

MÁSTER EN NEUROCIENCIAS 2014-2015

Estudio de la
organización
citoarquitectónica y
neuroquímica del Colículo
Inferior en el ratón reeler

YARA SOUTO BECERRA

Miguel A. Rodríguez Díaz, Prof. del Departamento de Biología Celular y Ecología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMA:

Que el Trabajo Fin de Máster titulado “*Estudio de la organización citoarquitectónica y neuroquímica del colículo inferior en el ratón reeler*” fue realizado bajo su dirección por Dña. Yara Souto Becerra, dentro del marco del Máster de Neurociencia.

Que el citado trabajo de investigación reúne todas las exigencias científicas y formales requeridas.

POR TANTO,

Emite la autorización preceptiva para su aceptación y posterior defensa pública.

Santiago de Compostela, 14 de Julio de 2015.



Fdo. Miguel A. Rodríguez Díaz



Fdo. Yara Souto Becerra

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
1. Citoarquitectura del colículo inferior	4
2. La Reelina	5
a. Estructura de la proteína y del gen que codifica para la reelina	5
b. Receptores y vía de transducción de señales de la reelina	6
c. Expresión de reelina en el encéfalo de roedores	7
d. Funciones de la Reelina	7
e. El ratón mutante reeler	8
3. Glutamato	10
4. Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD)	11
5. Tirosina Hidroxilasa (TH)	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
1. Ejemplares	14
2. Preparación del tejido	14
3. Técnicas inmunohistoquímicas	14
4. Interpretación de los resultados y obtención de imágenes	16
RESULTADOS	17
1. Organización citoarquitectónica del colículo inferior utilizando el marcador neuronal NeuN	17
a. Región comisural	17
b. Región medial	20
c. Región caudal	20
2. Patrón de distribución de reelina, GAD, glutamato y TH en el colículo inferior	23
a. Patrón de distribución de estructuras inmunorreactivas a Reelina	23

b. <i>Distribución de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD)</i>	25
c. <i>Distribución de glutamato</i>	25
d. <i>Distribución de tirosina hidroxilasa (TH)</i>	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	31
ABREVIATURAS	32
BIBLIOGRAFÍA	33

INTRODUCCIÓN

1. Citoarquitectura del Colículo Inferior

El colículo inferior (IC) junto con los colículos superiores forman parte de la región tectal del mesencéfalo; el IC se sitúa caudalmente con respecto a los colículos superiores, y es una estructura visible en la superficie dorsal del encéfalo que se dispone entre los hemisferios cerebrales y el cerebelo. El IC está relacionado con la integración y procesamiento de la información auditiva, constituye el principal núcleo del mesencéfalo en la ruta auditiva y recibe aferencias de diversos núcleos del tronco encefálico y córtex auditivo; además, también recibe información no-auditiva procedente del sistema somatosensorial, evidenciando su importante papel en el procesamiento multimodal de estímulos (para revisión ver: Cant and Benson, 2008; Malmierca and Ryugo, 2012; Sturm et al., 2014).

El IC se compone de un núcleo central (CIC), una corteza dorsal (DCIC), una corteza lateral (LCIC) y una corteza rostral (RCIC). La DCIC cubre el CIC en sus regiones dorsomediales, muestra una organización laminar y está constituida por cuatro capas: la capa más superficial (capa 1, también denominada capsula fibrocelular) está compuesta mayoritariamente por fibras y por algunas neuronas que se disponen dispersas; las otras tres capas muestran una mayor densidad celular y están constituidas por una mezcla de neuronas multipolares de distinto tamaño. La LCIC cubre el CIC lateralmente, también muestra una organización en capas, que son una continuación de las de la DCIC. La RCIC no muestra una organización laminar y en ella se han descrito neuronas multipolares de distintos tamaños, así como neuronas piramidales (para revisión ver: Malmierca and Ryugo, 2012).

El CIC y las capas profundas de DCIC reciben proyecciones ascendentes procedentes de diversos núcleos auditivos localizados en el tronco cerebral (núcleo coclear dorsal y ventral, núcleo del lemnisco lateral, núcleo de la oliva superior) (Cant and Benson, 2008; Sturm et al., 2014). La DCIC, LCIC y RCIC también reciben aferencias procedentes del cortex auditivo y regiones no-auditivas. Así, la LCIC y RCIC reciben aferencias somatosensoriales de la médula espinal, núcleo de la columna dorsal y del núcleo trigeminal espinal (para revisión ver: Yoshihara et al., 2010; Malmierca and Ryugo, 2012; Sturm et al., 2014). Por otra parte, las

neuronas del CIC proyectan a la división ventral del cuerpo geniculado medial (para revisión ver: Lee and Sherman, 2010; Malmierca and Ryugo, 2012).

El colículo inferior también posee interconexiones locales y comisurales; los colículos de ambos lados están interconectados por las fibras comisurales (para revisión ver: Cant and Benson, 2008; Malmierca et al., 2009; Malmierca and Ryugo, 2012). Estudios previos han propuesto dos modelos diferentes para explicar las conexiones entre los IC de los dos hemisferios cerebrales: (1) conexiones punto-a-punto, en las que determinados puntos de la lámina del IC se encuentran conectados con los puntos equivalentes del IC contralateral, (2) conexiones divergentes en las que un punto de la lámina del IC se encuentra conectado con una amplia región del IC contralateral. Los estudios llevados a cabo por Malmierca et al. (2009) han demostrado que ambos modelos coexisten en el IC de rata.

2. La reelina

a. Estructura de la proteína y del gen que codifica para la reelina.

La reelina es una glicoproteína de matriz extracelular, y su gen se localiza en el cromosoma 4 en ratón, cromosoma 5 en rata y cromosoma 7 en humanos; las proteínas en ratón y humanos son similares en tamaño, y su secuencia de aminoácidos muestra una homología superior al 94%. La transcripción del gen genera un ARNm de 12kb, constituido por 65 exones dispersos en una amplia región de 450kb que se traduce generando una proteína de 3461 aminoácidos (385kDa) (D’Arcangelo, 2006; Teixeira et al., 2011).

La reelina es secretada como un único fragmento, pero una vez en la matriz extracelular, puede sufrir un proceso de proteólisis dando lugar a tres grandes fragmentos (**Figura 1**): (1) el extremo N-terminal (180kDa) que contiene un péptido señal de rotura y una pequeña región similar a la F-spondina que le confiere a la proteína su máxima actividad biológica; (2) el extremo C-terminal (100kDa) constituido por residuos aminoacídicos cargados positivamente que permiten su secreción extracelular; (3) y un fragmento central de 120kDa formado por 8 repeticiones de entre 350 y 390 aminoácidos que contienen dos subdominios separados por 30 aminoácidos altamente conservados, suficiente para conferir actividad biológica y bioquímica (Jossin et al., 2004; D’Arcangelo, 2006). Además, también es frecuente encontrar una proteína

de tamaño intermedio (300kDa) constituida por los fragmentos N-terminal y central (D’Arcangelo, 2006).

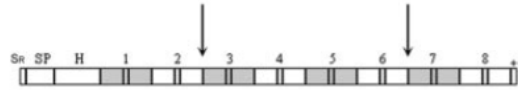


Figura 1. Estructura de la proteína Reelina. *Esquema obtenido de Jossin et al., 2004.*

b. Receptores y vía de transducción de señales de la reelina

El fragmento central de la reelina puede unirse a dos tipos de receptores lipoproteicos transmembrana: los receptores lipoproteicos de baja densidad (VLDLR) y el receptor 3 apolipoproteico E (ApoER2) (D’Arcangelo, 2006; Hack et al., 2007; Katsuyama and Terashima, 2009). La unión de la Reelina a estos receptores está mediada por cationes de calcio, resultando en la unión de la proteína adaptadora Disabled-1 (Dab1) con el dominio intracelular de los receptores (Bock et al., 2003), que va a ser fosforilado en residuos específicos de tirosina mediante la activación de kinasas (D’Arcangelo, 2006), lo cual va a provocar la activación de proteínas que se traslocarán al núcleo permitiendo la expresión de diferentes genes involucrados en procesos de plasticidad y migración neuronal (**Figura 2**) (D’Arcangelo, 2006).

Además también se sabe que la reelina se une a la integrina $\alpha 3\beta 1$, regulando de este modo las interacciones neurona-glia que permiten la correcta organización laminar (Dulabon et al., 2000).

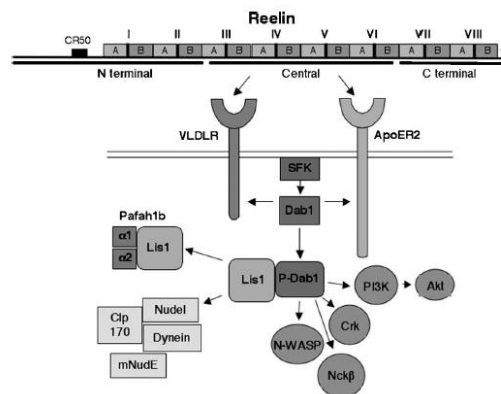


Figura 2. Diagrama de la Reelina y su ruta de señalización. La Reelina, o su región central, se une a cualquiera de los dos receptores, reclutando a proteínas de la familia SFK que van a fosforilar a Dab1, permitiendo su activación para la expresión de diferentes genes involucrados en la plasticidad neuronal y en la corticogénesis. (esquema tomado de D’Arcangelo, 2006).

c. Expresión de reelina en el encéfalo de roedores.

Mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicas se ha analizado el patrón de expresión de la reelina en ratones adultos así como durante el desarrollo; es importante mencionar que la mayor parte de los estudios han prestado una especial atención al prosencéfalo (Ikeda and Terashima, 1997; Alcántara et al., 1998).

La expresión de Reelina muestra variaciones a lo largo del desarrollo embrionario, su expresión es elevada en el bulbo olfatorio, teléncéfalo y diencéfalo desde estadios tempranos del desarrollo, y esta expresión decrece a medida que avanza el desarrollo, aunque células positivas para reelina se siguen observando en estas regiones postnatalmente; células positivas para reelina también están presentes en el mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal, aunque en menor cantidad que en las regiones rostrales del encéfalo (Kubasak et al., 2004). En ratones adultos la mayor parte de los estudios se han referido a la corteza cerebral, donde se ha descrito que la reelina está presente en diferentes subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas (Ikeda and Terashima, 1997).

Ramos-Moreno et al., (2006) utilizando técnicas inmunohistoquímicas, han mapeado la distribución de reelina en el encéfalo adulto de rata, observando que su patrón de distribución es mucho más amplio que el descrito anteriormente en ratón, detectándose un mayor número de agrupaciones celulares que expresan reelina en el mesencéfalo y rombencéfalo, donde se incluyen los núcleos relacionados con el procesamiento de la información auditiva.

d. Funciones de la reelina.

