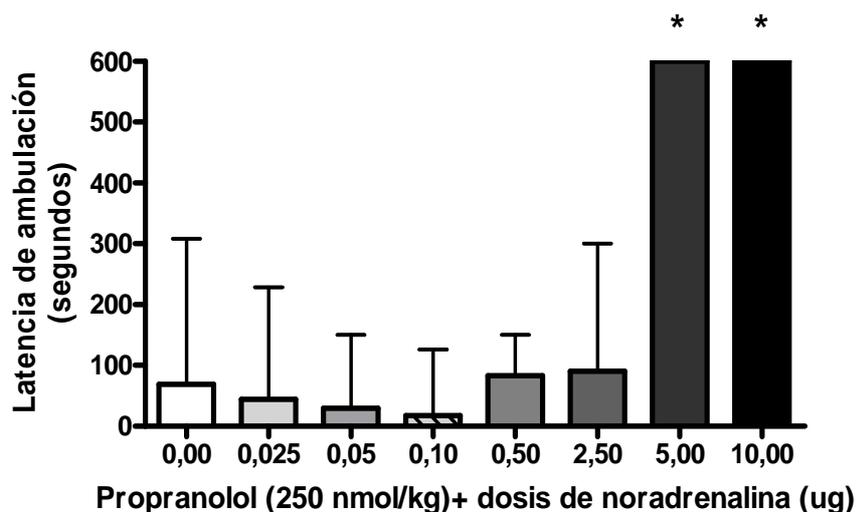


Figura 21- Efecto de 250 nmol/kg de propranolol inyectada (ip) y las diferentes dosis de noradrenalina administradas (icv) sobre la latencia para iniciar la ambulación en un Campo Abierto de pollos de 4- 6 días de edad. Las barras representan la mediana \pm rango. $n = 6-16$ pollos por grupo. * $p < 0,05$ respecto del mismo grupo inyectado con solución fisiológica (Dunn).

Una prueba de Kruskal-Wallis mostró un efecto significativo en el número de ambulaciones $H = 84,39$ ($p < 0,01$), en la latencia de defecación $H = 89,97$, ($p < 0,01$), en el número de defecaciones $H = 53,12$ ($p < 0,05$) y en el número de escapes $H = 71,66$ ($p < 0,05$). Una prueba *a posteriori* de Dunn reveló una disminución significativa sobre el

número de ambulaciones y el número de defecaciones entre los grupos de aves inyectadas con una dosis fija de propranolol y las dosis de 5,00 y 10,00 µg de noradrenalina con respecto al grupo inyectado con solución fisiológica (p <0,05). Además, reveló un incremento significativo sobre la latencia para comenzar a defecar en los grupos de pollos inyectados con propranolol y las dosis de 0,50; 2,50; 5,00 y 10,00 µg de noradrenalina con respecto al grupo inyectado con solución fisiológica (p <0,05). También mostró una disminución significativa sobre el número de escapes entre los grupos que recibieron propranolol y las dosis de 0,025; 5,00 y 10,00 µg/µl de noradrenalina comparados con el grupo inyectado con solución fisiológica (p <0,05) (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros comportamentales de pollos de 4-6 días inyectados con 250 nmol/kg de propranolol y diferentes dosis de noradrenalina expuestos a un Campo Abierto.

Propranolol (250 nmol/kg)+ Dosis de noradrenalina (µg)	Número de ambulaciones	Latencia de defecación	Número de defecaciones	Número de escapes
0,000	53 ± 12-160	27 ± 3-189	1 ± 1-1	3 ± 0-7
0,025	60 ± 2-183	33 ± 2-237	1 ± 1-2	0 ± 0-0*
0,050	56 ± 23-207	69 ± 6-260	1 ± 1-2	0 ± 0-1
0,10	80 ± 6-210	250 ± 130-600	1 ± 1-2	0 ± 0-2
0,50	38 ± 6-44	440 ± 336-600*	1 ± 0.5-1.5	0 ± 0-2
2,50	15 ± 0-26	530 ± 500-600*	1 ± 0-1	0 ± 0-1
5,00	0 ± 0-2*	600 ± 253-600*	0 ± 0-1*	0 ± 0-0*
10,00	0 ± 0-0*	550 ± 130-600*	0 ± 0-1*	0 ± 0-0*

Cada valor de los datos comportamentales representa la mediana ± rango .n = 9-14 pollos /grupo.
*p < 0,05 respecto del mismo grupo inyectado con solución fisiológica.

Estos resultados muestran que la inyección de propranolol (antagonista no selectivo β -adrenérgico) revierte el efecto inducido por la noradrenalina sobre el comportamiento de pollos neonatos sometidos a un estrés agudo hasta valores del control salino, sólo cuando los animales son coinyectados con propranolol y 0,025 μ g de NA.

5.2.7- Efecto de diferentes dosis de insulina inyectada icv en el comportamiento de pollos neonatos expuestos a un Campo Abierto

Una prueba de Kruskal Wallis mostró un efecto significativo $H=16,54$ ($p < 0,01$) sobre la latencia de ambulaci3n en los pollos inyectados con diferentes dosis de insulina. Una prueba *a posteriori* de Dunn registr3 un aumento significativo desde hasta en el grupo de aves inyectadas con 2,500 mUI/ μ l con respecto al grupo inyectado con soluci3n fisiol3gica (Fig.22).

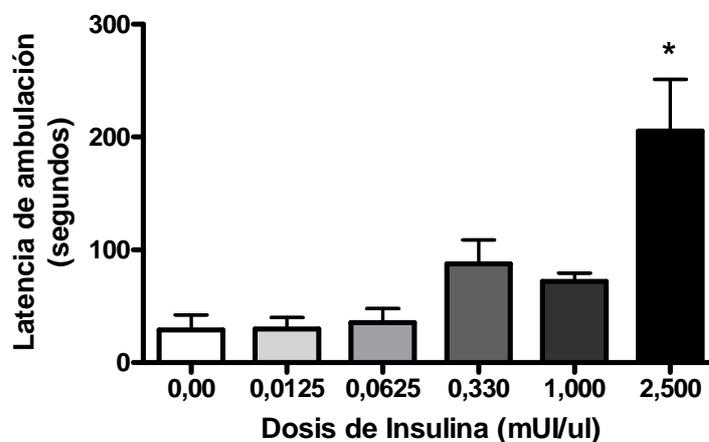


Figura 22- Efecto de la inyecci3n icv de diferentes dosis de insulina en la latencia para iniciar la ambulaci3n en pollos de 4-6 d3as de edad en un Campo Abierto. Las barras representan la mediana \pm rango. $n = 5-9$ pollos/grupo. # $p < 0,05$ significativamente diferente del control (soluci3n fisiol3gica)

Una prueba de Kruskal Wallis no mostr3 efectos significativos sobre la latencia de defecaci3n $H= 1,03$ ($p > 0,05$), ni sobre el numero de defecaciones $H= 1,58$ ($p > 0,05$), ni

en el número de ambulaciones $H= 3,60$ ($p > 0,05$) y tampoco en el número de escapes $H= 7,13$ ($p > 0,05$) de pollos neonatos administrados centralmente con diferentes dosis de insulina en un Campo Abierto (Tabla 6).

Tabla 6 .Efecto de las diferentes dosis de insulina en los parámetros comportamentales de pollos neonatos sometidos de un Campo Abierto.

Dosis de insulina (mUI/ul)	Número de ambulaciones	Latencia de defecación	Número de defecaciones	Número de escapes
0,00 (solución fisiológica)	53 ± 13-70	46 ± 8-68	1 ± 1-2	3± 1-12
0,0125	51 ± 18-70	24 ± 5-65	1 ± 1-2	1 ± 0-2
0,0625	47 ± 8-128	39 ± 6-77	1 ± 1-2	4 ± 2-11
0,33	42 ± 12-65	45 ± 10-75	1 ± 1-2	2 ± 0-5
1,00	56 ± 32-110	55 ± 5-72	1 ± 1-2	1 ± 0-5
2,50	21 ± 12-53	19 ± 5-88	1 ± 1-2	2 ± 0-4

Cada valor de los datos comportamentales representa la mediana ± rango. n = 5-9 pollo/grupo.

5.3- Ensayos de radioligando

Con el propósito de investigar la modulación noradrenérgica sobre el reclutamiento del RGABA_A en la superficie de sinaptosomas inducido por un estresor agudo, se procedió a inyectar las mismas dosis de noradrenalina utilizadas en los ensayos fármaco-

comportamentales, y se determinó la fijación de [³H]-FNZ a los RGABA_A mediante un ensayo de radioligando a 4°C en sinaptosomas provenientes de cerebro anterior de pollo.

5.3.1- Efectos de diferentes dosis de noradrenalina sobre la densidad de RGABA_A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollos estresados y no estresados

Un ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del estrés ($F(1,99) = 68,44, p < 0,001$) y de las diferentes dosis de noradrenalina inyectadas ($F(8,99) = 5,28, p < 0,001$), pero no mostró una interacción significativa entre los tratamientos ($F(8,99) = 2,15, p = 0,04$). Una prueba *a posteriori* Newman Keuls mostró que el estrés indujo un incremento del 42% en la F_{máx} desde 847 fmol/mg de proteína a 1201 fmol/mg de proteína entre los grupos de aves inyectados con solución fisiológica en la condición de no estresados y estresados respectivamente ($p < 0,05$). Además reveló que bajo condiciones de estrés agudo hubo un aumento significativo de la F_{max} desde 1201 fmol/mg de proteína hasta 1469 fmol/mg de proteína entre el grupo de pollos inyectado con 2,50 µg de NA con respecto al grupo inyectado con solución fisiológica (22% $p < 0,01$), también se observó un incremento desde 1.201 fmol/mg de proteína en el grupo tratado con solución fisiológica hasta 1589 fmol/mg de proteína en los pollos inyectados con una dosis de 5,00 µg de NA (32% $p < 0,001$) y un aumento desde 1201 fmol/mg de proteína en el grupo tratado con solución fisiológica hasta 1704 fmol/mg de proteína en el grupo de pollos inyectado con 10,00 µg de noradrenalina (41% $p < 0,001$). No se observaron diferencias significativas en las F_{max} de los animales no estresados que recibieron la administración de solución fisiológica y las distintas concentraciones de noradrenalina.

Tabla 7: Efectos de diferentes dosis de noradrenalina sobre el reclutamiento de RGABA_A en sinaptosomas de cerebro anterior de pollos no estresados y estresados.

Noradrenalina (µg)	F _{máx} (fmoles [³ H]-FNZ/mg proteínas)	
	No estresados	Estresados
0,00 (solución fisiológica)	847 ± 39	1201 ± 59*
0,025	900 ± 74	1189 ± 63
0,05	862 ± 75	1250 ± 78
0,10	854 ± 47	1130 ± 115
0,50	1050 ± 24	1296 ± 205
1,00	1117 ± 43	1102 ± 127
2,50	932 ± 96	1469 ± 132 [#]
5,00	1049 ± 115	1589 ± 113 ⁺
10,00	1025 ± 88	1704 ± 75 ⁺

Cada valor de F_{máx} representa la media aritmética ± SEM de los valores obtenidos por regresión no lineal de los datos experimentales de la curva de saturación. n = 12-20 pollos/grupo. *p < 0,05 respecto del no estresado inyectado con solución fisiológica. [#]p < 0,01 y ⁺p < 0,001 respecto del mismo grupo estresado inyectado con solución fisiológica.

Un ANOVA de dos vías no mostró efectos significativos de la condición de estrés ($F(1,101) = 3,85$, $p = 0,06$) ni de las diferentes concentraciones de noradrenalina ($F(8,101) = 0,47$, $p = 0,87$), ni tampoco en la interacción de estrés y las dosis de noradrenalina en los valores de Kd ($F(8,101) = 0,52$, $p = 0,83$) (Tabla 8).

Tabla 8: Efectos de diferentes dosis de noradrenalina en los valores de la constante de disociación de afinidad de los RGABA_A-flunitrazepam-sensibles en sinaptosomas provenientes de pollos estresados y no estresados

Noradrenalina (µg)	Kd (nM)	
	No-estresados	Estresados
0,00 (solución fisiológica)	2,56 ± 0,23	3,54 ± 0,38
0,025	3,02 ± 0,34	3,31 ± 0,40
0,05	2,82 ± 0,31	3,11 ± 0,32
0,10	2,73 ± 0,28	2,85 ± 0,16
0,50	3,10 ± 0,26	2,96 ± 0,28
1,00	2,66 ± 0,35	2,73 ± 0,37
2,50	2,34 ± 0,22	3,10 ± 0,31
5,00	2,47 ± 0,32	2,93 ± 0,45
10,00	2,60 ± 0,29	3,01 ± 0,46

Cada valor de Kd representa la media ± SEM de los valores obtenidos a partir de una regresión no lineal de los datos experimentales de una curva de saturación. n = 12-20 pollos/grupo.

A los fines de demostrar la participación de diferentes subtipos de receptores noradrenergicos sobre la modulación de la densidad de RGABA_A se estudió el efecto producido por los antagonistas noradrenergicos yohimbina y propranolol coadministrados con diferentes dosis de noradrenalina como se mencionó en el punto **4.4.1.2**.