Durante el desarrollo del sistema nervioso central, la reelina es expresada por las células de Cajal-Retzius de la zona marginal del cortex y células marginales del hipocampo, jugando un papel clave en el proceso de migración neuronal y el correcto posicionamiento de las neuronas en estas áreas laminadas (Britto et al., 2014; Michetti et al., 2014). Otras investigaciones han evidenciado que la reelina también está asociada con el correcto posicionamiento de neuronas hipotalámicas (Cariboni et al., 2005), del complejo de la oliva (Ohshima et al., 2002) y células granulares y de Purkinje del cerebelo (D'Arcangelo and Curran, 1998). Estudios recientes han puesto de manifiesto el efecto diferencial de la Reelina según la localización de las neuronas sobre las que actúe, siendo este un proceso regulado por varios genes y dependiente de la expresión diferencial de sus receptores (Britto et al., 2014); además también se ha visto que bajos

niveles de expresión inducen la migración neuronal, mientras que concentraciones elevadas inducen su separación de las fibras radiales que las guían, deteniendo el proceso (D'Arcangelo, 2006). Por otra parte, durante el desarrollo, la reelina también se ha relacionado con procesos de sinaptogénesis y maduración dendrítica (D'Arcangelo, 2006; Britto et al., 2014), siendo éstos regulados por su actividad proteolítica sobre moléculas de adhesión de la matriz extracelular y/o receptores en neuronas (Quattrocchi et al., 2002).

Como mencionamos anteriormente, esta proteína continúa expresándose postnatalmente y en individuos adultos, donde se ha visto que está implicada en los procesos de migración neuronal que tienen lugar en el hipocampo y bulbo olfatorio, así como en el desarrollo de espinas dendríticas y establecimiento de nuevas sinapsis (Hack et al., 2007; Niu et al., 2008).

e. El Ratón mutante reeler

El ratón reeler es un organismo modelo que ha sido objeto de numerosas investigaciones neurobiológicas (Tissir and Goffinet, 2003); este ratón sufre una mutación autosómica recesiva y espontánea, que se describió por primera vez en el año 1948 en el Institute of Animal Genetics en Edinburgo (Escocia) (D'Arcangelo and Curran, 1998). Esta mutación se debe a una delección de 150kb de ADN genómico, correspondientes con aproximadamente 8kb de secuencia codificadora en un intrón de la región 3' del gen que codifica para la proteína reelina, de ahí la denominación ratón reeler (D'Arcangelo and Curran, 1998; Takaoka et al., 2005).

En los individuos homocigotos (-/-) la expresión de reelina es nula; éstos sufren ataxia, temblores, desequilibrio, dificultad en la locomoción y una viabilidad y fertilidad reducida (Katsuyama and Terashima, 2009); una de las alteraciones más llamativas que muestra este ratón es que el cerebelo, además de mostrar un menor tamaño, no presenta los surcos y circunvoluciones que se observan a simple vista en el ratón salvaje; a nivel histológico no se reconoce la capa de células de Purkinje, ya que éstas se localizan dispersas por la corteza cerebelar. Alteraciones en el patrón de laminación normal también se han descrito en la corteza cerebral, hipocampo y colículo superior y en otras áreas no laminadas del encéfalo y médula espinal; el núcleo coclear y el núcleo de la oliva que proyectan al colículo inferior también están desorganizados, sin embargo, no hay datos referidos al colículo inferior (para revisión ver: Takaoka et al., 2005; Baba et al., 2007; Katsuyama and Terashima, 2009; Yip et al., 2009; Michetti et al., 2014). Además, estos ratones presentan un aumento del volumen ventricular y

una reducción del volumen cerebral de alrededor del 19% en comparación con ratones de fenotipo salvaje (Katsuyama and Terashima, 2009).

Los individuos heterocigotos (+/-) presentan un descenso en el contenido de proteína y del ARNm que codifica para la reelina, de modo que tan solo el 50% del ARNm es expresado, lo cual se refleja en una disminución en el número de células que expresan reelina (Tueting et al., 1999; Liu et al., 2001). Estos ratones muestran diversas alteraciones de tipo neuroanatómico, neuroquímico y en su comportamiento. Aunque las alteraciones neuroanatómicas no son tan severas como las observadas en los homocigotos, en diversas áreas del encéfalo se ha descrito un mal posicionamiento de neuronas, lo que en algunos casos se ha correlacionado con una disminución del neuropilo y reducción del grosor de la sustancia gris (Liu et al., 2001; Nishikawa et al., 2003; Sigala et al., 2007) y también se han detectado alteraciones en el desarrollo de las dendritas (Tueting et al., 1999; Liu et al., 2001; Niu et al., 2004; Yabut et al., 2006; D'Arcangelo, 2006; Michetti et al., 2014). Por otra parte, disfunciones en los sistemas de neurotransmisión GABAérgico, glutamatergico (Liu et al., 2001; Isosaka et al., 2006) y catecolaminérgico (Ballmaier et al., 2002; Nullmeier et al., 2014) también han sido detectados. Además, estos ratones presentan déficits cognitivos en el condicionamiento operante y en funciones ejecutivas (Michetti et al., 2014) junto con una respuesta auditiva del tronco cerebral anormal (Kanzaki et al., 1985) y un patrón de inhibición prepulso de sobresalto (PPI) frente a estímulos auditivos alterado (Tueting et al., 1999); sin embargo, los mecanismos moleculares y sistemas de neurotransmisores asociados con estas alteraciones no se conocen en profundidad.

El ratón heterocigoto reeler ha suscitado el interés de numerosos grupos de investigación, debido a que muchas de las alteraciones citoarquitectónicas, neuroquímicas y de conducta descritas en ellos, incluida la expresión de reelina al 50%, también se han observado en muestras postmortem de pacientes esquizofrénicos (Impagnatiello et al., 1998). Por lo tanto, es un modelo animal de gran utilidad para estudiar el papel de la reelina en distintas áreas del encéfalo y profundizar en el conocimiento de la etiología de la esquizofrenia.

3. Glutamato

El ácido L-glutámico es un aminoácido no esencial que se encuentra en gran cantidad en el SNC, donde media la mayor parte de las sinapsis excitadoras (Brumovsky et al., 2007). El glutamato es sintetizado a partir del α -cetoglutarato formado en el ciclo de Krebs mediante un proceso de transaminación por el que se transfiere un grupo amino cedido por un aminoácido donante (leucina, isoleucina, valina, aspartato, GABA o alanina) al α -cetoglutarato, bajo la acción de las aminotransferasas (Takeda et al., 2012). (**Figura 4**).

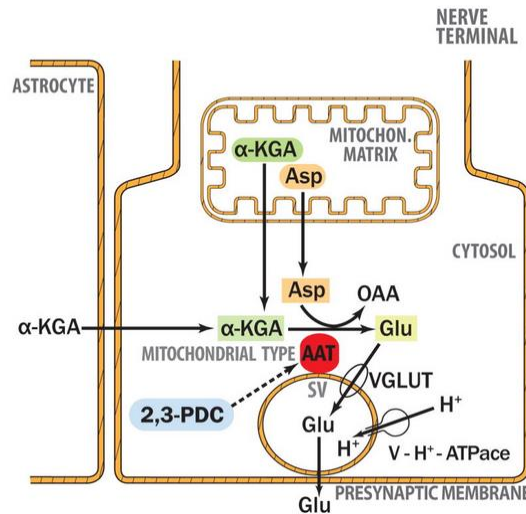


Figura 4. Esquema de síntesis del glutamato en una célula del organismo; *obtenido de Takaoka et al., 2012.*

Sin embargo, la forma más rápida de obtener glutamato es por desaminación de la glutamina gracias a la acción de la enzima mitocondrial glutaminasa activada por fosfato, exclusiva de las neuronas; la glutamina debe ser sintetizada primero a partir del glutamato, reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS), localizada en los astrocitos pero no en neuronas. Esta localización diferente de las dos enzimas da lugar al concepto del ciclo de la glutamina, que permite a las neuronas recuperar parte del glutamato liberado en la sinapsis (Kreft et al., 2012) (**Figura 5**).

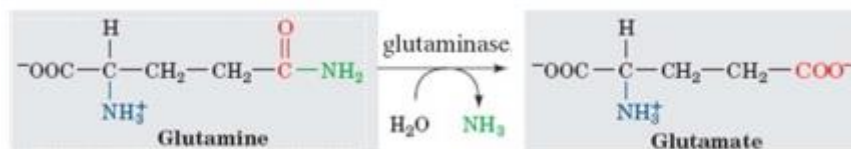


Figura 5. Obtención del glutamato a partir de la glutamina.

El glutamato formado en el citoplasma es almacenado en vesículas sinápticas mediante transporte activo, generando un gradiente de protones; este gradiente es aprovechado por el transportador vesicular de glutamato (vGLUT) para introducir glutamato en la vesícula. Hasta el momento se han descrito tres subtipos de vGLUT (Shigeri et al., 2004). El glutamato se libera por exocitosis hacia la hendidura sináptica, donde puede actuar sobre tres grupos de receptores metabotrópicos (NMDA, AMPA y kainato), y sobre tres grupos de receptores ionotrópicos (mGluR) (Gasparini and Griffiths, 2012). El glutamato liberado en la sinapsis, si se acumula en exceso es citotóxico, por lo que necesita ser retirado de la hendidura sináptica mediante transportadores de aminoácidos excitadores (Shigeri et al., 2004).

Aunque el uso de anticuerpos contra glutamato se consideró una técnica poco fiable para la identificación de neuronas glutamatérgicas, debido a que el glutamato es una molécula que se encuentra en todas las células, el estudio de las poblaciones que expresan vGLUT mediante técnicas de hibridación in situ confirmaron la abundancia de células glutamatérgicas en el encéfalo de roedores observada previamente con técnicas inmunohistoquímicas (Ito and Oliver, 2010; Ito et al., 2011).

En la actualidad también se utilizan anticuerpos contra los vGLUT, considerados verdaderos marcadores de neuronas glutamatérgicas, y aunque estos permiten el marcaje de axones son poco eficaces a la hora de marcar los somas de neuronas glutamatérgicas (Landry et al., 2004; Tood et al., 2010). Existen tres tipos de vGLUT (vGLUT1-vGLUT3) que se expresan en distintas regiones del encéfalo, de los cuales, tan solo los vGLUT1 y vGLUT2 se encuentran en el colículo inferior (Ito and Oliver, 2010; Ito et al., 2011).

4. Ácido glutámico descarboxilasa (GAD)

El GABA (ácido γ -aminobutírico) es el neurotransmisor inhibitor más abundante del sistema nervioso central de mamíferos (Trifonov et al., 2014). Es sintetizado a partir de glutamato mediante la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), que existe en dos isoformas: GAD₆₇ y GAD₆₅, con unos pesos moleculares de 67 kDa y 65 kDa, respectivamente, y que difieren en su distribución subcelular (Trifonov et al., 2014). Ambos tipos son codificados por genes diferentes, presentes en la mayoría de las neuronas que contienen GABA, pero con una

afinidad diferente por el cofactor vitamina B6, lo que sugiere que están involucradas en la síntesis de diferentes *pools* de GABA (Trifonov et al., 2014).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos contra la GAD se ha visto que alrededor del 25% de las células del colículo inferior en rata son de naturaleza GABAérgica (Mellott et al., 2014).

5. Tirosina Hidroxilasa (TH)

Las catecolaminas son un grupo de neurotransmisores que están presentes en el SNC, en el que se incluyen la dopamina, adrenalina y noradrenalina; éstas se sintetizan a partir del aminoácido tirosina mediante la acción de la tirosina hidroxilasa, que es el paso limitante en la síntesis de estos compuestos (Gittelman et al., 2013).

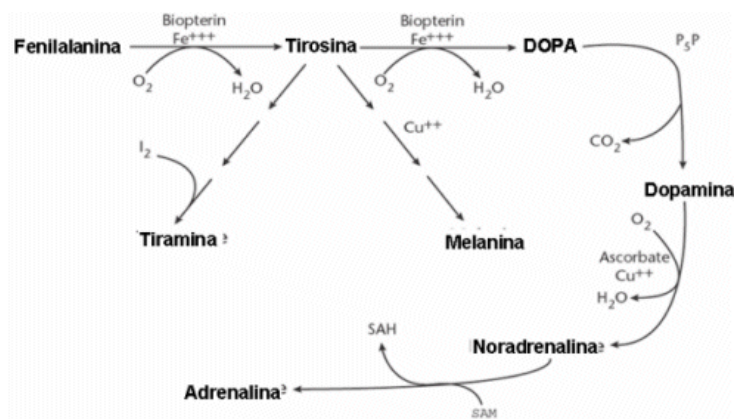


Figura 6. Esquema de la ruta de síntesis de las catecolaminas.

En el sistema auditivo, la catecolamina más abundante es la dopamina, que se encarga de modular el procesamiento de la información (Gittelman et al., 2013). Técnicas inmunohistoquímicas y técnicas de hibridación *in situ* han evidenciado una elevada densidad de receptores y terminales dopaminérgicas en el colículo inferior de roedores, en concreto, que la expresión del receptor D₂ es muy elevada (Gittelman et al., 2013). Por otra parte, la dopamina endógena del IC aumenta la respuesta frente a estímulos sonoros novedosos o relevantes, evitando la sensibilidad a otros inputs, y además puede tener tanto efectos excitatorios reduciendo los inputs provenientes de neuronas GABAérgicas, como inhibitorios reduciendo la actividad de las sinapsis glutamatérgicas (Gittelman et al., 2013).

OBJETIVOS

La reelina es una glicoproteína de matriz extracelular que se expresa en numerosas áreas del SNC en estadios embrionarios y adultos. Esta proteína está implicada en el correcto desarrollo del sistema nervioso y en procesos de plasticidad sináptica. El ratón heterocigoto reeler que expresa un 50% de la proteína reelina, muestra diversas alteraciones neuroanatómicas, neuroquímicas y de conducta que coinciden con las descritas en pacientes que sufren esquizofrenia, entre ellas anomalías en la percepción auditiva, sin embargo, los datos referidos a la expresión de reelina y a distintos sistemas de neurotransmisores en áreas del encéfalo relacionadas con el procesamiento de la información auditiva son muy escasos, lo cual, sería de gran interés para profundizar en la etiología de la esquizofrenia.

Los objetivos que nos hemos planteado en el presente trabajo son:

1. Realizar un estudio comparado de la organización citoarquitectónica del cóliculo inferior en el ratón mutante reeler (individuos salvajes y heterocigotos).
2. Analizar el patrón de distribución de reelina en el colículo inferior en el ratón mutante reeler (individuos salvajes y heterocigotos).
3. Analizar el patrón de distribución del glutamato en el colículo inferior en el ratón mutante reeler (individuos salvajes y heterocigotos).
4. Analizar el patrón de distribución del sistema GABAérgico utilizando como marcador la ácido glutámico descarboxilasa (GAD) (individuos salvajes y heterocigotos).
5. Analizar el patrón de distribución de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en el cóliculo inferior (individuos salvajes y heterocigotos).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ejemplares

En el presente trabajo hemos utilizado cerebros de ratón reeler almacenados en el laboratorio a 4°C en una solución de PB 0.1M y azida sódica al 0.01%. A continuación se muestra una tabla con toda la información correspondiente a cada uno de los ejemplares utilizado en este estudio.

EJEMPLAR	GENOTIPO	EDAD
15	++	11 meses
49	++	12 meses
55	++	16 meses
62	++	16 meses
59	+ -	17 meses
60	+ -	17 meses
845	+ -	16 meses

TABLA 1. Datos de genotipo, y edad en el momento del sacrificio de cada uno de los ejemplares utilizados en este estudio.

2. Preparación del tejido.

Antes de proceder al seccionado en un criostato, los cerebros se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% como medida de crioprotección, para preparar los bloques las muestras (región del encéfalo donde se localiza el colículo inferior) se sumergieron en medio de inclusión O.C.T. Compound (Tissue Tek), a continuación se procedió a su congelación rápida, para lo que se utilizó isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Los bloques se cortaron a una temperatura de -19°C, obteniendo secciones flotantes de 30µm de grosor; de cada ejemplar se realizaron varias series paralelas, depositando las secciones en placas de 24 pocillos con tampón Tris salino (pH=7.4) (TBS).

3. Técnicas inmunohistoquímicas

Las secciones flotantes de un individuo salvaje y heterocigoto se procesaron al mismo tiempo mediante la técnica de la Estreptavidina Peroxidasa biotilada (Método del ABC).

El protocolo que se aplicó sobre las secciones fue el siguiente:

1.- Lavamos las secciones en tampón Tris salino (pH=7.4) conteniendo Triton X-100 al 0.2% (TBST) durante 60 min.

2.- Se incuban las secciones con Avidina y Biotina para bloquear la biotina endógena (Avidin-Biotin Blocking Kit, Vector).

3.- Las secciones se incuban durante 30 min. con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% con el fin de bloquear la peroxidasa endógena.

4.- Realizamos dos lavados de 10 min. cada uno con TBST (pH 7.4).

5.- Incubamos las secciones toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti proteína neuronal nuclear (NeuN, presente en todas las neuronas, excepto en las células mitrales del bulbo olfatorio y células de Purkinje del cerebelo) (Chemicon) diluido 1:500; anticuerpo monoclonal anti reelina (Millipore) diluido 1:1000, anticuerpo policlonal contra GAD (Millipore) diluido 1:500; anticuerpo policlonal contra glutamato (Immunosolutions) diluido 1:500 y anticuerpo monoclonal contra TH (Chemicon) diluido 1:1000. Todas las diluciones de los anticuerpos se realizaron en una mezcla de suero normal de cabra (NGS) al 15%. y TBST. El tiempo de incubación para todos los anticuerpos fue de 20 horas, excepto para NeuN que fue de 72 horas.

6.- Realizamos dos lavados de 10 min. cada uno con TBST (pH 7.4).

7.- Incubamos las secciones a temperatura ambiente con inmunoglobulinas de cabra anti-ratón biotiniladas (GAMb, Dakocytomation) diluida 1:250 para NeuN, y 1:500 para Reelina y TH, así como inmunoglobulinas de cabras anti-conejo biotiniladas (GARb, Dakocytomation) diluida 1:250 para GAD y glutamato en una mezcla de NGS al 10% y TBST durante 45 min.

8.- Realizamos dos lavados de 10 min. cada uno con TBST (pH 7.4).

9.- Por último, las secciones se incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC Kit, Vector) durante 30 min. a temperatura ambiente.

10.- Realizamos dos lavados de 10 min. cada uno con TBST (pH 7.4).5 min.

11.- El revelado de la reacción se llevó a cabo utilizando una solución de 0,6 mg/ml de 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB, SIGMA, St. Louis, MO. USA) en PBS con 0.003% de H₂O₂ al 10%.

12.- Transcurrido el tiempo de revelado se realizaron tres lavados con TBST (pH 7.4).

13.- Las secciones se montaron en portaobjetos Superfrost Plus, se dejaron a temperatura ambiente, y finalmente se deshidrataron sumergiéndolas 10 min. en alcoholes con una gradación creciente, por último se aclararon en Xilol y se montaron con Eukitt (Panreac).

Para testar la especificidad de los anticuerpos utilizados se realizaron controles negativos que consistieron en la omisión del anticuerpo primario; ninguna estructura inmunorreactiva fue observada en estos controles.

4. Interpretación de los resultados y obtención de imágenes.

Para la interpretación de los resultados y la identificación de las diferentes regiones del colículo inferior hemos utilizado un atlas de coordenadas estereotáxicas del encéfalo de ratón adulto (Paxinos and Franklin, 2001). Las fotografías se realizaron en un microscopio Olympus BX-51 acoplado a una cámara digital Olympus DP-10. Los ajustes de contraste y brillo se realizaron utilizando el Corel PhotoPaint X6 y el montaje de las fotos se realizó mediante CorelDraw X6.

RESULTADOS

1.- Organización citoarquitectonica del colículo inferior utilizando el marcador neuronal NeuN.

a. Región comisural

En las porciones rostrales del colículo inferior de los individuos salvajes hemos podido diferenciar con claridad los límites entre los distintos núcleos que conforman el colículo, de tal manera que a este nivel se reconocen las siguientes regiones: región comisural (Cic), corteza dorsal del colículo (DCIC), corteza externa del colículo (ECIC) y núcleo central del colículo inferior (CIC) (**Figura 7, A**). En la DCIC hemos observado una fina capa en contacto con la superficie meníngea, en la cual se observan neuronas dispersas con una morfología fusiforme y que creemos se corresponde con la cápsula fibrocelular (C Fc) descrita por Paxinos (Malmierca and Ryugo, 2012); por debajo de ésta se aprecian 3 capas con una mayor densidad neuronal, presentando también una morfología fusiforme y, aparentemente, de mayor tamaño que las localizadas en las regiones contiguas a la meninge (**Figura 7, B**). En el ECIC se reconocen tres capas diferentes: la capa 1 (L1), que estaría formada por escasas neuronas que se disponen dispersas a lo largo de toda la capa, y que muestran una morfología y tamaño aparentemente similar a las de la cápsula fibrocelular; la capa 2 (L2), donde observamos una mayor cantidad de células que en la L1, aparentemente de distintos tamaños, con una morfología fusiforme y multipolar; y la capa 3 (L3), en la cual se aprecia una mayor densidad neuronal que en las capas L1 y L2, y donde las células presentan la misma morfología y diversidad de tamaños que en el resto de capas (**Figura 7, C**). En el núcleo central se aprecia una mayor densidad neuronal que en el resto de las áreas del colículo inferior, y también se aprecian neuronas de distintos tamaños con una morfología fusiforme (**Figura 7, D**).