5.3.2- Efectos de yohimbina en la densidad del RGABA_A flunitrazepam-sensible en sinaptosomas de pollos no estresados y estresados

Un ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo en el tratamiento con yohimbina y diferentes dosis de noradrenalina ($F(4,26) = 9,31, p < 0,001$) y también en la interacción de ambas variables ($F(4,26) = 3,46, p < 0,05$). Sin embargo, no se observó un efecto significativo del estrés ($F(1,32) = 1,87, p = 0,180$) en los grupos de pollos inyectados con una dosis fija de yohimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) y diferentes dosis de noradrenalina. Un análisis *a posteriori* de Newman Keuls mostró que hubo un incremento desde 984 fmol/mg de proteínas hasta 1392 fmol/mg de proteínas ($p < 0,01$) entre las Fmax de los sinaptosomas de cerebro anterior de pollos inyectados con yohimbina y salina comparados con el grupo de aves inyectado con yohimbina y 0,05 ug de noradrenalina en la condición de no estresados. Además, se registró un aumento significativo en las Fmax desde 865 fmol/mg de proteínas hasta 1369 fmol/mg de proteínas ($p < 0,05$) en los sinaptosomas provenientes de los grupos de aves inyectadas con yohimbina y salina con respecto al grupo que recibió la coadministración de yohimbina y 0,05 ug de noradrenalina en la condición de estrés (Tabla 9).

Tabla 9: Efectos de la coadministración de Yohimbina y diferentes dosis de Noradrenalina sobre la densidad de RGABA_A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollo estresados y no estresados

		F _{máx} (fmoles [³ H]-FNZ/mg proteínas)	
Yohimbina (nmol / kg)	Noradrenalina (μg)	No estresados	Estresados
15	0,00 (solución fisiológica)	984 ± 147	865 ± 75
15	0,025	1170 ± 96	1187 ± 74
15	0,05	1392 ± 94*	1369 ± 85 [#]
15	5,00	838 ± 24	1166 ± 113
15	10,00	831 ± 91	887 ± 73

Cada valor de F_{máx} representa la media aritmética ± SEM de los valores obtenidos por regresión no lineal de los datos experimentales de la curva de saturación. n = 6 pollos/grupo. [#]p < 0,05 y *p < 0,01 significativamente diferente del mismo grupo inyectado con solución fisiológica (Newman Keuls).

Un ANOVA de dos vías mostró una interacción significativa de la administración de yohimbina y las diferentes dosis de noradrenalina sobre el reclutamiento del RGABA_A ($F(4,40) = 9,99, p < 0,001$) en la condición de estresados. Un análisis *a posteriori* de Newman Keuls reveló un incremento significativo ($p < 0,01$) desde 865 fmol/mg de proteínas a 1369 fmol/mg de proteínas entre los grupos de aves inyectados con yohimbina y solución fisiológica con respecto al grupo inyectado con yohimbina y 0,05 μg de NA (Fig.23). También se observó una disminución significativa en la $F_{\text{máx}}$ del 27% ($p < 0,02$) y del 52% ($p < 0,001$) a las dosis de 5,00 y 10,00 μg de NA, respectivamente, respecto al grupo inyectado con solución fisiológica y la misma dosis de NA en la condición de estresados (Tabla 7 y Fig.23).

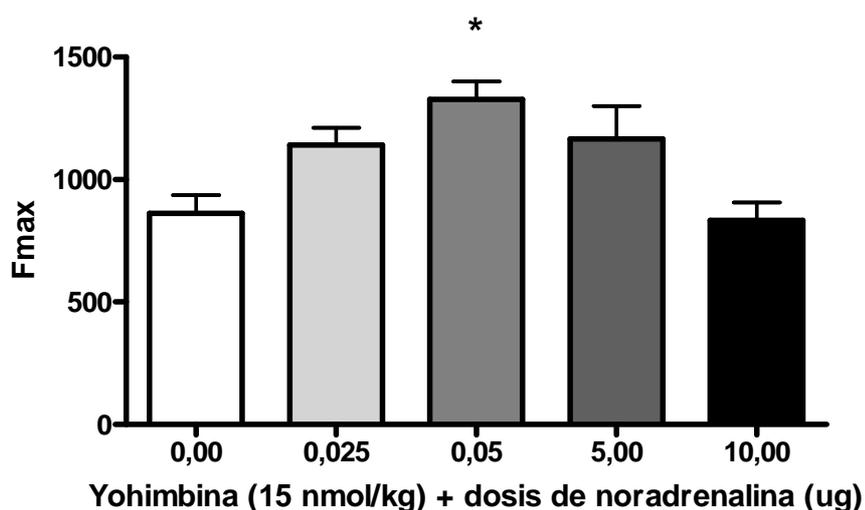


Figura 23-Efecto de 15 nmol/kg de yohimbina administrado sistémicamente y las distintas dosis de noradrenalina inyectada (icv) en la densidad del RGABA_A en sinaptosomas de cerebro anterior de pollos en la condición de estrés. Las barras representan la media \pm SEM. $n = 6$ pollos /grupo. * $p < 0,01$ significativamente diferente del grupo inyectado con yohimbina y solución fisiológica. (Newman Keuls).

Un ANOVA de dos vías en los valores de K_d no mostró efectos significativos del estrés ($F(1,32) = 0,18, p = 0,80$), de la coadministración de yohimbina y distintas dosis de

noradrenalina ($F(5,32) = 0,64, p = 0,68$), ni de la interacción del estrés y el tratamiento ($F(5,32) = 1,80, p = 0,14$) (Tabla 10).

Tabla 10: Efectos de yohimbina y diferentes dosis de noradrenalina en los valores de la constante de disociación de afinidad de los RGABA_A-Flunitrazepam-sensibles provenientes de sinaptosomas de pollos estresados y no estresados

Yohimbina (nmol/kg)	Noradrenalina (µg)	Kd (nM)	
		No estresados	Estresados
15	0,00 (solución fisiológica)	2,50 ± 0,42	3,11 ± 0,63
15	0,025	3,04 ± 0,32	2,80 ± 0,09
15	0,05	2,93 ± 0,23	3,83 ± 0,72
15	5,00	3,32 ± 0,26	2,47 ± 0,51
15	10,00	3,17 ± 0,26	2,35 ± 0,23

Cada valor de Kd representa la media ± SEM de los valores obtenidos a partir de una regresión no lineal de los datos experimentales de una curva de saturación. n = 6 pollos/grupo.

5.3.3- Efectos de propranolol en la densidad del RGABA_A-flunitrazepam-sensible en sinaptosomas de pollos no estresados y estresados

Un ANOVA de dos vías de los valores en la densidad máxima del ³[H]-FNZ al RGABA_A no mostró un efecto significativo del estrés F(1,24)= 0,044, p = 0,83, de la coadministración de propranolol y noradrenalina F(4,24)= 1,23, p =0,31, ni en la interacción entre ambas variables F (4,31) = 1,67, p = 0,18 (Tabla 11).

Tabla 11: Efectos de la coadministración de Propranolol y Noradrenalina sobre la densidad de RGABA_A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollo estresados y no estresados

		F _{máx} (fmoles [³ H]-FNZ/mg proteínas)	
Propranolol (nmol/kg)	Noradrenalina (μg)	No estresados	Estresados
250	0,00 (salina)	1388 ± 95	1486 ± 169
250	0,025	1554 ± 99	1287 ± 235
250	0,05	1604 ± 51	1477 ± 203
250	10,00	1602 ± 230	1760 ± 156

Cada valor de F_{máx} representa la media aritmética ± SEM de los valores obtenidos por regresión no lineal de los datos experimentales de la curva de saturación. n = 5-8 pollos/grupo.

Un ANOVA de dos vías no mostró una interacción significativa de la administración de propranolol y las diferentes dosis de noradrenalina sobre el reclutamiento del RGABA_A (F (3,34) = 0,50, p = 0,68) en la condición de estresados. No se registraron diferencias

significativas entre los grupos de pollos estresados administrados con NA y aquellos que recibieron la coadministración de propranolol y NA (Tabla 7 y Fig 24).

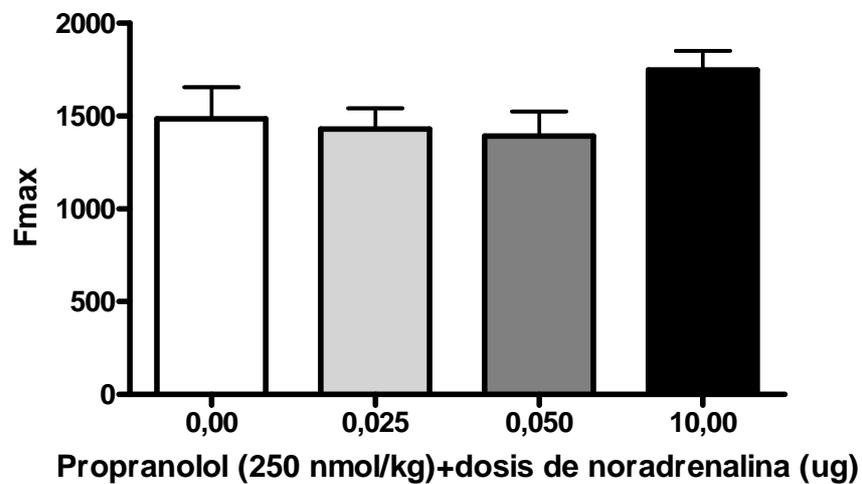


Figura 24-Efecto de 250 nmol/kg de propranolol administrado sistémicamente y las distintas dosis de noradrenalina inyectada icv sobre la densidad del RGABA_A en pollos estresados. Las barras representan la media ± SEM. n = 6.

Un ANOVA de dos vías de los valores de Kd no mostró diferencias significativas del estrés $F(1,32) = 1,33$, $p = 0,26$, ni del tratamiento de propranolol y noradrenalina $F(4,32) = 1,59$, $p = 0,20$, ni en la interacción entre ambas variables, $F(4,32) = 1,41$, $p = 0,25$ (Tabla 12).

Tabla 12: Efectos de propranolol y diferentes dosis de noradrenalina en los valores de la constante de disociación de afinidad de los RGABA_A-flunitrazepam-sensibles en sinaptosomas de pollos estresados y no estresados

Propranolol (nmol/kg)	Noradrenalina (µg)	Kd (nM)	
		No estresados	Estresados
250	0,00 (salina)	3,35 ± 0,60	3,27 ± 0,45
250	0,025	4,07 ± 0,47	2,92 ± 0,40
250	0,05	3,85 ± 0,36	3,20 ± 0,30
250	10,00	3,95 ± 0,49	3,37 ± 0,61

Cada valor de Kd representa la media ± SEM de los valores obtenidos a partir de una regresión no lineal de los datos experimentales de una curva de saturación. n = 5-8 pollos/grupo.

5.4- Insulina

5.4.1- Efectos de diferentes dosis de insulina sobre la densidad de RGABA_A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollo estresados y no estresados

Un ANOVA de dos vías de diferentes dosis de insulina sobre la densidad de RGABA_A mostró un efecto significativo del estrés agudo ($F_{1,23} = 4,07$, $p < 0,05$), de la administración de insulina ($F_{5,23} = 4,40$, $p < 0,005$) y una interacción significativa entre ambas variables ($F_{5,23} = 2,96$, $p < 0,033$). Una prueba *a posteriori* Newman Keuls reveló un incremento significativo (41 %; $p < 0,024$) en la F_{máx} a partir de 746 fmol/mg de

proteína a 1054 fmol/mg de proteína entre los grupos inyectados con solución fisiológica en la condición de estresado y no estresado. Por otro lado, la prueba de Newman-Keuls mostró, en la condición estresado, que la insulina incrementó la Fmax de 746 fmoles/mg de proteína a 994 fmoles/mg de proteína (33%, $p < 0,01$) para la dosis de 1,00 mUI/ μ l, a 1144 fmoles/mg de proteína (53%, $p < 0,001$) para 2,50 mUI/ μ l. Sin embargo, la insulina no indujo un aumento en la Fmax en la condición estresado, sugiriendo que el aumento en la densidad del RGABA_A en los sinaptosomas provenientes de pollos no estresados ocurre por un mecanismo similar al estrés (Tabla 13).

Tabla 13: Efectos de la administración central de diferentes dosis de insulina sobre la densidad de RGABA_A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollo estresados y no estresados

Insulina (mUI/ μ l)	Fmáx (fmoles [³ H]-FNZ/mg proteínas)	
	No estresados	Estresados
0,00 (solución fisiológica)	681 \pm 66	1172 \pm 112 *
0,0625	1340 \pm 19 [#]	1276 \pm 22
0,330	942 \pm 37	1308 \pm 35
1,000	1130 \pm 116 [#]	1300 \pm 114
2,500	1291 \pm 135 ⁺	1355 \pm 135

Los datos representan la media aritmética \pm SEM de cada valor de Fmáx. n = 4-6 pollos/grupo. * $p < 0,02$, [#] $p < 0,01$ y ⁺ $p < 0,001$ significativamente diferente del grupo solución fisiológica no estresado

Tabla 14: Efectos de diferentes dosis de insulina en los valores de (Kd) constante de disociación de los RGABA_A-Flunitrazepam-sensibles en sinaptosomas de pollos estresados y no estresados

Insulina (mUI/μl)	Kd (nM)	
	No estresados	Estresados
0,00 (solución fisiológica)	2,36 ± 0,31	1,98 ± 0,21
0,0625	2,06 ± 0,54	1,92 ± 0,38
0,330	1,81 ± 0,22	2,35 ± 0,24
1,000	1,90 ± 0,36	2,10 ± 0,45
2,500	1,82 ± 0,26	2,27 ± 0,23

Los datos representan la media aritmética ± SEM de cada valor de Kd. n = 4-6 pollos/grupo.