En individuos reeler heterocigotos (+/-) los límites de los diferentes núcleos que conforman el colículo inferior no se pudieron establecer con claridad (**Figura 7, A'**). Así, en la región equivalente topográficamente a la DCIC, la cápsula fibrocelular mostró una aparente mayor densidad neuronal en relación con los individuos salvajes (**Figura 7, B'**). En la ECIC sólo se pudo diferenciar una capa superficial similar a L1, con baja densidad neuronal, y una región

localizada por debajo, en la cual, se observa una mayor densidad neuronal pero en donde fue imposible delimitar las capas L2 y L3 (**Figura 7, C'**). Por otra parte, resulta difícil el límite entre la capa L3 y el CIC, en el cual se observaron, al igual que en los salvajes, neuronas de distintos tamaños y con una morfología similar (**Figura 7, D'**).

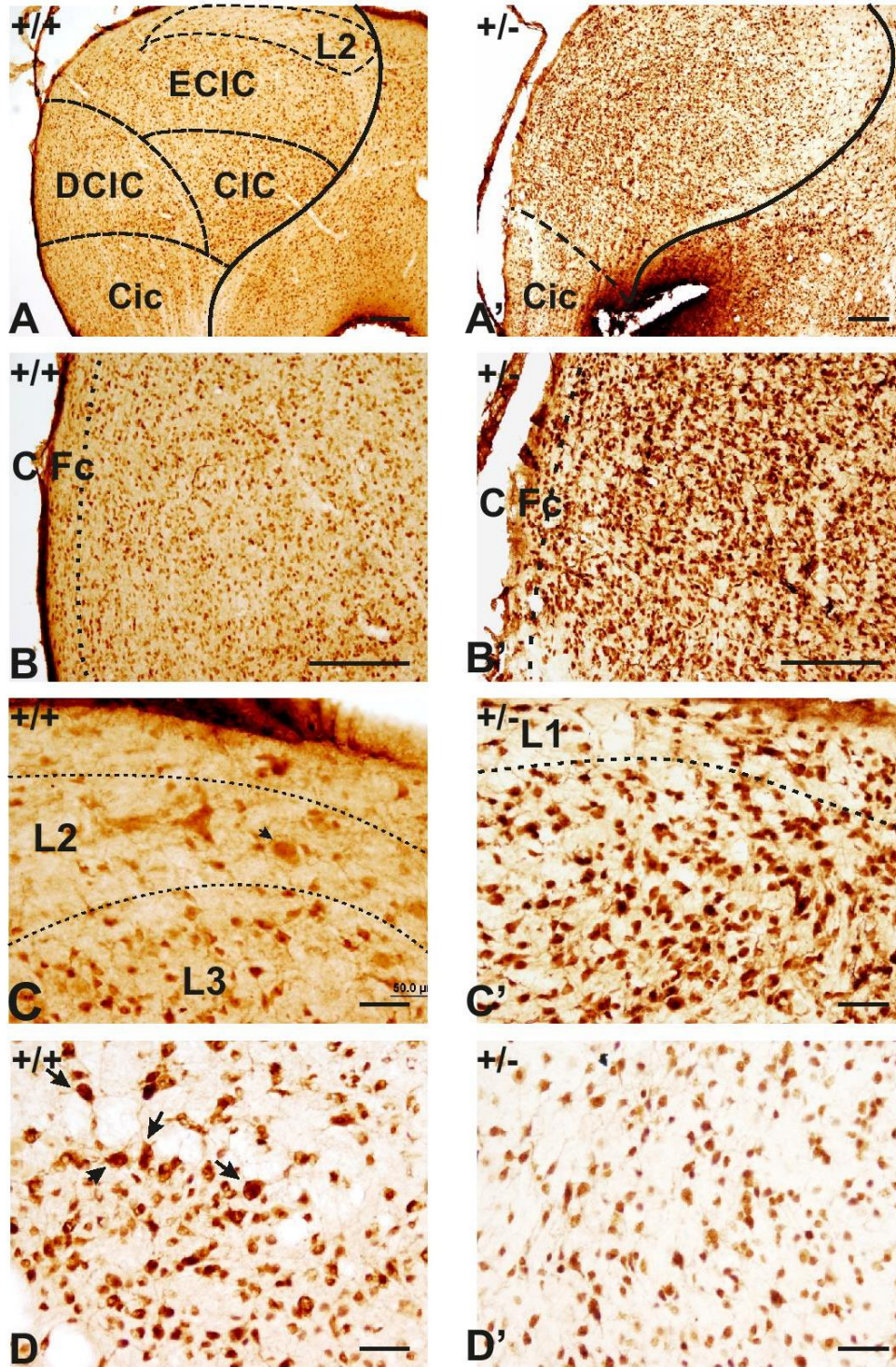


Figura 7. Microfotografías de secciones transversales del colículo inferior a nivel de su zona más rostral de ratones salvajes (A-D) e individuos reeler heterocigotos (A'-D'), procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos contra NeuN. Las imágenes A y A' corresponden a una vista panorámica del IC. B y B'. Imágenes a mayor aumento de la zona de la DCIC. C y C'. Imágenes de la ECIC. D y D'. Imágenes a mayor aumento del CIC. El asterisco indica la posición del tercer ventrículo; las flechas señalan grandes neuronas de la L2 y el CIC. Abreviaturas pág.: 32. Escalas: 200 μ m (A-B y A'-B'), 50 μ m (C-D y C'-D').

b. Región medial

En regiones mediales del colículo inferior de individuos salvajes pudieron hacerse las mismas divisiones que en las regiones comisurales, de modo que tanto la DCIC, como la ECIC y el CIC fueron fácilmente distinguibles. Además, en cuanto a las características citoarquitectónicas de dichos núcleos, éstas fueron similares a las descritas en las regiones caudales del colículo inferior (**Figura 8, A-D**).

Sin embargo, en individuos heterocigotos, al igual que ocurría con la región rostral resulta muy complicado el establecimiento de los límites entre los distintos núcleos que conforman el colículo (**Figura 8, A'-D'**), de modo que en la región correspondiente con la DCIC resultó imposible establecer los límites de la cápsula fibrocelular (**Figura 8, B'**), al igual que ocurre con la L1 de la ECIC, donde las capas más profundas parecieron entremezclarse (**Figura 8, C'**). En el CIC, además, las grandes neuronas de los individuos salvajes no pudieron ser observadas (**Figura 8, D'**).

c. Región caudal

En regiones caudales del colículo inferior de individuos salvajes, los tres núcleos también pudieron diferenciarse, con una organización citoarquitectónica similar a la observada las regiones rostrales (**Figura 9, A-D**).

En el colículo inferior caudal de individuos reeler heterocigotos hemos observado las mismas alteraciones citoarquitectónicas descritas para las regiones mediales (**Figura 9, A'-D'**).

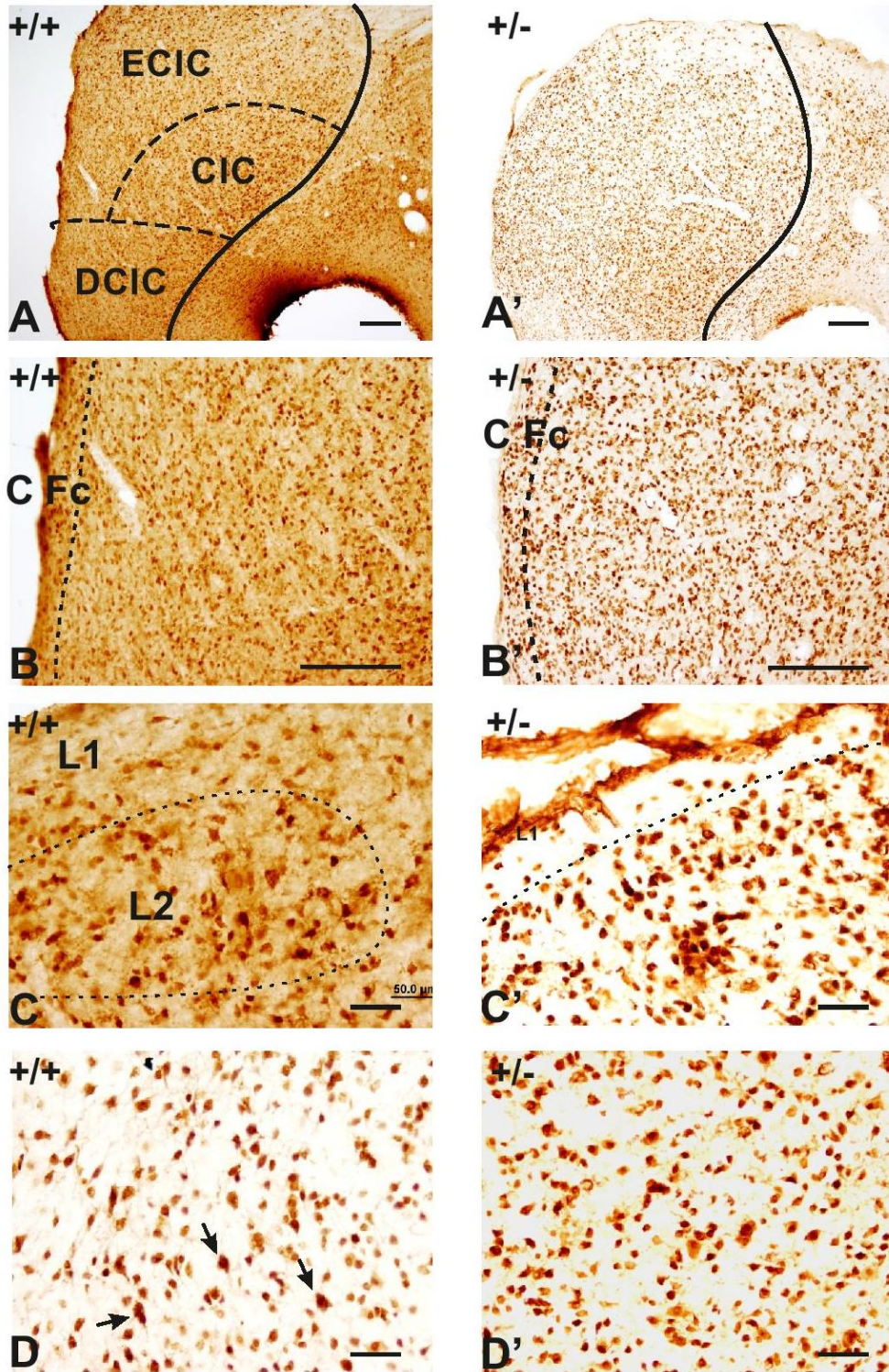


Figura 8. Microfotografías de secciones transversales del colículo inferior a nivel de su zona medial de ratones salvajes (A-D) e individuos reeler heterocigotos (A'-D'), procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos contra NeuN. Las imágenes A y A' corresponden a una vista panorámica del IC. B y B'. Imágenes a mayor aumento de la zona de la DCIC. C y C'. Imágenes de la ECIC. D y D'. Imágenes a mayor aumento del CIC. El asterisco indica la posición del tercer ventrículo; las flechas en D señalan grandes neuronas de la L2 y el CIC. Abreviaturas pág.: 33. Escalas: 200µm (A-B y A'-B'), 50µm (C-D y C'-D').

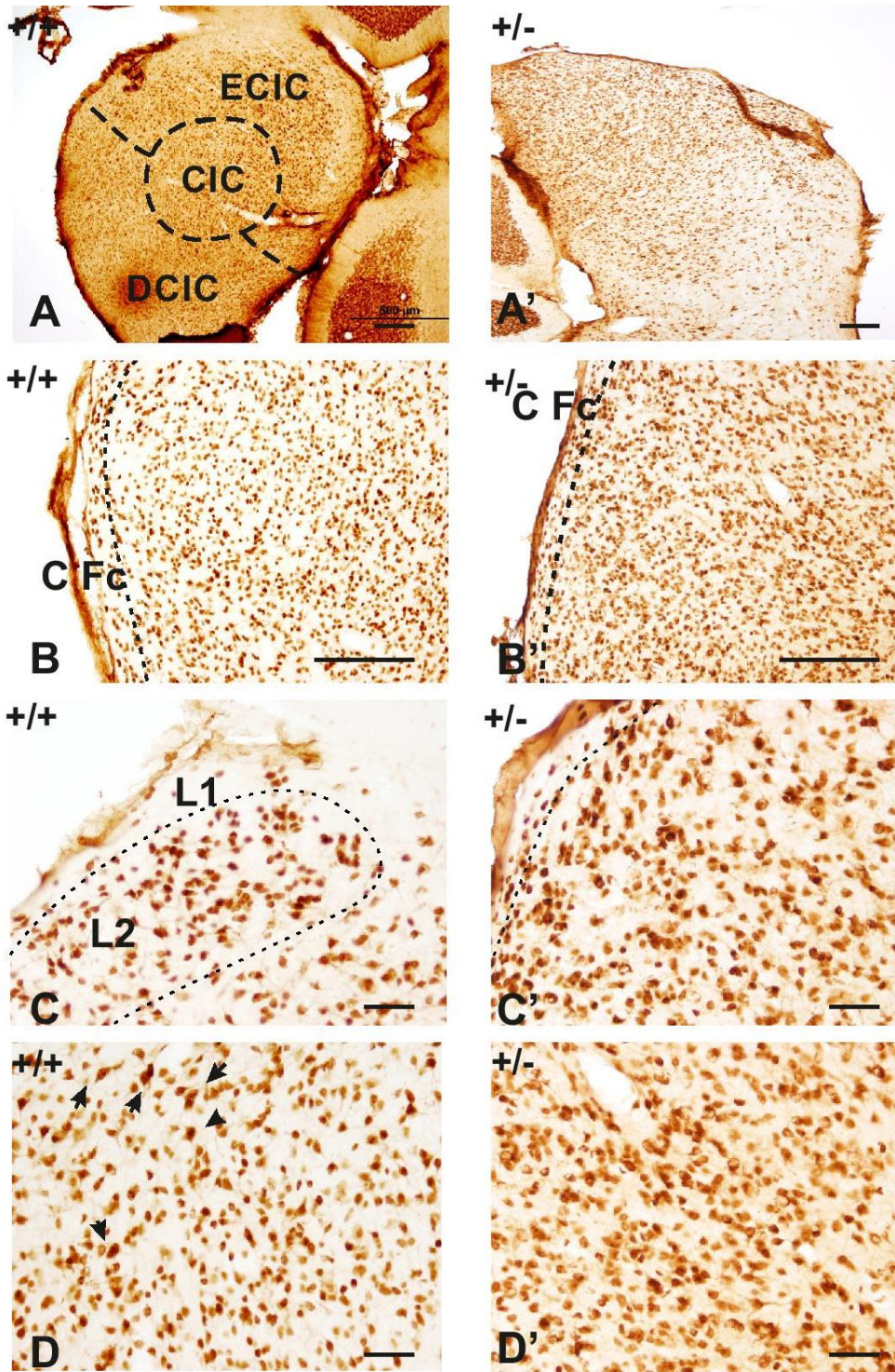


Figura 9. Microfotografías de secciones transversales del colículo inferior a nivel de su zona caudal de ratones salvajes (A-D) e individuos reeler heterocigotos (A'-D'), procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos contra NeuN. Las imágenes A y A' corresponden a una vista panorámica del IC. B y B'. Imágenes a mayor aumento de la zona de la DCIC. C y C'. Imágenes de la ECIC. D y D'. Imágenes a mayor aumento del CIC. El asterisco indica la posición del tercer ventrículo; las flechas señalan grandes neuronas de la L2 y el CIC. Abreviaturas pág.: 32. Escalas: 200µm (A-B y A'-B'), 50µm (C-D y C'-D').

2. Patrón de distribución de reelina, GAD, glutamato y TH en el colículo inferior.

Tanto en los individuos salvajes como heterocigotos hemos observado la presencia de estructuras inmunorreactivas a reelina, GAD, glutamato y TH en distintas regiones del colículo inferior.

a. Patrón de distribución de estructuras inmunorreactivas a Reelina

En general, las células que muestran positividad para reelina presentan un soma con morfología fusiforme, del que sobresalen una o varias prolongaciones inmunoreactivas. La inmunorreactividad se aprecia como un marcaje difuso en la periferia del soma, así como en la zona proximal de las prolongaciones.

De forma general, células positivas fueron visibles en todo el colículo de individuos salvajes, exceptuando la DCIC, mientras que en los individuos heterocigotos, células inmunorreactivas están presentes en todas las áreas del colículo inferior, aunque en una aparente menor cantidad (**Figura 10, A-A'**).

En individuos salvajes, en la región correspondiente con la DCIC no hemos observado la presencia de la reelina (**Figura 10, B**); sin embargo, en la ECIC se observan células dispersas en la capa L2 (**Figura 10, C**), y no se observa la presencia de inmunorreactividad a reelina en la L1 y L3. En el núcleo central del colículo inferior hemos visto la presencia de numerosas células positivas para reelina (**Figura 10, D**).

En los individuos reeler heterocigotos se observó el mismo tipo de marcaje celular que en los ejemplares salvajes (**Figura 10, C'-D'**); sin embargo, a diferencia de lo observado en los individuos salvajes se observan algunas células dispersas en el DCIC (**Figura 10, B'**), y las células positivas presentes en la ECIC se disponen en posiciones más alejadas de la superficie pial, y a este nivel parece que la cantidad de células reelina positivas es menor que en individuos salvajes (**Figura 10, C'**). En cuanto al CIC, células inmunorreactivas se presentaron en dicho núcleo, sin poder apreciar diferencias significativas con respecto al CIC de los individuos salvajes (**Figura 10 D'**).

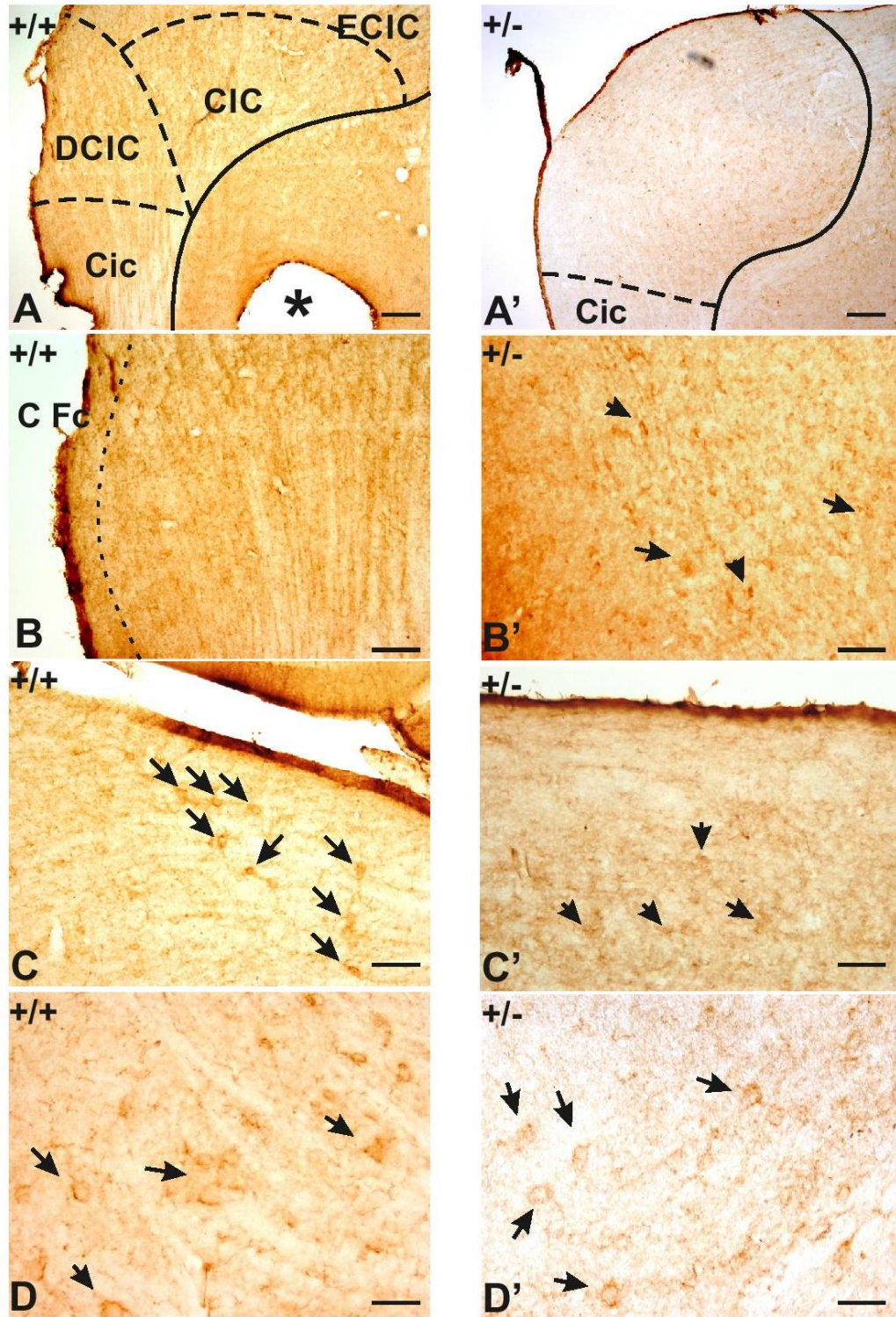


Figura 10. Microfotografías de secciones transversales del colículo inferior a nivel de su zona más rostral de ratones salvajes (A-D) e individuos reeler heterocigotos (A'-D'), procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos contra reelina. Las imágenes A y A' corresponden a una vista panorámica del IC. B y B'. Imágenes a mayor aumento de la zona de la DCIC. C y C'. Imágenes de la ECIC. D y D'. Imágenes a mayor aumento del CIC. El asterisco indica la posición del tercer ventrículo; las flechas señalan grandes neuronas de la L2 y el CIC. Abreviaturas pág.: 32. Escalas: 200 μ m (A y A'), 100 μ m (B y B'), 50 μ m (C-D y C'-D').