Un ANOVA de dos vías de los valores de Kd no mostró un efecto significativo del estrés, $F(1,28) = 0,47$, $p = 0,50$, ni del tratamiento con insulina, $F(4,28) = 0,12$, $p = 0,97$, ni una interacción entre ambas variables, $F(4,28) = 0,85$, $p = 0,60$ (Tabla 14).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa plasmática de pollos luego de la administración de diferentes dosis de insulina ($F(6,42) = 1,75$; $p = 0,56$) en las condiciones estresados y no estresados ($F(1,42) = 0,33$; $p = 0,56$), ni una interacción entre ambas variables ($F(6,42) = 1,49$; $p = 0,20$). Por lo que las dosis administradas de insulina fueron eugluceantes (Tabla 15).

Tabla 15: Efectos de inyecciones de insulina en los niveles de glucosa plasmática (mg/dl) en pollos estresados y no estresados.

Insulina (mUI/ μ l)	No estresados	Estresados
0,00	244 \pm 24	249 \pm 20
0,0125	247 \pm 12	238 \pm 16
0,062	252 \pm 13	283 \pm 27
0,330	286 \pm 26	293 \pm 32
0,660	266 \pm 12	234 \pm 19
1,00	325 \pm 30	250 \pm 25
2,50	265 \pm 20	290 \pm 31

Cada valor representa la media \pm S.E.M. (n= 4-6 pollos/grupo).

5.5- Inmunohistoquímica

Un ANOVA de una vía no mostró efectos significativos del estrés sobre la expresión de la subunidad α_1 del RGABA_A (F (1,14)= 1,65; p=0,21), ni tampoco sobre la expresión de la subunidad β_{2-3} del receptor (F (1,14)= 0,29; p=0,59).

Tabla 16- Efectos del estrés sobre la expresión de la subunidad α_1 y β_{2-3} del RGABA_A estresados y no estresados.

Solución fisiológica (Controles)	Subunidad α_1 del RGABA _A	Subunidad β_{2-3} del RGABA _A	n
Sin estrés	60,80± 9,1	80,20± 8,0	8
Con estrés	68,12± 10,2	82,50± 5,5	8

Cada valor de Densidad Óptica representa la media ± SEM. n = 8 pollos/grupo.

5.5.1-Interacción inducida la noradrenalina sobre la expresión de la subunidad α_1 del RGABA_A en Nidopallium y Medial Striatum en pollos estresados.

Un ANOVA de una vía mostró un efecto significativo $F(5,18) = 6,43$ ($p < 0,001$) sobre la subunidad α_1 del RGABA_A y las diferentes dosis de noradrenalina en pollos bajo la condición de estrés. La prueba *a posteriori* Newman Keuls mostró un aumento significativo de la Densidad Óptica desde 58,08 a 72,34 ($p < 0,01$) en el grupo tratado con 0,025 μg de NA y de 58,08 a 72,00 ($p < 0,01$) en el grupo que fue inyectado con 5,00 μg de NA con respecto al grupo de aves inyectado con solución fisiológica en Nidopallium. En Medial Striatum reveló un incremento significativo desde 59,00 hasta 73,40 ($p < 0,05$) de la Densidad Óptica en el grupo inyectado con 5,00 μg de NA con respecto al grupo inyectado con solución fisiológica en la condición de estrés.

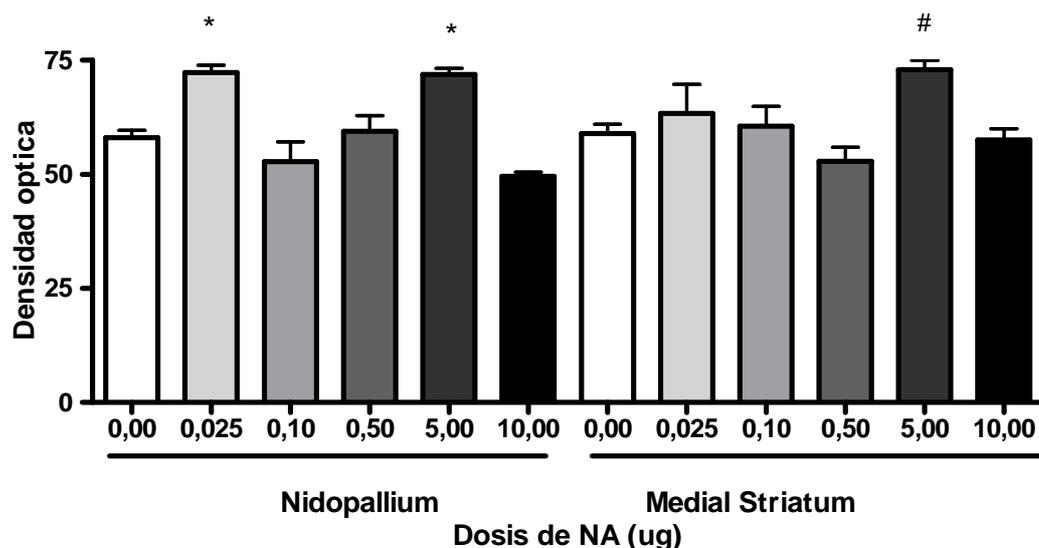


Figura 25- Relación de D.O en pollos neonatos sometidos a un Campo Abierto e inyectados con diferentes dosis de NA. Las barras representan la media aritmética \pm S.E.M. $n = 4$. # $p < 0,05$ y * $p < 0,01$ significativamente diferente del grupo inyectado con solución fisiológica (Newman Keuls).

5.5.2-Interacción inducida por la noradrenalina sobre la expresión de la subunidad β_{2-3} del RGABA_A en Nidopallium y Medial Striatum en pollos estresados.

Un ANOVA de una vía no mostró un efecto significativo de las dosis de noradrenalina en la expresión de la subunidad β_{2-3} del RGABA_A en pollos estresados, $F(5,18) = 1,62$ ($p = 0,13$).

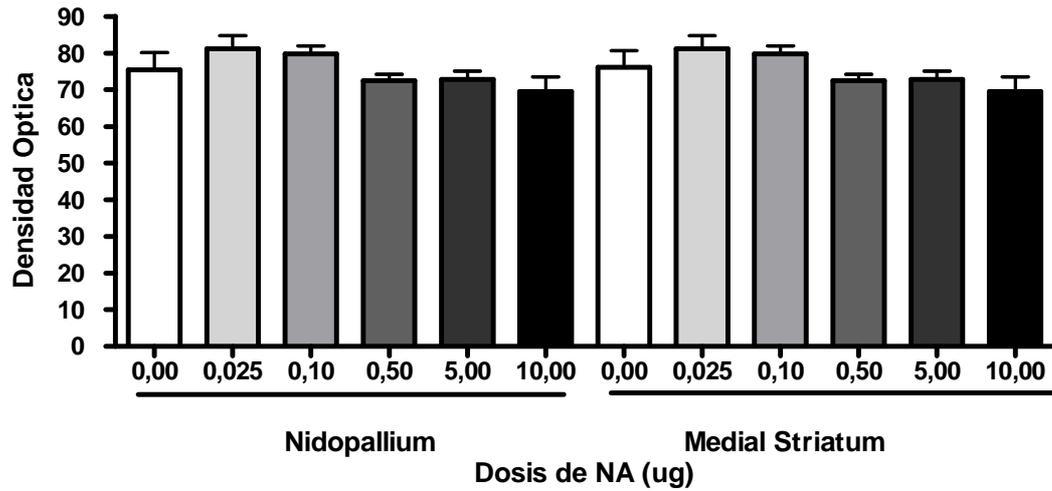
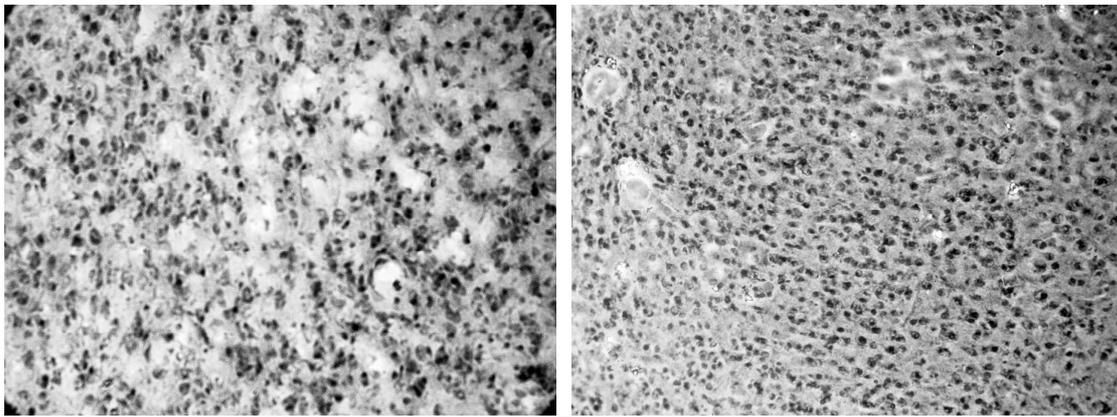


Figura 26- Relación de D.O en pollos neonatos sometidos a un Campo Abierto e inyectados con diferentes dosis de NA. Las barras representan la media aritmética \pm S.E.M. n = 4.

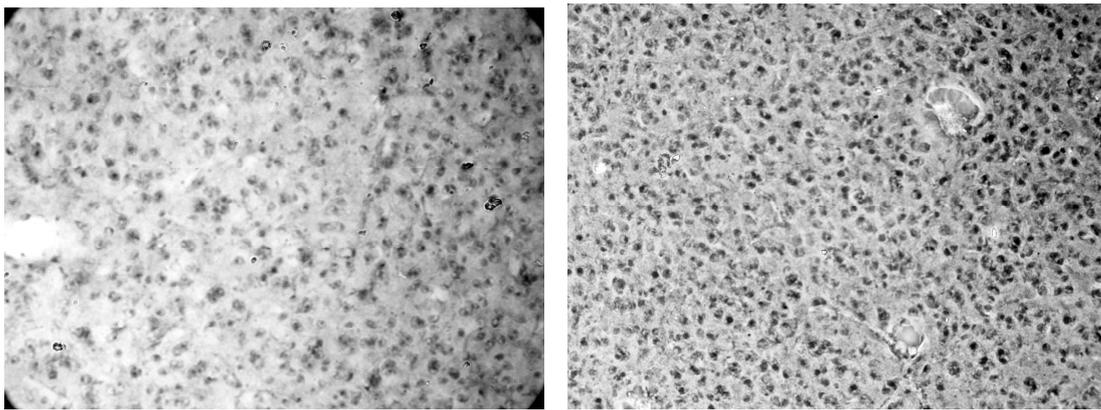
Micrografías



a)

b)

Micrografía de cortes de cerebro de Medial Striatum de pollos estresados: a) inyectados con salina, b) inyectados con 0,50 μ g de noradrenalina donde se observa un aumento de densidad óptica de la subunidad α_1 del RGABA_A en el área cerebral analizada.



a)

b)

Micrografía de un corte de tejido de Nidopallium de pollos estresados: a) inyectados con salina, b) inyectados con 0,50 μ g de noradrenalina, en esta área se observa un aumento significativo de densidad óptica de la subunidad α_1 del RGABA_A.

6- DISCUSIÓN

La prueba de Campo Abierto es una herramienta preferentemente usada para describir emocionalidad, exploración y marcado territorial en roedores. Sin embargo, en pollos, involucra un fuerte componente inductor de miedo y/o ansiedad. Esta situación experimental está determinada principalmente por dos factores: *i*) el ambiente nuevo (*novelty*) y *ii*) el aislamiento (Faure y col, 1983). Ambos factores son los principales motivadores del miedo e inductores del estrés, reflejado por la inhibición de la actividad natural. Gray (1987) define al “*novelty*” como una de las condiciones experimentales más potentes que conducen a una respuesta emocional negativa. Ha sido descrito que, la exposición inicial a un Campo Abierto en aves, induce en una primera fase un congelamiento o “*freezing*” (ausencia completa de movimiento y vocalizaciones) ó inmovilidad (únicamente ausencia de movimiento), y representa la mayor intensidad del miedo en la prueba (Faure y col, 1983). Durante el período de congelamiento el pollito también puede exhibir un comportamiento similar al sueño (*sleep-like behavior*) que se caracteriza por la posición sentado con los ojos cerrados. Este comportamiento jugaría un rol fundamental en respuesta al estrés (Zhang y col, 2003). En una segunda fase, este comportamiento va siendo reemplazado por un comportamiento más activo evidenciado como una mayor actividad exploratoria, mayor número de defecaciones y escapes, y un aumento en las vocalizaciones de distrés lo que refleja un periodo de reinstalación social (Gallup y Suarez, 1980). De acuerdo a las características descritas anteriormente, esta prueba fue utilizada en el presente trabajo de Tesis como un estresor agudo para los estudios fármaco-comportamentales.

El ensayo de radioligando de la unión del flunitrazepam a su sitio en el RGABA_A brinda información específica de los cambios rápidos que ocurren en el sistema GABAérgico en respuesta a un estresor agudo. La densidad del receptor central de benzodiazepinas se usó como una medida de la densidad del RGABA_A expuestos en la membrana de sinaptosomas. Los sinaptosomas son artefactos creados por rotura y autosellado de la zona sináptica entre dos terminales nerviosas y contiene una pequeña porción del soma neuronal, el citoesqueleto, las organelas y las vesículas sinápticas con los neurotransmisores y receptores para la recaptación en la zona presináptica (De Robertis y

col, 1961; Whatley y Harris, 1996). Son metabólicamente activos, ya que retienen numerosas propiedades de las terminales nerviosas, razón por la cual son muy usados para estudios *in vitro* del sistema nervioso central (Weinberger y Cohen, 1982; Nicholls, 1989). La estabilidad y la actividad de los RGABA_A en la sinapsis podrían estar dinámicamente moduladas por mecanismos intracelulares como extracelulares (Lüscher y Keller, 2004). En el presente trabajo de Tesis, se estudiaron los efectos de la administración *in vivo* de insulina, noradrenalina y/o antagonistas noradrenérgicos, propranolol y yohimbina, sobre el reclutamiento del RGABA_A-flunitrazepam-sensible inducido por un estresor agudo en cerebro anterior de pollos de 4-6 días de edad.

El efecto de diferentes dosis de NA inyectadas icv en el comportamiento en un Campo Abierto se observan en la Fig. 15. Dosis bajas de NA (0,025; 0,050 y 0,10 µg) indujeron un incremento significativo en la latencia para comenzar a ambular, al igual que las dosis altas ensayadas (5,00 y 10,00 µg). Estos resultados muestran una respuesta ansiogénica, inducida por las diferentes dosis de NA administradas exógenamente en pollos sometidos a un estresor agudo. Esta latencia aumentada sugeriría que la administración central de NA estaría induciendo un incremento en la ansiedad de las aves ante el ambiente nuevo de la prueba. Dosis ansiolíticas de diazepam indujeron una disminución de la latencia para comenzar a ambular en un Campo Abierto demostrando el efecto ansiogénico de la prueba (Salvatierra y Arce, 2001). De acuerdo con esto, Gallup y Suarez (1980) describieron al congelamiento como un índice de ansiedad caracterizado por la ausencia de movimiento para abandonar el centro del Campo Abierto. Por lo tanto, el sistema noradrenérgico estaría participando en la inducción de la ansiedad quizás a través de la activación de vías noradrenérgicas que incrementan el “arousal” o estado de vigilia o atención ante un ambiente nuevo. A este respecto Kety (1972) definió el *arousal* como una emoción básica, un estado generalizado asociado al reconocimiento y exploración de estímulos nuevos y significativos. Incluso no sólo abarcaría una amplia gama de comportamientos de vigilia, y atención sino también la vigilancia para el miedo y el estrés (Gibbs y Summers, 2002). Se conoce que NA estaría participando en desórdenes relacionados con el miedo y la ansiedad (Sullivan y col, 1999). La Tabla 1 muestra que al incremento en la latencia para comenzar a ambular se correlaciona con una disminución significativa en el número de ambulaciones registradas en el grupo de aves inyectadas con las dosis más elevadas de NA. Ha sido descripto que NA a altas concentraciones inhibe la

actividad locomotora cuando es administrada de forma exógena en pollos neonatos (Denbow y col, 1981 y Zhang y col, 2003) y en ratas (Harro y col, 1995).

La concentración de NA cerebral en respuesta a la estimulación producida por un choque eléctrico en las patas (Galvez y col, 1996) ha sido correlacionada con el incremento de adrenalina periférica (Gold y van Buskirk, 1978). Diversos experimentos demostrarían el mejoramiento de la formación de la memoria luego de un evento estresante por adrenalina administrada periféricamente (Liang y col, 1990; Liang y col, 1995) o NA administrada centralmente mediado por la participación de diferentes adrenoreceptores (Hatfield y McGaugh, 1999). La curva dosis-respuesta en U observada en la Fig. 15 muestra un efecto dual de las diferentes dosis de NA ensayada sobre la latencia de ambulación sugiriendo que podrían estar activándose distintos subtipos de receptores adrenérgicos. De este modo, la acción de NA causando un incremento en la respuesta de miedo/ansiedad en un Campo Abierto podría estar mediada por la activación de diferentes subtipos de adrenoreceptores, los cuales por diferentes mecanismos podrían estar modulando el comportamiento de aves estresadas. En primates, se observó una relación de curva en U invertida entre los disparos de neuronas noradrenérgicas y la vigilancia en una tarea de discriminación visual, mostrando una atención más pobre a bajas y altas concentraciones de NA administrada (Aston-Jones y col, 1994). Ha sido descrito que durante la formación de la memoria luego de una prueba evitación pasiva, en pollos neonatos, la administración central de NA indujo un efecto dual dosis dependiente que estaría siendo mediado por receptores α -adrenérgicos y β -adrenérgicos (Gibbs y Summers, 2002). Estos autores describieron que la activación de α_2 - y β -adrenoreceptores aumentarían la consolidación de la memoria mientras que los α_1 -adrenoreceptores tendrían un efecto inhibitorio (Gibbs y Summers, 2002; 2003). En ratas, se observó que β -adrenoreceptores estarían siendo activados durante la consolidación de una memoria emocional (Cahill y McGaugh, 1996; McGaugh 2004; Tully y Bolshakov, 2010). Por lo tanto, la inhibición de la actividad natural en el Campo Abierto involucraría la acción de NA al regular la habilidad de la estimulación fármaco-selectiva de los receptores adrenérgicos y/o modular la transmisión sináptica inhibitoria a través de estas diferentes subpoblaciones de adrenoreceptores.

La administración sistémica de una dosis de 250 nmol/kg del antagonista α -adrenérgico no selectivo, fentolamina no revirtió el efecto ansiogénico inducido de las distintas dosis de NA ensayadas en pollos neonatos sometidos a un estresor agudo (Fig. 17).

Esto podría deberse a que tanto α_1 - como α_2 -adrenoreceptores estarían mediando efectos opuestos en las respuestas comportamentales ante un estresor agudo. Durante una prueba que evalúa memoria espacial fueron descritas acciones opuestas entre α_1 - y α_2 -adrenoreceptores sugiriendo una función central diferente de ambas subpoblaciones de receptores adrenérgicos (Arnsten 1998, 2000). Además, estudios electrofisiológicos mostraron efectos opuestos en la frecuencia de corrientes inhibitorias postsinápticas que sugieren una modulación diferencial de NA en neuronas GABAérgicas de hipotálamo de rata de acuerdo al subtipo α_1 - o α_2 -adrenoreceptores involucrados (Han y col., 2002). Es probable que en pollos inyectados con fentolamina el patrón de respuesta observada sea determinado por el balance de ambos subtipos de α -adrenoreceptores.

Cuando la respuesta comportamental se antagoniza con el bloqueante selectivo α_2 -adrenérgico, yohimbina, sólo a una dosis de 5,00 μg de NA, se bloqueó el incremento inducido por NA en la latencia para ambular hasta valores comparables con el grupo inyectado con solución fisiológica. También se observó la desaparición del comportamiento similar al sueño observado durante el período de congelamiento. Esto sugiere que habría un bloqueo de la respuesta comportamental inducida por el estresor y la noradrenalina administrada exógenamente. Ha sido demostrado que ratones *knockout* para α_2 -adrenoreceptores mostraron un comportamiento de ansiedad en un laberinto en cruz elevado (Lähdesmäki y col, 2002). Asimismo, en ratas, ha sido reportado que esta subpoblación de adrenoreceptores estarían induciendo una respuesta ansiogénica ante un estresor agudo (Morilak y col, 2005). La inactivación de los receptores α_2 -adrenérgicos por la administración sistémica de yohimbina posterior a una prueba de evitación pasiva, indujo un mejoramiento en la consolidación de esta memoria aversiva, y estos efectos fueron dependientes de la distribución relativa de estos adrenoreceptores en cerebro de aves (Gibbs y col, 2010). Por lo tanto, es posible que el subtipo de α_2 -adrenoreceptores participe en la acción de la modulación noradrenérgica sobre el comportamiento ante un Campo Abierto. Por otro lado, ha sido descrito que en neuronas hipotalámicas secretoras de CRH (*corticotropin-releasing hormone*), la activación de α_1 -adrenoreceptores disminuyó la liberación de esta hormona mientras que la activación de los subtipos α_2 -adrenoreceptores, la estimuló (Han y col, 2002). Dado que la liberación de esta hormona constituye un primer factor que inicia la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en respuesta directa a un estresor (Ehlers y col, 1983; Plotsky y col, 1989), es probable que sea el subtipo α_2 -adrenoreceptores los involucrados en la respuesta de ansiedad aumentada durante la

exposición a un Campo Abierto. Estos resultados sugieren que la NA a través de la activación del subtipo α_2 de receptores adrenérgicos estimularía el comportamiento ansiogénico inducido por un aumento en la liberación de CRH regulando el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal. Sin embargo, poco se conoce sobre la activación de la vía α_2 -adrenérgica en relación al estrés agudo. Así, estos resultados sugieren que los α_2 -adrenoreceptores podrían jugar un rol protector en contra de desórdenes como la ansiedad. Siendo en aves la primera vez que se describe una participación de estos receptores en la modulación del sistema noradrenérgico sobre la respuesta a un estresor agudo.

Ha sido demostrado la participación del subtipo de receptor β -adrenérgico en la formación de memorias aversivas en cerebro anterior de pollos a concentraciones de bajas de NA exógena (Gibbs y col, 2000). La Fig.21 muestra que una dosis de 250 nmol/kg de propranolol, antagonista competitivo no selectivo β -adrenérgico, bloqueó completamente el incremento de la latencia de ambulación en el grupo de aves inyectadas con la dosis de 0,025 μ g de NA, hasta valores comparables con el grupo de aves administrado con solución fisiológica. Estos resultados sugieren que la inyección de propranolol revierte los efectos sobre el comportamiento inducidos por las dosis mas bajas de NA. La activación de estos adrenoreceptores ha sido reportado, en ratas, al bloquear el incremento de NA central mediante la administración de propranolol durante un estado de miedo (Rodríguez-Romaguera y col, 2009) o posterior a un estresor agudo (Cecchi y col, 2002). En pollos, se ha observado que bajas dosis de NA exógena requiere la señalización adrenérgica que estimula los β -adrenoreceptores promoviendo la consolidación de la memoria en áreas cerebrales como el Medial Striatum (Gibbs y Summers, 2005). Estos resultados indican que NA estaría ejerciendo una acción ansiogénica observada como un aumento en la latencia para comenzar a ambular en un Campo Abierto mediante la activación de diferentes subtipos de adrenoreceptores según la concentración de neurotransmisor en el espacio intersináptico.

Numerosas evidencias experimentales muestran una liberación de NA central luego de un estímulo estresante agudo como inmovilización, exposición al frío, choque eléctrico en las patas, exposición al ruido así también como estresores fisiológicos como hipotensión o hipoglucemia (Abercrombie y Jacobs, 1987; Cecchi y col, 2002a; Morilak y col, 1987a,b; Pacak y col, 1995; Svensson, 1987; Valentino y col, 1993, Galvez y col, 1996). La participación de diferentes subtipos de adrenoreceptores sería responsable de la selectividad de la acción de la NA durante un estrés agudo. Se conoce que la liberación de corticosterona

posterior a un estrés mejora la consolidación de la memoria en pollos (de Vaus y col, 1980; Gibbs y Ng, 1986) y esta acción parece estar relacionada con la acción de NA sobre los diferentes adrenoreceptores (Gibbs y Summers, 2002). Es posible que la liberación de glucocorticoides durante un estrés agudo aumente la liberación de NA central y esta a través de los distintos adrenoreceptores module a los diferentes sistemas de neurotransmisión. A este respecto se conoce que la exposición aguda a un Campo Abierto induce un incremento en los niveles de corticosterona plasmática y en la densidad de RGABA_A de sinaptosomas de cerebro anterior de pollos (Salvatierra y col, 2009). Por lo tanto, es posible que NA central module la fuerza de inhibición GABAérgica dependiendo del subtipo de receptor activado.