b. Distribución de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD)

Tanto en individuos salvajes como en heterocigotos hemos observado la presencia de células y fibras inmunorreactivas para GAD, en ambos casos el inmunomarcaje se aprecia en forma de puntos.

En individuos salvajes hemos observado, numerosas células inmunorreactivas desde las porciones rostrales del ECIC hasta regiones caudales (**Figura 11, A-B**); por otra parte, en todas las regiones del colículo inferior se observa una elevada inervación GABAérgica.

Sin embargo, en individuos reeler heterocigotos, sin embargo, las células positivas se distribuyen por todas las regiones del colículo (**Figura 11, A'-B'**). Aunque se observan fibras inmunorreactivas en todas las regiones del colículo, aparentemente la cantidad de fibras parece ser menor en comparación con lo observado en los individuos salvajes.

c. Distribución de glutamato.

En individuos salvajes hemos observado la presencia de células y fibras inmunorreactivas al glutamato en todas las regiones del colículo, tanto las células como las fibras el inmunomarcaje se aprecia como un punteado.

En los individuos salvajes hemos detectado la presencia de escasas células positivas para glutamato en todas las regiones del colículo inferior; sin embargo, hemos observado una elevada cantidad de fibras en todas las áreas del colículo inferior, siendo ésta más elevada en la región la ECIC. (**Figura 11, C-D**). En cuanto a los individuos reeler heterocigotos la DCIC y en la ECIC muestra una mayor densidad de fibras positivas para glutamato que el CIC, (**Figura 11, C'-D'**).

d. Distribución de TH

En individuos salvajes y heterocigotos se observa una elevada densidad de fibras inmunorreactivas para TH, y escasas células inmunorreactivas, en las cuales, el marcaje se concentra en la zona proximal de las prolongaciones. Las fibras se localizan en todas las regiones del colículo inferior, siendo especialmente elevada la cantidad de fibras en la DCIC y la ECIC, mientras que en el CIC se observan escasas fibras; en algunos casos se puede apreciar que muestran una morfología arrosariada (**Figura 11, E**). El patrón de distribución de TH observado

en los heterocigotos aunque es similar al observado en los salvajes, hemos observado una menor densidad de células y fibras inmunorreactivas. (Figura 11, E').

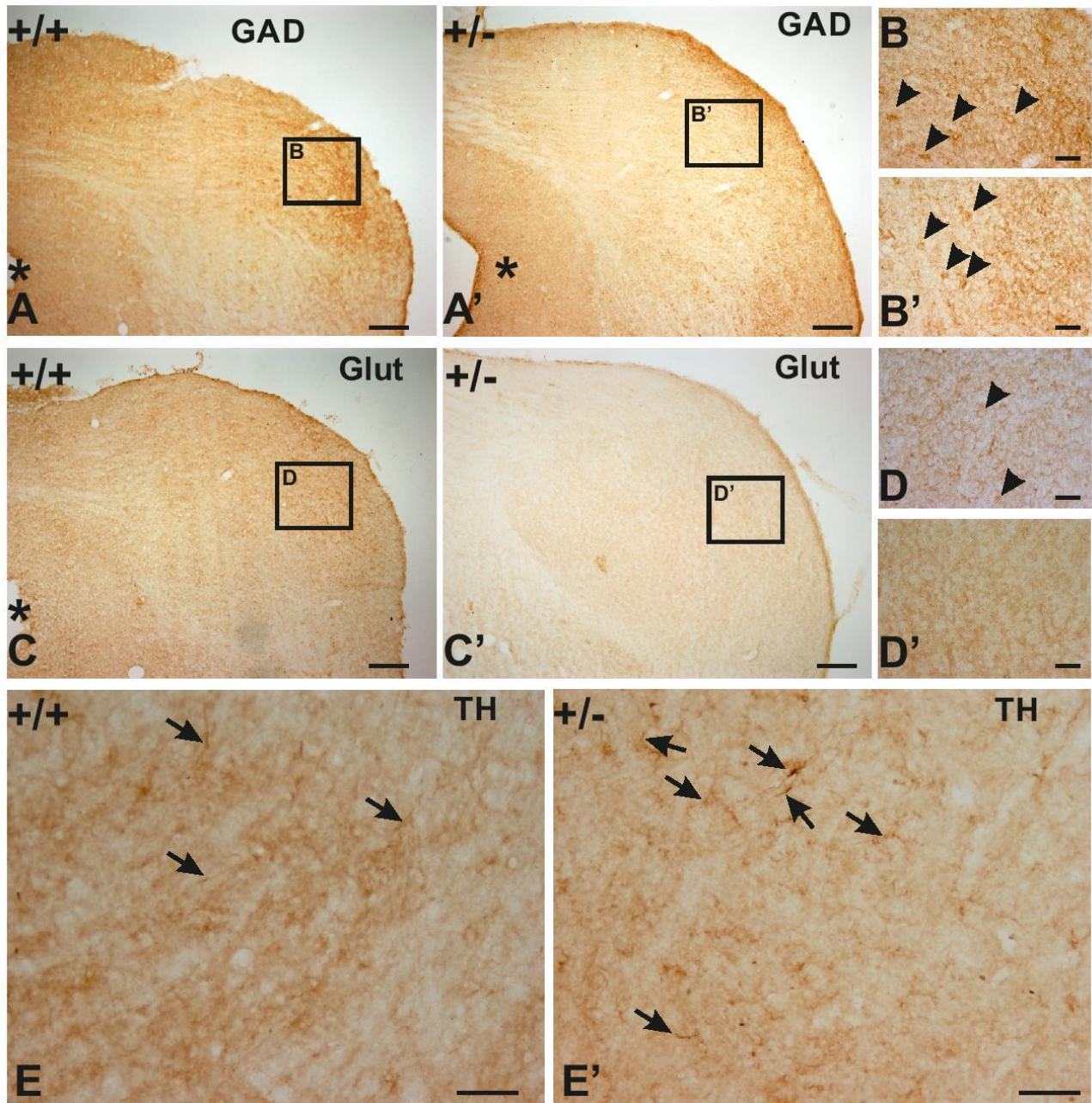


Figura 11. Microfotografías de secciones transversales del colículo inferior tomadas en ratones salvajes (A-E) e individuos reeler heterocigotos (A'-E'). Las imágenes A y A' corresponden a una visión panorámica del IC al aplicar anticuerpos contra GAD; las imágenes B y B' muestran el mismo marcaje en detalle de la región enmarcada; las imágenes C y C' muestran una visión panorámica del IC al aplicar anticuerpos contra glutamato; las imágenes D y D' muestra el mismo marcaje en detalle de la región enmarcada; las imágenes E y E' muestran un detalle del IC al aplicar anticuerpo contra TH. El asterisco señala la localización del tercer ventrículo; las puntas de flecha indican células con inmunoreactividad positiva; las puntas de flecha señalan fibras arrosariadas en el IC. Abreviaturas en pág.: 32. Escalas: 200µm (A y A', C y C'), 50µm (B, D-E y B', D'-E').

DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos estudiado la organización citoarquitectónica del colículo inferior de individuos salvajes y heterocigotos del ratón mutante reeler, con la aplicación de un anticuerpo contra la proteína neuronal nuclear (NeuN) que está presente en todas las neuronas excepto las células mitrales del bulbo olfatorio y células de Purkinje del cerebelo. El colículo inferior de los individuos salvajes presenta la organización citoarquitectónica descrita previamente en el encéfalo de ratón (Malmierca and Ryugo, 2012). Así, los tres grandes núcleos pueden delimitarse con gran facilidad, pudiéndose observar una región comisural, presente tan solo en las regiones más rostrales del colículo, una DCIC con una cápsula fibrocelular superficial con células fusiformes, una ECIC dividida en tres capas (L1-L3) y un CIC. Sin embargo, en los individuos heterocigotos, los límites entre estos tres grandes núcleos no pudieron establecerse con claridad, y la cápsula fibrocelular de la DCIC presentó, aparentemente, una mayor densidad celular que en individuos salvajes. Además, en el CIC se reconocen neuronas de morfología muy similar a las capas profundas de la DCIC. Así mismo, en la ECIC no pudieron establecerse los límites entre las tres capas, de forma que las células que componen la L2 y L3 se organizan formando una única capa difusa.