La Tabla 7 muestra un incremento del reclutamiento de RGABA_A de un 42% en la F_{max} entre pollos estresados y no estresados del grupo de aves inyectadas con solución fisiológica. Resultados similares fueron descritos luego de paradigmas de estrés agudo en aves (Martijena y col, 1992, Marín y col, 1997, Salvatierra y Arce, 2001, 2008, Cid y col, 2008, 2013). Además, la administración central de dosis de 2,50; 5,00 y 10,00 µg incrementó la densidad máxima de RGABA_A respecto de los valores obtenidos en pollos no estresados. Estos resultados demuestran que la administración central de NA modula el reclutamiento de RGABA_A en sinaptosomas de cerebro anterior de pollos neonatos. Cid y col (2008) demostraron que una inyección sistémica de adrenalina incrementó la densidad de RGABA_A en cerebro anterior de pollo de una forma aditiva al inducido por un estrés agudo, posiblemente a través de una liberación de NA central ya que adrenalina no pasa la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, es posible que NA liberada posterior a un estrés agudo induzca un incremento en el reclutamiento de RGABA_A al modular la fuerza sináptica inhibitoria. La Tabla 9 muestra que la yohimbina sistémica coadministrada con dosis altas de NA disminuye los valores de F_{máx}, en aves estresadas, a valores alcanzados con NA sola (Tabla 7), es decir que el reclutamiento de RGABA_A estaría siendo modulado a través de la activación de receptores α₂-adrenérgicos. Se reportó que se requiere de la activación de los α₂-adrenoreceptores, así como de una intacta función presináptica noradrenérgica, para el correcto funcionamiento de los RGABA_A (Stràc, 2012). Sin embargo, el propranolol no modificó los valores de F_{máx} en aves estresadas respecto de los obtenidos con NA sola, es decir que a las dosis más elevadas de NA no intervendrían los subtipos de receptores β-adrenérgicos en el reclutamiento de RGABA_A (Tabla 11 y Tabla 7). Ha sido reportado que la inhibición mediada por estos receptores puede ser

diferencialmente modulada por α_2 - y β -adrenoreceptores (Ciranna y col, 2004, Nai y col, 2009). Las diversas funciones del GABA en el SNC son coordinadas no sólo por la heterogeneidad de los RGABA_A sino también por los mecanismos de tráfico y agrupación de los mismos a la superficie celular en sitios extrasinápticos o postsinápticos especializados dependiendo de la composición de sus subunidades δ y γ respectivamente (Vithlani y col, 2010). Poco se conoce acerca de la funcionalidad de estos tipos de receptores, sin embargo un aumento en la expresión de las subunidades extrasinápticas α_5 y δ estuvieron asociadas a desórdenes neurológicos (Hines y col, 2011). Es posible que los efectos ansiogénicos observados en aves sometidas a un Campo Abierto e inyectadas con bajas concentraciones de NA involucren la modulación de receptores β -adrenérgicos sobre RGABA_A extrasinápticos.

Experimentos neuroquímicos y de inmunomarcación consideran que la composición α_1 , β_{2-3} , γ_2 del RGABA_A es la más abundante en el cerebro (Fernandez-López y col, 1997, Pirker y col. 2000). Se ha descrito que una mutación puntual en la subunidad α_1 , puede disminuir la sensibilidad de los sitios de benzodiazepinas en el RGABA_A sin modificar la afinidad, causando pérdida del efecto sedativo, anestésico y anticonvulsivante, sugiriendo que estos efectos son mediados principalmente por receptores que contengan intacta la funcionalidad de esta subunidad (Rudolf y col, 1999). La Fig. 25 muestra una mayor expresión de la subunidad α_1 en Nidopallium y en Medial Striatum. Ambas zonas están involucradas fuertemente en la respuesta emocional al estrés (Gibbs y col, 2010). En Nidopallium se observó una diferencia significativa en la Densidad Óptica en las dosis de 0,025 y 5,00 μg de NA mientras que en Medial Striatum se observó una diferencia significativa sólo en la dosis de NA de 5,00 μg comparadas con los controles salinos en la condición de estrés. Estas dos zonas telencefálicas muestran una importante expresión de neuronas GABAérgicas (Aller y col, 2003) y se colocan con neuronas noradrenérgicas que expresan de manera uniforme el subtipo α_2 -adrenérgico (Diez-Alercia y col, 2009). Además, ha sido publicado que la NA produciría cambios significativos en las corrientes postsinápticas inhibitorias GABAérgicas según la acción de los α -adrenoreceptores ubicados en el soma o en terminales axónicas (Shin y col, 2007). Por lo tanto, el incremento en la expresión de la subunidad α_1 de RGABA_A en estas zonas podría estar asociado al efecto ansiogénico inducido por la administración central de NA y la exposición a un Campo Abierto. Por otro lado, la expresión de la subunidad β_{2-3} del RGABA_A mostró un patrón homogéneo en las áreas telencefálicas estudiadas proveniente

de cortes de cerebro anterior de pollos estresados e inyectados con diferentes dosis de NA. Estos resultados son similares con publicaciones previas donde se observó que la subunidad $\beta_{2,3}$ del RGABA_A tuvo un intenso patrón de tinción distribuido extensamente en el cerebro (Pirker y col, 2000; Sur y col, 2001).

La Fig. 22 muestra que la administración icv de una dosis de 2,5 mUI/ μ l de insulina, no hipoglucemiante, indujo un aumento significativo de la latencia para comenzar a ambular respecto del grupo de aves inyectadas con solución fisiológica. Estos resultados muestran por primera vez que insulina administrada centralmente modifica el comportamiento de miedo/ansiedad en una prueba de Campo Abierto. Un estrés por inmovilización, en ratas, indujo un efecto desmejorador en la formación de la memoria la cual fue revertida por la administración icv de una dosis de 6 mUI de insulina indicando un efecto neuroprotector de la hormona (Moosavi, 2007). La administración central de diferentes dosis de insulina incrementó significativamente la densidad de RGABA_A en sinaptosomas de pollos no estresados, sin registrarse cambios significativos en sinaptosomas de pollos estresados (Tabla 13). Estos resultados están de acuerdo a los reportados previamente donde se observó que insulina sistémica aumentó significativamente la densidad máxima de RGABA_A en sinaptosomas provenientes de cerebro anterior de pollos no estresados (Cid y col, 2008). De esta forma el incremento en el reclutamiento de RGABA_A inducido por la administración de insulina central en aves no estresadas tendría un efecto neuroprotectivo sobre el estrés agudo. Estudios realizados en cultivos neuronales mostraron que la adición de insulina al medio inhibía la disminución de RGABA_A a la membrana sináptica inducida por una privación de oxígeno sugiriendo un mecanismo de inserción aumentado del receptor en la membrana postsináptica (Mielke y Wang, 2005). También se observó en células que expresan la isoforma $\alpha_1\beta_{2-3}\gamma_2$ que la adición de insulina produce una acción directa, rápida y reversible sobre las corrientes sinápticas generadas por GABA en sus receptores (Williams, 2008). Los resultados obtenidos sugieren que el incremento del reclutamiento de RGABA_A en la membrana sináptica no es adicional al inducido por el estrés y estos efectos podrían estar involucrando un mecanismo similar. Por lo tanto, es posible que el estrés y la insulina estimulen la fosforilación de RGABA_A y de sus proteínas asociadas, y consecuentemente incrementen la velocidad del transporte vesicular, la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y la final inserción del receptor en la superficie de la membrana (Cid y col, 2008) y que este efecto observado pueda constituir un fenómeno

neuroprotectivo en el cerebro de aves expuestas a un evento estresante al aumentar la fuerza de la transmisión sináptica inhibitoria quizás dependiente de la fosforilación de RGABA_A (Benavidez y Arce, 2002; Vetiska y col, 2007) al estimular la activación de la PI-3K, lo cual produce la formación de un complejo ternario Akt-PRIP-subunidad β_2 del RGABA_A que induce el incremento de la reinsertión de RGABA_A en la superficie neuronal (Fuji y col, 2010).

Consideraciones finales

La combinación de curvas dosis-respuesta de NA con el uso de antagonistas específicos reveló que la modulación noradrenérgica sobre el comportamiento de pollos neonatos sometidos a un estresor agudo estaría mediada por β -adrenoreceptores a una baja concentración de NA, mientras que a una dosis alta se activarían los α_2 -adrenoreceptores. Los resultados sobre el reclutamiento de RGABA_A mostraron que las dosis más altas ensayadas de NA indujeron un incremento en la densidad de receptores en sinaptosomas de cerebro anterior de aves expuestas a un Campo Abierto y este efecto estaría mediado por la activación de α_2 -adrenoreceptores sobre RGABA_A localizados postsinápticamente. Mientras que los β -adrenoreceptores estarían modulando no sólo la respuesta ansiogénica inducida por el Campo Abierto y las bajas dosis de NA sino también la densidad máxima de RGABA_A posiblemente ubicados en sitios extrasinápticos. En resumen, la NA central tendría un importante rol en la respuesta emocional y neuroquímica orquestando diversas actividades en el cerebro de pollos neonatos al modular dinámicamente la fuerza sináptica inhibitoria GABAérgica dependiendo del subtipo de receptor noradrenérgico activado y de la localización de los RGABA_A involucrados.

Proyecciones futuras

- Determinar en ambos hemisferios cerebrales los sitios de fosforilación del RGABA_A y/o de proteínas asociadas que participan en el proceso de reclutamiento inducido por el estrés en subpoblaciones seleccionadas por su diferente perfil de ansiedad.

- Evaluar la actividad del RGABA_A en microsacos provenientes de ambos hemisferios cerebrales de subpoblaciones de aves seleccionadas de acuerdo a su grado de ansiedad mediante la técnica de influjo de cloruro.

- Caracterizar los RGABA_A en cultivo primario de neuronas corticales de pollos mediante estudios cinéticos a los sitios de unión a benzodiazepinas (³H-FNZ) y determinar la funcionalidad de RGABA_A mediante el estudio de la captación de ³⁶Cl durante el influjo de cloruro.

- Examinar la acción farmacológica de insulina y noradrenalina administrada centralmente sobre la expresión y densidad de RGABA_A en subpoblaciones seleccionadas de acuerdo a su grado de ansiedad.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie E D, Jacobs BL, (1987). Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful and nonstressful stimuli. *J. Neurosci.* 7, 2837– 2843.
- Anda RF, Butchart A, Felitti VJ, Brown DW. (2010). Building a framework for global surveillance of the public health implications of adverse childhood experiences. *Am J Prev Med* 39, 93–98.
- Aller MI, Paniagua MA, Pollard S, Stephenson A, Fernandez-Lopez A. (2003). The GABA(A) receptor complex in the chicken brain: immunocytochemical distribution of alpha 1- and gamma 2-subunits and autoradiographic distribution of BZ1 and BZ2 binding sites. *J Chem Neuroanat* 25, 1-18.
- Anastasia A, de Erausquin GA, Wojnacki J, Mascó DH (2007). Protection of dopaminergic neurons by electroconvulsive shock in an animal model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 103, 1542-1552.
- Angrini M, Leslie JC, Shepard RA. (1998). Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 59, 387-397.
- Arias HR, Machu TK, Trudell JR, Blanton MP. (2002). Current perspective of general anesthetic sites of action in ligand-gated ion channel receptors. In recent research developments in Biophysical Chemistry. Editado por Condat CA y Baruzzi A (Research Signpost, Kerala, India).
- Arnsten, AFT. (1998). Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *TICS* 2, 436–447.
- Arnsten AFT. (2000). Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. *Neural Plas.*7, 133–146.
- Armario A, Castellanos JM, Balasch J. (1984). A comparison of corticoadrenal and gonadal responses to acute immobilization stress in rats and mice. *Physiol Behav.* 32, 517-519.

- Aston-Jones G, Rajkowski J, Alexinsky T. (1994). Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. *J Neurosci.* 14, 4467-4480.
- Bali B, Erdélyi F, Szabó G, Kovács KJ (2005). Visualization of stress-responsive inhibitory circuits in the GAD65-eGFP transgenic mice. *Neurosci Lett.* 380, 60-65.
- Bedford FK, Kittler JT, Muller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG, Moss SJ. (2001). GABA (A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci* 4, 908–916.
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW. (2009). Extrasynaptic GABA (A) receptors: form, pharmacology, and function. *J. Neurosci.* 29, 12757–12763.
- Benavidez E. y Arce A. (2002). Effects of phosphorylation and cytoskeleton-affecting reagents on GABA (A) receptor recruitment into synaptosomes following acute stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 497–506.
- Bensabat, S. (1987). Stress: Grandes especialistas responden. Ed. Bilbao: Mensajero.
- Bettler B, Tiao JY. (2010). Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA (B) receptors. *Pharmacol Ther.* 110, 533-43.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rev* 42, 33-84.
- Bevan P. (2001). Insulin signalling. *J Cell Sci* 114, 1429-30.
- Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. (2004). Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinol* 29, 1326-34.