Estudios previos, utilizando tinciones clásicas y técnicas inmunohistoquímicas se ha analizado la organización citoarquitectónica de numerosas áreas del encéfalo del ratón mutante reeler, y esta desorganización abarca tanto áreas laminadas como no laminadas (para revisión ver: Katsuyama and Terashima, 2009). En el colículo superior, que está relacionado con el procesamiento de la información visual, se ha visto que las tres capas más superficiales de dicha estructura se encuentran entremezcladas formando una única capa difusa (Baba et al., 2007), y en el cerebelo y la corteza se ha descrito que determinados tipos celulares tienden a concentrarse en las capas más profundas (Katsuyama and Terashima, 2009), observaciones ambas que muestran similitud con las alteraciones que hemos apreciado en el colículo inferior de los ratones heterocigotos. Por otra parte, en la cápsula fibrocelular de los heterocigotos hemos observado una aparente mayor densidad celular, y a pesar de que no hemos realizado estudios cuantitativos para comprobar si estas diferencias de densidad son significativas, nuestros resultados están en consonancia con otros estudios realizados previamente en los que se vio que la zona marginal de

la corteza cerebral de individuos reeler presentaba una mayor densidad celular (Chai et al., 2009). Una desorganización del correcto patrón citoarquitectónico también se ha observado en el núcleo coclear dorsal utilizando anticuerpos contra proteínas que ligan calcio, donde distintas capas se fusionan en una única capa (Takaoka et al., 2005) y en el complejo de la oliva donde también se ha observado que los límites entre los distintos núcleos que lo conforman resultan extremadamente difíciles de establecer (Katsuyama and Terashima, 2009); sin embargo, hasta el momento no se había realizado un estudio en el cual se analizara la organización citoarquitectónica del colículo inferior. Nuestros resultados, en conjunto con los estudios previos, indican alteraciones en la correcta organización citoarquitectónica de diversos núcleos relacionados con la percepción auditiva, las cuales podrían estar relacionadas con anomalías en el procesamiento e integración de la información auditiva. Por otra parte, sería interesante conocer si este patrón de desorganización tiene algún efecto en el patrón topográfico de conectividad aferente y eferente entre los núcleos que forman parte del sistema auditivo, para lo cual sería necesario realizar nuevas investigaciones.

Mediante la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas hemos estudiado el patrón de distribución de la proteína reelina en el colículo inferior de ratones salvajes y heterocigotos. Así, en los primeros hemos detectado células Reelina-positivas en la L2 de la ECIC y en el CIC, mientras que en los ejemplares heterocigotos dichas células se observan más dispersas y en posiciones más alejadas de la superficie pial en la DCIC, la ECIC y el CIC. El patrón de expresión observado en los individuos salvajes coincide con lo descrito previamente en el colículo inferior de rata (Ramos-Moreno et al., 2006). La mutación reeler en organismos heterocigotos es la responsable de una menor expresión de la glucoproteína Reelina, en concreto, de un déficit del 50% con respecto a los individuos salvajes. En estudios previos en ratones reeler heterocigotos (Liu et al., 2001) se ha visto que el número de células positivas para Reelina en la corteza frontoparietal es significativamente menor en las capas superficiales en comparación con los individuos salvajes, y, además, éstas se localizan de forma dispersa a lo largo de la misma. Aunque en el presente trabajo no hemos apreciado diferencias en el número de células que expresan reelina entre los individuos salvajes y heterocigotos, para confirmar este aspecto sería necesario realizar estudios cuantitativos.

Durante los procesos de migración que tienen lugar durante el desarrollo del sistema nervioso, la reelina actúa como señal de stop y de posicionamiento celular (Cooper, 2008; Zhao et al., 2004) y, en estadios adultos, la Reelina está involucrada en procesos de maduración y sinaptogénesis (D'Arcangelo, 2006). Diversas investigaciones han mostrado que el déficit de reelina induce un malposicionamiento de las neuronas debido a fallos en la migración en diversas regiones encefálicas tales como el colículo superior (Baba et al., 2007), hipocampo (Del Río et al., 1997), corteza cerebral (Ikeda and Terashima, 1997), cerebelo (Swanson et al., 2005) y en el núcleo coclear dorsal (Takaoka et al., 2005). Por todo ello, pensamos que las alteraciones citoarquitectónicas que observamos en el colículo inferior de los heterocigotos podrían estar relacionados con el déficit de Reelina que poseen estos ratones.

Estudios previos en rata han mostrado que un cuarto de las células del colículo inferior son de naturaleza GABAérgica (Mellott et al., 2014). Por otra parte, utilizando anticuerpos contra GAD67 se ha detectado una elevada cantidad de terminales axónicos en todas las regiones del colículo inferior de rata y ratón (Buentello et al., 2015), lo cual concuerda con nuestras observaciones en el encéfalo de los individuos salvajes. En el presente trabajo hemos utilizado un anticuerpo que reconoce las dos isoformas de la GAD; estudios previos en roedores, utilizando técnicas de hibridación in situ, han mostrado que aunque ambas isoformas están presentes en el colículo inferior, la GAD67 es la más abundante. Por lo tanto, sería necesario utilizar anticuerpos contra cada una de las isoformas, o técnicas de hibridación in situ para dilucidar si hay un predominio de una isoforma frente a la otra en el colículo inferior de ratón reeler. Por otra parte, en el colículo inferior también hemos observado que los heterocigotos muestran una menor densidad de fibras positivas para GAD en relación a los individuos salvajes y un descenso en el número de células. Estudios previos han mostrado un descenso en la expresión de GAD en la corteza e hipocampo (Nullmeier et al., 2011); nuestros resultados, aunque parecen sugerir que una disfunción del sistema GABAérgico podría tener lugar en el colículo inferior del ratón heterocigoto reeler, nuevos estudios son necesarios para confirmar esta cuestión.

Nuestros resultados muestran la presencia de glutamato en todas las áreas del colículo inferior de individuos salvajes, siendo más evidente en la ECIC; sin embargo, una mayor inmunorreactividad se observa en las dos cortezas que envuelven el núcleo central del colículo

(ECIC y DCIC). El patrón de distribución de glutamato presente en los individuos salvajes concuerda con los obtenidos en rata mediante técnicas de hibridación in situ para los mARN de los transportadores vesiculares de glutamato, observando que las células del colículo expresan, en su mayoría, mARN para VLGUT2 en la región limítrofe entre la ECIC y el CIC (Ito and Oliver, 2010). Además, también se han visto transportadores tipo VGLUT1 en fibras procedentes de la corteza auditiva (Ito et al., 2011).

En estudios realizados en ratón reeler, se ha demostrado un descenso de la expresión de los receptores de glutamato en otras áreas del encéfalo (Takayama et al., 1997); además, estudios realizados en ratas con déficits auditivos revelaron una alteración en la expresión de genes involucrados en el sistema de neurotransmisión glutamatérgica (Holt et al., 2005). Sin embargo, en el colículo inferior hemos observado un aumento del glutamato, por lo que se hacen necesarios estudios de recuento del glutamato, así como estudios inmunohistoquímicos y de hibridación in situ de receptores y transportadores con el fin de dilucidar si en el colículo inferior de los heterocigotos hay una sobreexpresión de dicho neurotransmisor.

En lo relativo a la distribución de TH, nuestros resultados indican una expresión de esta enzima en fibras nerviosas de todo el colículo inferior, especialmente en la DCIC. A pesar de que no parecen existir grandes diferencias entre los individuos salvajes y los heterocigotos, en estos últimos sí que se puede apreciar una menor densidad de estructuras inmunorreactivas. Estudios en ratones con déficits auditivos revelaron que el número de células inmunorreactivas a TH no muestra diferencias significativas con respecto a los individuos con una audición normal (Tong et al., 2005), lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo, se hace necesario realizar estudios más precisos en relación con el sistema catecolaminérgico para tratar de comprender en qué medida estos sistemas están afectados en el reeler.

Nuestros resultados en conjunto indican que el ratón reeler heterocigoto constituye un buen modelo para profundizar en las interacciones entre la reelina y los sistemas de neurotransmisión glutamatérgico, GABAérgico y catecolaminérgico.

CONCLUSIONES

1. El patrón de organización citoarquitectónica del colículo inferior se encuentra desorganizado en el ratón mutante reeler (+/-).
2. Células positivas para reelina se localizan en la ECIC y CIC del colículo inferior, y el número de células parece superior en los heterocigotos que en los salvajes.
3. Células y fibras positivas para GAD se localizan en todas las áreas del colículo inferior de ratones salvajes y heterocigotos, y estos últimos aparentemente muestran una menor inervación GABAérgica.
4. Una elevada inmunorreactividad a glutamato (células y fibras) está presente en todas las áreas del colículo inferior de individuos salvajes, mientras que en heterocigotos, la presencia de glutamato se restringe a las fibras.
5. Fibras inmunorreactivas para TH están presentes en todas las áreas del colículo inferior de individuos salvajes y heterocigotos, no apreciándose diferencias entre ellos.

ABREVIATURAS

NEUROANATOMÍA

CIC núcleo central del IC

DCIC corteza dorsal del IC

ECIC corteza externa del IC

EGL capa granular externa

IC colículo inferior

L1 capa 1 de la ECIC

L2 capa 2 de la ECIC

L3 capa 3 de la ECIC

LCIC corteza lateral del IC

PCL capa de células de Purkinje

RCIC corteza rostral del IC

SNC sistema nervioso central

SUSTANCIAS

GABA ácido γ -aminobutírico

GAD ácido glutámico descarboxilasa

TH tirosín hidroxilasa

BIBLIOGRAFÍA

Alcántara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., & Soriano, E. (1998). Regional and celular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J Neurosci*, *18*(19), 7779-7799.

Baba, K., Sakakibara, S., Setsu, T., & Terashima, T. (2007). The superficial layers of the superior colliculus are cytoarchitecturally and myeloarchitecturally disorganized in the reelin-deficient mouse , *reeler*. *Brain Res*, *1140*, 205-215.

Ballmaier, M., Zoli, M., Leo, G., Agnati, L. F., & Spano, P. (2002). Preferential alterations in the mesolimbic dopamine pathway of heterozygous reeler mice: an emerging animal-based model of schizophrenia. *Eur J Neurosci*, *15*(7), 1197-1205.

Bock, H.H., Jossin, Y., Liu, P., Förster, E., May, P., Goffinet, A.M., & Herz, J. (2003). Phosphatidylinositol 3-Kinase Interacts with the Adaptor Protein Dab1 in Response to Reelin Signaling and Is Required for Normal Cortical Lamination, *J Biol Chem*, *278*(40), 38772-38779.

Britto, J.M., Tait, K.J., Lee, E.P., Gamble, R.S., Hattori, M., & Tan, S.-S. (2014). Exogenous Reelin modifies the migratory behavior of neurons depending on cortical location. *Cereb Cortex*, *24*, 2835-2847.

Brumovsky, P., Watanabe, M., & Hökfelt, T. (2007). Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and-2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. *Neuroscience*, *147*(2), 469-490.

Buentello, D.C., Bishop, D.C., & Oliver, D.L. (2015). Differential distribution of GABA and glycine terminals in inferior colliculus of rat and mouse. *J Comp Neurol*. doi: 10.1002/cne.23810.

Cant, N.B., & Benson, C.G. (2008). Organization of the inferior colliculus of the gerbil (*Meriones Unguiculatus*):projections from the cochlear nucleus. *Neuroscience*, *154*(1), 206-217.

Cariboni, A., Rakic, S., Liapi, A., Maggi, R., Goffinet, A., & Parnavelas, J.G. (2005). Reelin provides an inhibitory signal in the migration of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Development*, *132*(21), 4709-4708.