- Benson JA, Low K, Keist R, Mohler H, Rudolph U. (1998). Pharmacology of recombinant gamma-aminobutyric acidA receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated alpha-subunits. *FEBS Lett* 431, 400-404.
- Blanchard JG, Duncan MP. (1997). Effect of combinations of insulin, glucose and scopolamine on radial arm maze performance. *Pharmacol Biochem Behav* 58, 209-14.
- Brickley SG, Cull-Candy SG, Farrant M. (1999). Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABA (A) receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J Neurosci.* 19, 2960-73.
- Buffalari DM, Grace AA. (2007). Noradrenergic modulation of basolateral amygdala neuronal activity: opposing influences of alpha-2 and beta receptor activation. *J Neurosci* 27, 12358–12366.
- Braestrup C, Nielsen M, Nielsen E, Lyon M. (1979). Benzodiazepine receptors in the brain as affected by different experimental stresses: the changes are small and not unidirectional. *Psychopharmacol.* 65, 273-277.
- Brandon N J, Delmas P, Kittler, J T, McDonald, B J, Sieghart W, Brown D. A, Smart TG y Moss SJ. (2000). GABA (A) receptor phosphorylation and functional modulation in cortical neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 275, 38856– 38862.
- Brandon N, Jovanovic J y Moss SJ (2002). Multiple roles of protein kinases in the modulation of gamma-aminobutyric acid (A) receptor function and cell surface expression. *Pharmacol Ther* 94, 113–122.
- Brandon NJ, Jovanovic JN, Colledge M, Kittler JT, Brandon JM, Scott JD, Moss SJ. (2003). A-kinase anchoring protein 79/150 facilitates the phosphorylation of GABA(A) receptors by cAMP-dependent protein kinase via selective interaction with receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci.* 22, 87-97.
- Brunton L, Parker L. (2006). Bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima Edición. Editorial Panamericana.

- Brunig I, Scotti E, Sidler C, Fritschy JM. (2002). Intact sorting, targeting, and clustering of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes in hippocampal neurons in vitro. *J Comp Neurol* 443: 43–55.
- Cahill L, McGaugh JL. (1996) The neurobiology of memory for emotional events; adrenergic activation in amígdala. *Proc West Pharmacol Soc.* 39, 81-4.
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3662–3667.
- Carvajal P, Carlini VP, Schiöth HB, de Barioglio SR, Salvatierra NA (2009). Central ghrelin increases anxiety in the Open Field test and impairs retention memory in a passive avoidance task in neonatal chicks. *Neurobiol Learn Mem.* 91, 402-407.
- Cecchi M, Khoshbouei M, Jarvors M, Morilak D.A. (2002). Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neurosci* 112, 13-21.
- Charney DS, Bremner JD (1999). The neurobiology of anxiety disorders, in *Neurobiology of Mental Illness*. Edited by Charney DS, Nestler EJ, Bunney BS. New York, Oxford University Press, pp 494–517.
- Charney D S. (2004). Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am J Psychiatry* 161, 195-216.
- Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS. (1996). Stoichiometry of a recombinant GABA (A) receptor. *J Neurosci* 16, 5415–5424.
- Chen G, Kittler JT, Moss SJ, Yan Z. (2006). Dopamine D3 receptors regulate GABA (A) receptor function through a phospho-dependent endocytosis mechanism in nucleus accumbens. *J Neurosci* 26, 2513–2521.

- Cid MP, Salvatierra NA, Arce A. (2007). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induced flunitrazepam sensitive-GABA(A) receptor increase in synaptosomes from chick forebrain. *Neurochem Res* 32, 1011-1015.
- Cid MP, Arce A, Salvatierra NA. (2008). Acute stress or systemic insulin injection increases flunitrazepam sensitive-GABA (A) receptor density in synaptosomes of chick forebrain: Modulation by systemic epinephrine. *Stress* 11,101-107.
- Cid MP, Toledo CM, Salvatierra NA. (2013) Recruitment of GABA(A) receptors and fearfulness in chicks: modulation by systemic insulin and/or epinephrine. *Pharmacol Biochem Behav.* 103, 814-820.
- Ciranna L, Licata F, Li Volsi, Santangelo F. (2000). Neurotransmitter-mediated control of neuronal firing in the red nucleus of the rat: reciprocal modulation between noradrenaline and GABA. *Exp. Neurol* 163, 253-263.
- Ciranna L, Licata F, Li Volsi, Santangelo F. (2004). Alpha 2- and beta-adrenoceptors differentially modulate GABA(A) and GABA(B) mediated inhibition of red nucleus neuronal firing. *Exp. Neurol* 185, 297-304.
- Connolly CN, Krishek BJ, McDonald BJ, Smart TG, Moss SJ (1996). Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 271, 89–96.
- Connolly C. N, Kittler J. T, Thomas P, Uren J. M, Brandon N. J, Smart T G, Moss S. J. (1999). Cell surface stability of gamma-aminobutyric acid type A receptors. Dependence on protein kinase C activity and subunit composition. *J Biol Chem* 274, 36565– 36572.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64, 477–505.
- Cullinan WE, Wolfe TJ. (2000). Chronic stress regulates levels of mRNA transcripts encoding beta subunits of the GABA(A) receptor in the rat stress axis. *BrainRes.* 887, 118–124.

- Cullinan WE, Ziegler DR y Herman J.P. (2008) Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct. Funct.* 213, 63–72.
- Craft S, Peskin E, Schawartz MW, Rasin M, Porte D (1998). Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurol.* 50, 164-168.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S. (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11696–11701.
- Davis M, Redmond DE, Baraban JM (1979). Noradrenergic agonists and antagonists: effects on conditioned fear as measured by the potentiated startle paradigm. *Psychopharmacol.* 65, 111-118.
- Debiec J, Ledoux J (2004). Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience* 129, 267–272.
- Decavel C, y vandenPol AN (1990). GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. Comp.Neurol.* 302, 1019–1037.
- Decavel C y vandenPol AN (1992). Converging GABA- and glutamate-immunoreactive axons make synaptic contact with identified hypothalamic neurosecretory neurons. *J. Comp. Neurol.* 316, 104–116.
- De Robertis E, Pellegrino de Iraldi A, Rodríguez de Lorez Arnaiz, Gomez CJ. (1961). On the isolation of nerve endings and synaptic vesicles. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 229-235.
- Denbow DM, Cherry JA, Siegel PB, Van Krey HP. (1981). Eating, drinking and temperature response of chicks to brain catecholamine injections. *Physiol Behav* 27, 265-269.
- de Vaus, JE, Gibbs ME, Ng KT, (1980). Effects of social isolation on memory formation. *Behav. Neural Biol.* 29, 473–480.
- Dickson BJ. (2003) Development. Wiring the brain with insulin. *Science* 300, 440-441.

- Diez-Alarcia R, Mostany R, Dos-Anjos S, Fernandez-Lopez A. (2009). Functional autoradiography and gene expression analysis applied to the characterization of the alpha2-adrenergic system in the chicken brain. *J Chem Neuroanat* 38, 282-291.
- Ehlers CL, Henriksen SJ, Wang M, Rivier J, Vale W, Bloom FE. (1983). Corticotrofin releasing factor produces increases in brain excitability and convulsive seizures. *Brain Res* 278, 332-336.
- Ernst M, Bruckner S, Borech S, Sieghart W. (2005). Comparative models of GABA(A) receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. *Mol Pharmacol* 68, 1291–1300.
- Faure JM, Jones RB, Bessei W. (1983) Fear and social motivation as factor in open field behavior the domestic chick. A theoretical consideration. *Biol. Behav.* 8, 103-116.
- Farrant M, Nusser Z. (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6, 215-229.
- Farrar SJ, Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM.(1999) Stoichiometry of a ligand-gated ion channel determined by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem* 274, 10100–10104.
- Fernandez- López, A. Chinchetru, M.A, Calvo P. (1997). The autoradiographic perspective of central benzodiazepine receptors; a short review. *Gen Pharm.* 29, 173-180.
- Filippova, N, Sedelnikova, A, Zong, Y, Fortinberry, H, & Weiss, D. S. (2000). Regulation of recombinant gamma-aminobutyric acid GABA(A) and GABA(C) receptors by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 57, 847– 856.
- FiNewman KeulsCC & Meyer T (2002). Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 12, 293–299.
- Freude S, Plum L, Schnitker J, Leeser U, Udelhoven M, Krone W, Bruning JC, Schubert M.(2005) Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes* 54, 3343-3348.

- Fisher JL, Macdonald RL. (1997). Functional properties of recombinant GABA(A) receptors composed of single or multiple beta subunit subtypes. *Neuropharm.* 36, 1601–1610.
- Fritschy JM, Benke D, Mertens S, Mohler H. (1992). Five subtypes of type A gamma-aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 89, 6725-6730.
- Fritschy JM, Mohler H. (1995). GABA(A)-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J. Comp. Neurol.* 359, 154–194.
- Fujii M, Kanematsu T, Ishibashi H, Fukami K, Takenawa T, Nakayama KI, Moss SJ, Nabekura J, Hirata M. (2010) Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem.* 285, 4837-4846.
- Gallup GG, Suarez SD. (1980). An ethological analysis of open-field behaviour in chickens. *Anim. Behav.* 28, 368–378.
- Galvez R, Mesches MH, McGaugh JL. (1996) Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiol. Learn. Memb.* 66, 253–257.
- Ganong W, Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks P. (2010) Fisiología Médica. 23^a Edición. Editorial Mc Graw-Hill.
- Gerozissis K. (2003). Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol.* 23, 873-874.
- Gibbs ME, De Vaus J, Ng KT. (1986). Effect of stress-related hormones on short term memory. *Behav. Brain Res.* 19, 1–6.
- Gibbs ME, Summers RJ. (2000). Separate roles for beta2- and beta3-adrenoceptors in memory consolidation. *Neuroscience* 95, 913–922.
- Gibbs ME, Summers RJ. (2002). Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Prog Neurobiol.* 67, 345-91.

- Gibbs ME, Summers RJ. (2003) α 2- adrenoceptors in the basal ganglia have a role in memory consolidation and reinforcement. *Neuropharmacol.* 45, 355-367.
- Gibbs ME, Hutchinson DS, Summers RJ. (2010). Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; roles for α - and β -adrenergic receptors. *Neuroscience* 170, 1209-1222.
- Gray JA. The psychology of Fear and Stress, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge (1987).
- Gold PE, van Buskirk R. (1978). Posttraining brain norepinephrine concentrations: correlation with retention performance of avoidance training and with peripheral epinephrine modulation of memory processing. *Behav. Biol.* 23, 509–520.
- Gold PW, Drevets WC, Charney DS. (2002) New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biol Psychiatry* 52, 381–385.
- Goldstein DS. (2001). The autonomic nervous system in health and disease. Marcel Dekker Inc, New York.
- Goldstein DS. (2010). Adrenal responses to stress. *Cell Mol Neurobiol* 30, 1433-1440.
- Gunn B.G, Brown A.R, Lambert J.J, Belelli D. (2011). Neurosteroids and GABA(A) Receptor Interactions: A Focus on Stress. *Front.Neurosci.* 5, 131.
- Han SK, Chong W, Li LH, Lee IS, Murase K, Ryu PD (2002). Noradrenaline excites and inhibited GABAergic transmission in parvocellular neurons of rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurophysiol.* 87, 2287-2296.
- Harris RA, Allan AM. (1985) Functional coupling of gamma-aminobutyric acid receptors to chloride channels in brain membranes. *Science* 228, 1108-1110.
- Harro J, Oreland L, Vasar E, Bradwejn J. (1995) Impaired exploratory behaviour after DSP-4 treatment in rats: implications for the increased anxiety after noradrenergic denervation. *Eur Psychopharmacol* 5, 447-455.

- Haas KF, Macdonald RL. (1999). GABA(A) receptor subunit gamma2 and delta subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABA(A) receptor currents in mouse fibroblasts. *J Physiol* 514, 27–45.
- Hatfield T, McGaugh JL, (1999) Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol. Learn. Memb.* 71, 232–239.
- Herman JP, Mueller NE, Newman KE, Ulfhake H, Figueiredo, H. (2004). Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 1018, 35–45.
- Herring D, Huang R, Singh M, Robinson LC, Dillon GH, Leidenheimer NJ. (2003). Constitutive GABA_A receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor. *J Biol Chem* 278, 24046–24052.
- Herd MB, Haythornthwaite AR, Rosahl TW, Wafford KA, Homanics GE, Lambert JJ & Belelli D (2008). The expression of GABA(A) beta subunit isoforms in synaptic and extrasynaptic receptor populations of mouse dentate gyrus granule cells. *J Physiol* 586, 989–1004.
- Hirose, S, Mohney, RP, Okada, M, Kaneko, S, Mitsudone A. (2003). The genetics of febrile seizures and related epilepsy syndromes. *Brain Dev* 25, 304-312.
- Houston CM, Smart TG. (2006). CaMK-II modulation of GABA(A) receptors expressed in HEK293, NG108-15 and rat cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci* 24, 2504–2514.
- Houston CM, He Q, Smart TG. (2009). CaMKII phosphorylation of the GABA(A) receptor: receptor subtype- and synapse-specific modulation. *J Physiol* 587, 2115–2125.
- Hudmon A & Schulman H (2002). Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 71, 473–510.