Chai, X., Förster, E., Zhao, S., Bocj, H.H., & Frotscher, M. (2009). Reelin acts as a stop signal for radially migrating neurons by inducing phosphorylation of n-cofilin at the leading edge. *Commun Integr Biol*, 2(4), 375-377.

Cooper, J.A., Allen, N.S., & Feng, L. (2008). Protein kinases and signaling pathways that are activated by Reelin. En: *Reelin glycoprotein. Structure, biology and roles in health disease*. Fatemi, H. (ed). Springer, Minneapolis, pp 193-216.

D'Arcangelo, G. (2006). Reelin mouse mutants as models of cortical developmet disorders. *Epilepsy Behav*, 8(1), 81-90.

D'Arcangelo, G., & Curran, T. (1998). Reeler: new tales on an old mutant mouse. *Bioessays*, 20(3), 235-244.

Del Río, J.A., Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., & Soriano, E. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, 385(6611), 70-74.

Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A & Anton, E.S. (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, 27(1), 33-44.

Gasparini, C.F., & Griffiths, L.R (2012) The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *Int J Biomed Sci*. 9, 1-8.

Gittelman, J.X., Perkel, D.J., & Portfors, C.V. (2013). Dopamine Modulates Auditory Responses in the Inferior Colliculus in a Heterogeneous Manner. *J Assoc Res Otolaryngol*, 14(5), 719-729.

Hack, I., Hellwig, S., Junghans, D., Brunne, B., Bock, H.H., Zhao, S., & Frotscher, M. (2007). Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. *Development*, 134(21), 3883-3891.

Holt, A.G., Asako, M., Lomax, C.A., MacDonald, J.W., Tong, L., Lomax, M.I. & Altschuler, R. A. (2005). Deafness-related plasticity in the inferior colliculus: gene expression profiling following removal of peripheral activity. *J Neurochem*, 93(5), 1069-1086.

Ikeda, Y., & Tersahima, T. (1997). Corticospinal tract neurons are radially malpositioned in the sensory-motor cortex of the Shaking rat Kawasaki. *J Comp Neur*, 383(3), 370-380.

Impagnatiello, F., Guidotti, A. R., Pesold, C., Dwivedi, Y., Caruncho, H., Pisu, M. G., Uzunov, D.P., Davis, J.M., Pandey, G.N., Pappas, G.D., Tueting, P., Sharma, R.P., & Costa, E. (1998). A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci*, 95(26), 15718-15723.

Isosaka, T., Hattori, K., & Yagi, T. (2006). NMDA-receptor proteins are upregulated in the hippocampus of postnatal heterozygous reeler mice. *Brain Res*, 1073, 11-19.

Ito, T., Bishop, D.C., & Oliver, D.L. (2011). Expression of glutamate and inhibitory amino acid vesicular transporters in the rodent auditory brainstem. *J Comp Neurol*, 519(2), 316-340.

Ito, T., & Oliver, D.L. (2010). Origins of Glutamatergic Terminals in the Inferior Colliculus Identified by Retrograde Transport and Expression of VGLUT1 and VGLUT2 Genes. *Front Neuroanat*, 4(135), 1-11.

Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lamber de Rouvroit, C., & Goffinet, A.M. (2004). The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J Neurosci*, 24(2), 514-521.

Kanzaki, J., Mikoshina, K., & Tsukada, Y. (1985). Auditory brain stem response in neuropathological mutant mice (shiverer and reeler). *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 47(6), 294-298.

Katsuyama, Y., & Tersahima, T. (2009). Developmental anatomy of reeler mutant mouse. *Dev Growth Differ*, 51, 271-286.

Kreft, M., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S., & Schousboe, A. (2012). Aspects of astrocyte energy metabolism, amino acid neurotransmitter homeostasis and metabolic compartmentation. *ASN Neuro*, 4(3).

Kubasak, M.D., Brooks, R., Chen, S., Villeda, S.A. & Phelps, P.E. (2004). Developmental distribution of reelin-positive cells and their secreted product in the rodent spinal cord. *J Comp Neurol*, 468(2), 165-178.

Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., El Mestikawy, S., Ravassard, P., & Nagy, F. (2004). Expression of vesicular glutamate transporter in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, 468(3), 380-394.

Lee, C.C., & Sherman, S.M. (2010). Topography and physiology of ascending streams in the auditory tectothalamic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(1), 372-377.

Liu, W.S., Pesold, C., Rodríguez, M.A., Carboni, G., Auta, J., Lacor, P., Larson, J., Condie, B.G., Guidotti, A. & Costa, E. (2001). Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(6), 3477-3482.

Malmierca, M.S., Hernández, O., Antunes, F.M., & Rees, A. (2009). Divergent and point-to-point connections in the commissural pathway between the inferior colliculi. *J Comp Neurol*, 514, 226-239.

Malmierca M.S & Ryugo, D.K. (2012). Auditory System. En: *The Mouse nervous system*. Watsin, Ch., Paxinos, G., & Puelles, L. (eds). Academic Press, pp 520-527

Mellott, J.G., Foster, N.L., Ohl, A.P., & Schofield, B.R. (2014). Excitatory and inhibitory projections in parallel pathways from the inferior colliculus to the auditory thalamus. *Front Neuroanat*, 8, 124.

Michetti, C., Romano, E., Altabella, L., Caruso, A., Castelluccio, P., Bedse, G., Gaetani, S., Canese, R., Laviola, G., & Scattoni, M.L. (2014). Mapping pathological phenotypes in reelin mutant mice. *Front Pediatr*, 2 (95).

Nishikawa, S., Goto, S., Yamada, K., Hamasaki, T., & Ushio, Y. (2003). Lack of Reelin causes malpositioning of nigral dopaminergic neurons: evidence from comparison of normal and Reelin(rl) mutant mice. *J Comp Neurol*, 461(2), 166-173.

Niu, S., Yabut, & O., D'Arcangelo, G. (2008). The Reelin signaling pathway promotes dendritic spine development in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 28, 10339-10348.

Nullmeier, S., Panther, P., Dobrowolny, H., Frotscher, M., Zhao, S., Schwegler, H., & Wolf, R. (2011). Region-specific alteration of GABAergic markers in the brain of heterozygous reeler mice. *Eur J Neurosci*, 33(4), 689-698.

Nullmeier, S., Panther, P., Frotscher, M., Zhao, S., & Schwegler, H. (2014). Alterations in the hippocampal and striatal catecholaminergic fiber densities of heterozygous reeler mice. *Neuroscience*, 275, 404-419.

Ohshima, T., Ogawa, M., Takeuchi, K., Takahshi, S., Kulkarni, A.B., & Mikoshiba, K. (2002). Cyclin-dependent kinase 5/p35 contributes synergistically with reelin/DAB1 to the positioning of facial branchiomotor and inferior olive neurons in the developing mouse hindbrains. *J Neurosci*, 22, 4036-4044.

Paxinos, G., & Franklin, K.J.B. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. New York. Academic Press.

Quattrocchi, C.C., Wannenes, F., Persico, A.M., Ciafré, S.A., D'Arcangelo, G., Farace, M.G., & Keller, F. (2002). Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 277(1), 303-309.

Ramos-Moreno, T., Galazo, M.J., Porrero, C., Martínez-Cerdeño, V., & Clascá, F. (2006). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *Eur J Neurosci*, 23(2), 401-422.

Shigeri, Y., Seal, R. P., & Shimamoto, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Rev*, 45(3), 250-265.

Sigala, S., Zoli, M., Palazzolo, F., Faccoli, S., Zanardi, Z., Mercuri, N.B., & Spano, P. (2007). Selective disarrangement of the rostral telencephalic cholinergic system in heterozygous reeler mice. *Neuroscience*, 144, 834-844.

Sturm, J., Nguyen, T., & Kandler, K. (2014). Development of intrinsic connectivity in the central nucleus of the mouse inferior colliculus. *J. Neurosci.*, 34(45), 15032-15046.

Swanson, D.J., Tong, Y., & Goldowitz, D. (2005). Disruption of cerebellar granule cell development in the Pax6 mutant, Sey mouse. *Develop Brain Res*, 160, 176-193.

Takaoka, Y., Setsu, T., Misaki, K., Yamauchi, T., & Tersahima, T. (2005). Expression of reelin in the dorsal cochlear nucleus of the mouse. *Dev Brain Res.*, 159, 127-134.

Takayama, C., Nakagawa, S., Watanabe, M., Kurihara, H., Mishina, M., & Inoue, Y. (1997). Altered intracellular localization of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in weaver and reeler Purkinje cells. *Brain Res*, 745(1-2), 231-242.

Takeda, K., Ishida, A., Takahashi, K., & Ueda, T. (2012). Synaptic vesicles are capable of synthesizing the VGLUT substrate glutamate from alpha-ketoglutarate for vesicular loading. *J Neurochem*, 121, 184-196.

Teixeira, C.M., Martín, E., Sahún, I., Massachs, N., Pujadas, L., Corvelo, A., Bosch, C., Rossi, D., Martínez, A., Maldonado, R., Dierssen, M., & Soriano, E. (2011). Overexpression of Reelin prevents the manifestation of behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*, 36, 2395-2405.

Tissir, F., & Goffinet, A. M. (2003). Reelin and brain development. *Nature Rev Neurosci*, 4(6), 496-505.

Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, 11, 823-836.

Tong, L., Altschuler, R.A., & Holt, A.G. (2005). Tyrosine hydroxylase in rat auditory midbrain: distribution and changes following deafness. *Hear Res*, 206(1-2), 2-41.

Trifonov, S., Yamashita, Y., Kase, M., Maruyama, M., & Sugimoto, T. (2014). Glutamic acid decarboxylase 1 alternative splicing isoforms: characterization, expression and quantification in the mouse brain. *BMC Neurosci*, 15, 114.

Tuetting, P., Costa, E., Dwivedi, Y., Guidotti, A., Impagnatiello, F., Manev, R., & Pesold, C. (1999). The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse. *NeuroReport*, 10(6), 1329-1334.

Yabut, O., Renfro, A., Niue, S., Swann, J.W., Marín, O., D'Arcangelo, G. (2006). Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. *Brain Res*, 1140, 75-83.

Yip, Y.P., Metha, N., Magdaleno, S., Curran, T., Yip, J.W. (2009). Ectopic expression of reelin alters migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord. *J Comp Neurol*, 515, 260-268.

Yoshihara, Y., Setsu, T., Katsuyama, Y., Kikkawa, S., Terashima, T., & Maeda, K. (2010). Cortical layer V neurons in the auditory and visual cortices of normal, reeler, and yotari mice. *Kobe J Med Sci*, 56(2), E50-E59.

Zhao, S., Chai, X., Förster, E., & Frotscher, M. (2004). Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development*, 131(20), 5117-5125.