- Hunter RG, McCarthy KJ, Milne TA, Pfaff DW, McEwen BS.(2009) Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 20912–20917.
- Ives JH, Drewery DL, Thompson CL. (2002). Differential cell surface expression of GABA(A) receptor alpha1, alpha6, beta2 and beta3 subunits in cultured mouse cerebellar granule cells influence of cAMP-activated signaling. *J Neurochem* 80, 317-327.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*. 9, 331–343.
- Jiang M, Griff ER, Ennis M, Zimer LA, Shipley MT (1996). Activation of locus coeruleus enhances the responses of olfactory bulb mitral cells to weak olfactory nerve input. *J Nuerosci*. 16, 6319-6329.
- Johnston GAR (1996). GABAA receptor pharmacology. *Pharmacology Ther* 69, 173–198.
- Jurd R, Tretter V, Walker J, Brandon NJ, Moss SJ. (2010). Fyn kinase contributes to tyrosine phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma2 subunit. *Mol Cell Neurosci* 44, 129–134
- Kaila K. (1994). Ionic basis of GABA(A) receptor channel function in the nervous system. *Prog in Neurobiol* 42, 489-537.
- Kempermann G, Gage FH. (1999) New nerve cells for the adult brain. *Sci Am*. 280, 48–53.
- Kety S. (1972) The possible role of the adrenergic systems of the cortex in learning. *Research in Nervous and Mental Diseases, USA*, pp. 376–389.
- Kittler JT, McAinsh K, Moss SJ. (2002) Mechanisms of GABA(A) receptor assembly and trafficking: implications for the modulation of inhibitory neurotransmission. *Mol Neurobiol* 26, 251–268.
- Kittler JT, Moss SJ. (2003). Modulation of GABA(A) receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Current Opin Neurobiol*. 13, 341-347.

- Kittler JT, Chen G, Honing S, Bogdanov Y, McAinsh K, Arancibia-Carcamo IL, Jovanovic JN, Pangalos MN, Haucke V, Yan Z, Moss SJ. (2005). Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABA(A) receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102,14871–14876.
- Kneussel M. (2002). Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites. *Brain Res Rev* 39, 74-83.
- Kopf SR, Baratti CM (1999). Effects of posttraining administration of insulin on retention of a habituation response in mice: participation of a central cholinergic mechanism. *Neurobiol Learn Mem.* 71, 50-61.
- Korpi ER, Grunder G, Luddens H. (2002). Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol* 67, 113-159.
- Kremerskothen J, Wendholt D, Teber I, Barnekow A. (2002) Insulin-induced expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC) in human neuroblastoma cells requires p21(ras), mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase and src tyrosine kinases but is protein kinase C-independent. *Neurosci Lett.* 321, 153-156.
- Kuenzel WJ, Masson M. (1988) A Steriotaxic Atlas of the Brain of the Chick. University of Maryland.
- Lähdesmäki J, Sallinen J, MacDonald E, Kobilka BK, Fagerholm V, Scheinin M. (2002) Behavioral and neurochemical characterization of alpha(2A)-adrenergic receptor knockout mice. *Neurosci* 113, 289-299.
- Lazarus RS, Folkman S. (1984). Stress, appraisal and coping. New York: Springer Publishing Company.
- Leil TA, Chen ZW, Chang CS, Olsen RW. (2004). GABA(A) receptor-associated protein traffics GABA_A receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* 24, 11429–11438.
- Leininger GM, Backus C, Uhler MD, Lentz y Feldman EL. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like growth factor-

- I neuroprotection in dorsal root ganglia neurons. *FASEB Journal*, vol. 18, no. 13, 1544–1546, 2004.
- Liang KC, McGaugh JL, Yao HY. (1990) Involvement of amygdala pathways in the influence of post-training intra-amygdala norepinephrine and peripheral epinephrine on memory storage. *Brain Res.* 508, 225–233.
 - Liang KC, Chen LL, Huang TE. (1995) The role of amygdala norepinephrine in memory formation: involvement in the memory enhancing effect of peripheral epinephrine. *Chin. J. Physiol.* 38, 81–91.
 - Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüllicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. (2000). Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* 290, 131-4.
 - Lowry OH, Rosenbrough MR, Farr AC, Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
 - Lüscher B, Keller CA. (2004). Regulation of GABA(A) receptor trafficking, channel activity, and functional plasticity of inhibitory synapses. *Pharmacol Ther* 102, 195-221.
 - Lydiard RB. (2003). The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* 64, 21-27.
 - MacDonald RL, Rogers CJ, Twyman RE. (1989) Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABA (A) receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol*, 417, 483-500.
 - Macdonald RL, Olsen RW. (1994) GABA(A) receptor channels. *Annu Rev Neurosci.* 17, 569-602.
 - Maguire J, Mody I. (2007) Neurosteroid synthesis-mediated regulation of GABA(A) receptors: relevance to the ovarian cycle and stress. *J. Neurosci.* 27, 2155–2162.
 - Maguire J, Mody I. (2009). Steroid hormone fluctuations and GABA (A)-R plasticity. *Psycho- neuroendocrinology* 29, 9592–9601.

- Makkar SR, Zhang SQ, Cranney J. (2010). Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. *Neuropsychopharm* 35, 1625-1652.
- Makino S, Gold PW, Schulkin J. (1994) Effects of corticosterone on CRH mRNA and content in the bed nucleus of the stria terminalis; comparison with the effects in the central nucleus of the amygdala and the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 675, 141–149.
- Marín RH, Martijena ID, Arce A. (1997) Effect of diazepam and A beta-carboline on open-field and T-maze behaviors in 2-day-old chicks. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997 Dec; 58, 915-21.
- Marsden KC, Beattie JB, Friedenthal J, Carroll RC. (2007) NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA (A) receptors. *J Neurosci* 27, 14326–14337.
- Martijena ID, Arce A. (1986). Passive avoidance learning leads to transitory increase in benzodiazepine receptor in chick forebrain. *Comun Biol* 5, 1- 6.
- Martijena ID, Salvatierra NA, Arce A. (1992). Benzodiazepine receptor recruitment after acute stress in synaptosomal membranes from forebrain of young chicks: action of triton X-100. *J Neural Transm* 87, 97-104.
- Martijena ID, Arce A. (1994). Transient benzodiazepine-GABA (A) receptor increase after passive avoidance learning in synaptosomal membranes from chick forebrain . *Can J Physiol Pharmacol* 72, 233-237.
- Mao X, Guo F, Yu J, Min D, Wang Z, Xie N, Chen T, Shaw C, Cai J. (2010). Up-regulation of GABA transporters and GABA (A) receptor α 1 subunit in tremor rat hippocampus. *Neurosc. Let.* 17; 486, 150-5.
- McDonald BJ, Amato A, Connolly CN, Benke D, Moss SJ, Smart TG. (1998) Adjacent phosphorylation sites on GABA_A receptor beta subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nat Neurosci* 1, 23–28.

- McDonald BJ, Moss SJ (1997). Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA (A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca²⁺ + /calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacol* 36, 1377–1385.
- McEwen BS, Albeck D, Cameron H, Chao HM, Gould E, Hastings N, Kuroda Y, Luine V, Magariños AM, McKittrick CR. (1995) Stress and the brain: a paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam Horm.* 51, 371-402.
- Mc Ewen BS. (1998). Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *Ann N Y Acad Sci* 840, 33-44.
- McEwen BS. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22, 105–122.
- McEwen BS. (2006) Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: Allostasis and allostatic load. *Metabolism* 55, 20–23.
- McEwen BS (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev* 87, 873–904.
- Mc Ewen BS. (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol.* 583, 174–185.
- McEwen BS. (2010). Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 1204, 38–59.
- McGaugh JL, McIntyre CK, Power AE. (2002) Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem.* 78, 539-552.
- McGaugh JL (2004). The amígdala modulates the consolidation memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27, 1–28.
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ. (2000) Sedative but not anxiolytic properties of

- benzodiazepines are mediated by the GABA (A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci.* 3, 587-92.
- Mehta AK, Ticku KM. (1999). An update on GABA (A) receptors. *Brain Research Rev* 29, 196-217.
 - Mielke JG, Wang YT. (2005). Insulin exerts neuroprotection by counteracting the decrease in cell-surface GABA receptors following oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 92, 103-113.
 - Miguez I, Aldegunde MA. (1990). Effect of gamma-aminobutyric acid on corticosterone secretion: involvement of the noradrenergic system. *Life Sci.* 46:875-80.
 - Millan MJ. (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 70, 83-244.
 - Min Sy, Jeong JH, Choi YM, Lee BC, Huh IH, Lee HI, Sohn UD.(2001) The influences of extremely low frequency magnetic fields on clonidine-induced sleep in 2-day-old chicks. *J Auton Pharmacol* 21, 197-203.
 - Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. (2005) Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proc Nat Acad Sci USA.* 102, 9371–9376.
 - Mody I, Pearce RA. (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci.* 27, 569-75.
 - Mody I, Maguire J. (2012) The reciprocal regulation of stress hormones and GABA(A) receptors. *Front Cell Neurosci.* 6, 4.
 - Mohler H. (2006). GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* 326, 505-516.
 - Moriarty DD. (1995) Anxiogenic effects of a beta-carboline on tonic immobility and open field behavior in chickens (*Gallus gallus*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51, 795-798.

- Morilak DA, Fornal CA, Jacobs BL. (1987a) Effects of physiological manipulations on locus coeruleus neuronal activity in freely moving cats. II. Cardiovascular challenge. *Brain Res* 422, 24-31
- Morilak DA, Fornal CA, Jacobs BL. (1987b) Effects of physiological manipulations on locus coeruleus neuronal activity in freely moving cats. III. Glucoregulatory challenge. *Brain Res* 422, 32-39.
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO. (2005) Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 1214-24.
- Mormède P, Courvoisier H, Ramos A, Marissal-Arvy N, Ousova O, Desautes E, Duclos M, Chauloff F, Moisan MP (2000). Molecular genetic approaches to investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroend* 27, 563-583.
- Moosavi M. (2007) Insulin protects against stress-induced impairments in water maze performance. *Behav Brain Res.* 176, 230-6
- Motohashi N, Okamoto Y, Osada M, Yamawaki S. (1993) Acute swim stress increases benzodiazepine receptors, but not GABAA or GABAB receptors, in the rat cerebral cortex. *Neurochem Int.* 23, 327–330.
- Moss SJ, Gorrie GH, Amato A, Smart TG. (1995) Modulation of GABAA receptors by tyrosine phosphorylation. *Nature* 377, 344–348.
- Moss SJ y Smart TG (1996). Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol* 39, 1–52.
- Nai Q, Dong HW, Hayar A, Linster C, Ennis M (2009). Noradrenergic regulation of GABAergic inhibition of main olfactory bulb mitral cells varies as a function of concentration and receptor subtype. *J Neurophysiol* 101, 2472-2484.
- Nusser Z, Hájos N, Somogyi P, Mody I. (1998) Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395, 172-177.

- Nusser Z, Sieghart W, Mody I. (1999) Differential regulation of synaptic GABA_A receptors by cAMP-dependent protein kinase in mouse cerebellar and olfactory bulb neurones. *J Physiol.* 521, 421-35.
- Nicholls DG. (1989). Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem* 52, 331-341.
- Olga G. y Terry L. (1997). Superar el estrés. Madrid: Ediciones Pirámide.
- Olsen RW, Hancher HJ, Meera P, Wallner M. (2007). GABA_A receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol* 41, 201-209.
- Olsen RW, Sieghart W. (2008). International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60, 243-260.
- Olsen R.W, Sieghart W. (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacol Rev* 56, 141-148.
- Owens DF y Kriegstein AR. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3, 715-727.
- Page ME, Akaoke H, Aston-Jones G, Valentino RJ. (1992) Bladder distention activates noradrenergic locus coeruleus neurons by an excitatory amino acid mechanism. *Neuroscience.* 51, 555-563.
- Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS. (1995). Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front. Neuroendocrinol.* 16, 89–150.
- Park CH, Hitri A, Lukacs LG, Deutsch SI. (1993) Swim stress selectively alters the specific binding of a benzodiazepine antagonist in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 299–304.
- Park JB, Skalska S, Son S, Stern, JE. (2007) Dual GABA(A) receptor-mediated inhibition in rat presympathetic paraventricular nucleus neurons. *J. Physiol.* 582, 539–551.

- Perfilova VN, Tiurenkov IN. (2011) GABA(C) receptors: structure and functions *Eksp Klin Farmakol.*74, 45-9.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience vol* 101, 815-850.
- Plotsky PM, Cunningham ET, Widmaier EP. (1989). Catecholaminergic modulation of corticotrophin- realizing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocrine Rev.* 10, 437-458.
- Primus RJ, Kellog CK. (1991). Experience influences environmental modulation of function at the benzodiazepine (BZD)/GABA receptor chloride channel complex. *Brain Res* 545, 257-264.
- Raiteri M, Maura G, Versace P. (1983). Functional evidence for two stereochemically different alpha-2 adrenoceptors regulating central norepinephrine and serotonin release. *J Pharmacol Exp Ther.*224, 679–684.
- Rago L, Kiiwet RA, Harro J, Pold M. (1989). Central- and peripheral-type benzodiazepine receptors: similar regulation by stress and GABA receptor agonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 879–883.
- Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN. (1986) Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci.* 6, 1211-9.
- Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M, Ball GF, Durand S, Gütürkün O, Lee DW, Mello CV, Powers A, White SA, Hough G, Kubikova L, Smulders TV, Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang C, Jarvis ED.(2004) The Avian Brain Nomenclature Forum: Terminology for a New Century in Comparative Neuroanatomy. *J Comp Neurol.* 473, E1-E6.
- Rizk NN, Rafols JA, Dunbar JC. (2006) Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide. *Brain Res* 1096, 204-12.

- Rostamkhani F, Zardooz H, Zahediasl S, Farrokhi B. J Zhejiang (2012) Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats. *Univ Sci B*. 13, 904-12.
- Roozendaal B, Okuda S, de Quervain DJ, McGaugh J (2006). Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience* 138, 901–910.
- Roozendaal B, Schelling G, McGaugh J (2008). Corticotropin-releasing factor in the basolateral amygdala enhances memory consolidation via an interaction with the beta-adrenoceptor-cAMP pathway: dependence on glucocorticoid receptor activation. *J Neurosci* 28, 6642–6651.
- Rodriguez-Romaguera J, Sotres-Bayon F, Mueller D. (2009) Systemic propranolol acts centrally to reduce conditioned fear in rats without impairing extinction. *Biol Psychiatry* 65, 887-892.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid (A) receptor subtypes. *Nature* 401, 796–800.
- Rudolph U, Mohler H. (2004) Analysis of GABA(A) receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 475–498.
- Sabato UC, Aguilar JS, Medina JH, De Robertis E. (1981) Changes in rat hippocampal benzodiazepine receptors and lack of changes in muscarinic receptors after fimbria-fornix lesions. *Neurosci Lett*. 27, 193-197.
- Salvatierra NA, Torre RB, Arce A. (1997) Learning and novelty induced increase of central benzodiazepine receptors from chick forebrain, in a food discrimination task. *Brain Res*. 16, 757, 79-84.
- Salvatierra NA, Marín RH, Arce A, Martijena ID. (1994). Chick imprinting performance and susceptibility to acute stress associated to flunitrazepam receptor increase. *Brain Res* 648, 39- 45.

- Salvatierra NA, Arce A. (2001). Day-old chicks categorised on latency to peck, exhibit a stable fear pattern until 15 days of age. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 73,103-116.
- Salvatierra NA, Cid MP, Arce A. (2009) Neonatal acute stress by novelty in the absence of social isolation decreases fearfulness in young chicks. *Stress* 12, 328-335.
- Sandi C, Rose SP. (1994) Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *Eur J Neurosci.* 1; 6, 1292-1297.
- Santos MS, Pereira EM, Carvalho AP. (1999). Stimulation of immunoreactive insulin release by glucose in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 24, 33-36.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Rev* 21, 55–89.
- Saxena NC, Macdonald RL. (1994) Assembly of GABA(A) receptor subunits: role of the delta subunit. *J Neurosci.* 14, 7077-7086.
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, Seeburg PH, Barnard EA. (1987). Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328, 221-227.
- SchweNewman KeulsJ, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, Tarusawa E, Kulik A, Unger A, Ivankova K, Seddik R, Tiao JY, Rajalu M, Trojanova J, Rohde V, Gassmann M, Schulte U, Fakler B, Bettler B.(2010) Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 465, 231-235.
- Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB. (2000). Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev.* 8, 855-872.
- Selye H. (1956). The stress of life. New York, Ed. McGraw Hill.

- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 21, 7153–7160.
- Serwanski DR, Miralles CP, Christie SB, Mehta AK, Li X, De Blas AL. (2006). Synaptic and nonsynaptic localization of GABAA receptors containing the alpha5 subunit in the rat brain. *J Comp Neurol* 499, 458–470.
- Shin SY, Yang JH, Lee H, Erdélyi F, Szabó G, Lee SY, Ryu PD. (2007) Identification of the adrenoceptor subtypes expressed on GABAergic neurons in the anterior hypothalamic area and rostral zona incerta of GAD65-eGFP transgenic mice. *Neurosci Lett.* 422, 153-157.
- Sieghart W (1995). Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 47,181-234.
- Sieghart W, Sperk G (2002). Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem.*2, 795-816.
- Sieghart W. (2006) Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Adv Pharmacol* 54, 231–263.
- Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard E.A, (2004). Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem.* 279, 41422–41435.
- Simson PE, Weiss J. (1988) Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. *Neuropsychopharmacol.* 1, 287–295.
- Skilbeck JK, Johnston AR, Hinton T. (2010). Stress and GABA receptors. *J. Neurochem.* 112, 1115–1130.
- Soderling TR, Chang B & Brickey D (2002). Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 276, 3719–3722.
- Soubrie P, Thiebot M. H, Jobert A, Montastruc J. L, Hery F. y Hamon M. (1980) Decreased convulsant potency of picrotoxin and pentetrazol and enhanced

- [3H]flunitrazepam cortical binding following stressful manipulations in rats. *Brain Res.* 189, 505–517.
- Steinbach, J.H. and Akk, G. (2001) Modulation of GABA(A) receptor channel gating by pentobarbital. *J Physiol.* 537, 715-33.
 - Sterling, P. & Eyer, J. (1988). In J. Fisher & J. Reason (Eds.), *Handbook of life stress, cognition and health* (pp. 629-649). London: John Wiley and Sons.
 - Stone E, Yan Lin, Sarfraz Y, Quartermain D, (2011) The role of the central noradrenergic system in behavioral inhibition. *Brain Res Rev.* 67, 193–208.
 - Stràc DSD, Muck-Sèler D, Pivac N. (2012) The involvement of noradrenergic mechanisms in the suppressive effects of diazepam on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in female rats. *Croat Med J.* 53, 214-223.
 - Sur C, Wafford KA, Reynolds DS, Hadingham KL, Bromidge F, Macaulay A, Collinson N, O'Meara G, Howell O, Newman R, Myers J, Atack JR, Dawson GR, McKernan RM, Whiting PJ, Rosahl TW. (2001) Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J Neurosci.* 15, 3409-3418.
 - Sugimoto K, Baba M, Suda T, Yasujima M, and S.Yagihashi (2003). Peripheral neuropathy and microangiopathy in rats with insulinoma: association with chronic hyperinsulinemia. *Diabetes Metab Res Rev*, vol. 19, no. 5, 392–400.
 - Sullivan G.M, Coplan J.D, Kent J.M, Gorman J.M. (1999). The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry* 46, 1205–1218.
 - Svensson TH. (1987) Peripheral, autonomic regulation of locus coeruleus noradrenergic neurons in brain: putative implications for psychiatry and psychopharmacology. *Psychopharmacol* 92, 1-7.
 - Tachibana T, Cline MA, Sugahara K, Ueda H, Hiramatsu K. (2009) Central administration of somatostatin stimulates feeding behavior in chicks. *Gen Comp Endocrinol.* 161, 354-9.

- Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H. (2000). Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol* 405, 397-406.
- Thayer JF, Lane RD. (2000) A model of neurovisceral integration in emotion regulation and dysregulation. *J Affect Disord* 61, 201–216.
- Terunuma M, Jang IS, Ha SH, Kittler JT, Kanematsu T, Jovanovic JN, Nakayama KI, Akaike N, Ryu SH, Moss SJ, Hirata M. (2004). GABA(A) receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein. *J Neurosci* 24, 7074–7084.
- Tretter V, Moss SJ. (2008) GABA(A) Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci* 1, 7.
- Tretter V, Jacob TC, Mukherjee J, Fritschy JM, Pangalos MN, Moss SJ. (2008) The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* 28, 1356–1365.
- Tully K, Bolshakov BD. (2010). Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. *Molec Brain* 3, 15.
- Uji A, Matsuda M, Kukita T, Maeda K, Kanematsu T, Hirata M. (2002) Molecules interacting with PRIP-2, a novel Ins(1,4,5)P3 binding protein type 2: Comparison with PRIP-1. *Life Sci* 72, 443–453.
- Valentino RJ, Foote SL, Page ME (1993) The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann N Y Acad Sci.* 697, 173– 188.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci.* 2, 266–70.

- Veenman C.L, Albin, R.L, Ritchfield E.K, Reiner A. (1994). Distributions of GABAA, GABAB, and benzodiazepine receptors in the forebrain and midbrain of pigeons. *J Comp Neurol*. Vol 344, 161-189.
- Vetiska SM, Ahmadian G, Ju W, Liu L, Wymann MP, Wang YT. (2007) GABAA receptor-associated phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced recruitment of postsynaptic GABA(A) receptors. *Neuropharmacol* 52, 146-155.
- Verkuyl JM, Hemby SE y Joels, M. (2004). Chronic stress attenuates GABAergic inhibition and alters gene expression of parvocellular neurons in rat hypothalamus. *Eur J Neurosci* 20, 1665–1673.
- Vithlani M, Terunuma M, and Moss S.J. (2011) The dynamic modulation of GABA(A) receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol Rev* 91, 1009–1022.
- Vyas A, Mitra R, Rao BSS, Chattarji S. (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22, 6810–6818.
- Wan G, Xiong ZG, Man HY, Ackerley CA, Brauton J, Becker LE, McDonald JF, Wang YT. (1997). Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* 388, 686-690.
- Wang, Q, Somwar, R, Bilan, P. J, Liu, Z, Jin, J, Woodgett, J. R, and Klip, A. (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4008–4018.
- Wang Q, Liu L, Pei L, JuW, Ahmadian G, Lu, J, Wang, Y, Liu, F.yWang, Y. T. (2003) Control of synaptic strength, a novel function of Akt. *Neuron*. 38, 915–928.
- Whatley VJ, Harris RA. (1996). The cytoskeleton and neurotransmitter receptors. *Int Rev Neurobiol* 39, 113-143.
- Waterhouse BD, Azizi SA, Burne RA, Woddward DJ (1990). Modulation of rat cortical area 17 neuronal responses to moving visual stimuli during norepinephrine and serotonin microiontophoresis. *Brain Res*. 514, 276-292.

- Weiss JM, Simson PG, Hoffman LJ, Ambrose MJ, Cooper S, Webster A. (1986) Infusion of adrenergic receptor agonists and antagonists into the locus coeruleus and ventricular system of the brain. Effects on swim-motivated and spontaneous motor activity. *Neuropharmacol* 25, 367–384.
- Weinberger J, Cohen G. (1982). The differential effect of ischemia on the active uptake of dopamine, gamma-aminobutyric acid, and glutamate by brain synaptosomes. *J Neurochem* 38, 963-968.
- Whiting PJ, Wafford KA, McKernan RM. (2000). In: Martin, D.L, Olsen, R.W. GABA in the Nervous System: the View at Fifty Years. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 113–126.
- Williams DB (2008) A novel, rapid, inhibitory effect of insulin on alpha1beta2gamma2 gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Neurosci Letters* 443, 27–31.
- Wodward DJ, Moises HC, Waterhouse BD, Yeh HH, Cheun JE (1991). Modulatory actions of norepinephrine on neural circuits. *Adv Exp Med Biol.* 287, 193-208.
- Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, Liu S, Wendt A, Deng S, Ebina Y, Wheeler M. B, Braun M, y Wang, Q. (2006) Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABA(A) receptor system. *Cell Metab.* 3, 47–58.
- Yan Z, Surmeier DJ. (1997). D5 dopamine receptors enhance Zn²⁺-sensitive GABA(A) currents in striatal cholinergic interneurons through a PKA/PP1 cascade. *Neuron* 19, 1115–1126.
- Yamada M, Kakita A, Mizuguchi M, Rhee SG, Kim SU, Ikuta F.(1993) Developmental profile of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in rat cerebellar cortex: light and electron microscopic immunohistochemical studies. *Brain Res Dev Brain Res.* 71, 137-45.
- Yoshimura K, y col (2001). Interaction of p130 with, and consequent inhibition of, the catalytic subunit of protein phosphatase 1alpha. *J Biol Chem* 276, 17908–17913.

- Yoshiki Y, M Matsumoto, H Togashi.(2010). Enhanced dendritic cell antigen uptake via alpha2 adrenoceptor-mediated PI3K activation following brief exposure to noradrenaline. *J Immunol* 185, 5762-5768.
- Yu ZY, Wang W, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C. (2006). Changes in neocortical and hippocampal GABAA receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain Res.* 1099, 73-81.
- Zhang R, Tachibana T, Takagagi T, Furuse M. (2003). Centrally administered norepinephrine modifies the behavior induced by corticotropin-releasing factor in neonatal chicks. *J. Neurosc. Res.* 74, 630-636.
- Zhang JH, Sato M, Noguchi K, Tohyama M.(1991) The differential expression pattern of the mRNAs encoding beta subunits (beta 1, beta 2, and beta 3) of GABAA receptor in rat brain. *Adv Exp Med Biol.* 287, 381-90.
- Zhao WQ, Alkon DL. (2001) Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol.* 177, 125-34.
- Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. (2004) Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 71–81.
- Zúñiga JM, Tur-Marí J, Milocco S, Piñeror (2001). Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Madrid-España. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana.