



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EXPRESIÓN DE RECEPTORES GABA ρ 3 EN ASTROCITOS DEL NÚCLEO
MEDIO DEL CUERPO TRAPEZOIDE DEL RATÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

Psic. José Antonio Hernández Santos

Tutores: Dr. Daniel Reyes Haro (INB)
Dr. Ataulfo Martínez Torres (INB)

Comité tutor: Dra. Stéphanie Colette Thébault (INB)
Dra. Laura Colín Barenque (FES-I)

Querétato, Querétaro. México. Noviembre, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Se posó en la orilla de sus ojos, a observarse asombrado por lo diminuto y lo complejo. No hizo otra cosa que sonreír de aquello que hace a nuestra cabeza infinitamente latir.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel Reyes Haro, por la tutoría y dirección del presente trabajo y la oportunidad de mi primer acercamiento formal a la ciencia.

Al Dr. Ataulfo Martínez Torres, por haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo.

A mi comité tutor (Dr. Daniel Reyes, Dr. Ataulfo Martínez, Dra. Stéphanie Thébault, Dra. Laura Colín) por sus observaciones, sugerencias y guía durante este proyecto.

Al mi comité jurado (Dr. Daniel Reyes, Dr. Rogelio Arellano, Dra. Laura Colín, Dr. Pavel Rueda, Dr. Lenin Ochoa) por el tiempo y las observaciones hechas.

A la Técnico Académico, Dra. Ángeles Edith Espino Saldaña, por su asesoría y guía en el laboratorio.

Al Dr. Ragú Varman, por su asesoría y ayuda en cuestiones técnicas.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, D-15.

A los responsables del Bioterio, Dr. Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla, por la asesoría y enseñanza en el manejo de animales de laboratorio.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, por su inigualable e imprescindible ayuda en el área de microscopía.

Al Instituto de Neurobiología, por abrirme las puertas a la investigación.

A la UNAM, por ser mi casa de estudios desde el bachillerato.

Proyecto PAPIIT IN201915.

Becario CONACYT 619617.

DEDICATORIAS

A mis padres, por ser mi infinita inspiración en cada momento y enseñarme a ser un guerrero, a enfrentar dificultades y motivarme con amor a alcanzar hasta la más complicada meta. ¡Gracias por existir!

A mis hermanas (“Sister anciana” y “Sister sándwich”), ya que por su culpa soy un curioso sin remedio desde que tengo memoria. Por sus enseñanzas y sonrisas infinitas.

A mis sobrinos (Ángel y Gaby) y mi cuñado (“Sensei”) por ser parte de mi familia, de las experiencias y excelentes momentos. Por sus porras y abrazos.

A mis mejores amigos, Yolotl y Andrea, por ser como mis hermanos, motivando y llenándome de carcajadas, postres y cafés todo el tiempo.

A mis “compadres” (Bere, Emmanuel y Paty), por las nuevas experiencias y la magnífica amistad que hemos podido formar en este tiempo y que espero perdure mucho más.

A mis amigos “del mundo externo”, que sin especificación por miedo a la omisión me han enseñado a crecer a través de cada uno.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por su apoyo, consejos y sonrisas en ese espacio tan particular.

A la UNAM, por darme cobijo en muchos aspectos a través de los ciclos (CCH, Psicología y ahora en INB) a través de los valores y las enseñanzas.

A los animalitos de laboratorio, por ser la respetable herramienta por la cual nos permiten comprender a la Naturaleza.

A la vida, la música, la poesía y demás importantes personas, que con cada experiencia han regalado el complemento adecuado a la perspectiva de mis humildes ojos.

Por mi raza hablará el espíritu.

Antonio

RESUMEN

La transmisión GABAérgica ha sido ampliamente estudiada en el Sistema Nervioso Central debido a su acción inhibitoria, fundamental para el equilibrio de los circuitos nerviosos. El circuito auditivo está compuesto por varios núcleos de relevo, siendo uno de ellos el Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB), que está implicado en la localización de sonidos como un sensor de intensidades. El MNTB posee una sinapsis de tipo axosomática primordialmente glutamatérgica (la más grande en mamíferos), en donde la terminal axónica que inerva a sus neuronas principales es conocida como Cáliz de Held. La expresión de receptores GABA_B se reportó en la terminal presináptica, mientras que en las neuronas principales postsinápticas expresan receptores GABA_A, incluyendo a las subunidades GABA_ρ (rho). Estas subunidades (ρ1-3) se distinguen de las subunidades clásicas GABA_A por desensibilizarse de manera más lenta y tener una mayor afinidad a GABA; farmacológicamente son insensibles a bicuculina y antagonizados selectivamente por TPMPA. Su expresión ocurre en distintas regiones del sistema nervioso central como la retina, el cerebelo, hipocampo, corteza cerebral y cuerpo estriado. Estudios recientes demostraron la expresión de la subunidad GABA_{ρ3} en las neuronas principales del MNTB, sin embargo, su expresión en los astrocitos se desconoce. El objetivo del estudio fue investigar si los astrocitos del MNTB expresan la subunidad GABA_{ρ3} durante el desarrollo postnatal. Los estudios de RT-PCR mostraron que la expresión de GABA_{ρ3} ocurre en la región del tallo cerebral que incluye al MNTB durante el desarrollo postnatal. Estudios de inmunofluorescencia confirmaron la expresión de GABA_{ρ3} en el MNTB en tres etapas del desarrollo: previo (P9), durante (P12) y posterior a la apertura del canal auditivo (P18). La densidad de células GABA_{ρ3}⁺ presentó un incremento significativo en P12 respecto a P9 (63%) y P18 (149%). Finalmente, los estudios de inmunofluorescencia mostraron que una fracción de los astrocitos del MNTB presentaron inmunoreactividad para GABA_{ρ3} en el ratón transgénico GFAP-eGFP. Las conclusiones de este trabajo son: 1) La expresión de GABA_{ρ3} se presenta durante el desarrollo postnatal temprano del MNTB (previo, durante y posterior a la apertura del canal auditivo); 2) La densidad de células inmunoreactivas a GABA_{ρ3} alcanza su pico durante la apertura del canal auditivo (P12); 3) Una fracción de los astrocitos del MNTB expresa GABA_{ρ3}.

Palabras clave: **Astrocito, Cáliz de Held, GABA, MNTB, GABA_ρ.**

ABSTRACT

GABAergic transmission has been extensively studied in the Central Nervous System, its inhibitory action is essential for nerve circuit balance. The auditory circuit is composed of several relay nuclei, one of them is the Medial Nucleus of Trapezoid Body (MNTB), a sensor of intensities, involved in sound localization. The MNTB is composed of an axo-somatic synapse, the largest in mammals. The Calyx of Held is the presynaptic terminal of the MNTB, it releases glutamate that acts postsynaptically on principal neurons. Previous reports showed expression of GABA-B receptors on Calyx of Held, while postsynaptically principal neurons expressed GABA-A receptors, including expression of subunits GABA ρ (rho). These subunits (ρ 1-3) have a greater affinity for GABA and desensitize slowly when compared to classical GABA-A receptors; they are insensitive to bicuculline and antagonized by TPMPA. The expression of GABA ρ subunits occurs in different regions of CNS such as retina, cerebellum, hippocampus, cerebral cortex and striatum. Moreover, recent studies showed GABA ρ expression in principal neurons of MNTB, but its expression in **astrocytes is unknown. Thus, the aim of this study was to investigate whether astrocytes express GABA ρ 3 subunit during postnatal development of the MNTB. RT-PCR studies showed GABA ρ 3 expression through postnatal development brainstem, where MNTB is located. Moreover, immunofluorescence studies confirmed the expression of GABA ρ 3 in MNTB: prior (P9), during (P12) and after opening of the ear canal (P18). GABA ρ 3 + cell density showed a peak at P12 when compared to P9 (63%) and P18 (149%). Finally, immunofluorescence studies in MNTB showed a fraction of astrocytes that were immunoreactive for GABA ρ 3. The conclusions of this study are: 1) The expression of GABA ρ 3 occurs during early postnatal development of MNTB (before, during and after the opening of the ear canal); 2) The density of GABA ρ 3+ cells peaks during the opening of the ear canal (P12); 3) A fraction of astrocytes expresses GABA ρ 3. Further studies are needed to explore the functional implications of these results.**

Keywords: Astrocyte, Calyx of Held, GABA, MNTB, GABA ρ sub units.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
TABLA DE ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	11
1.1 El Ácido γ – Aminobutírico (GABA).....	11
1.2 Receptores a GABA.....	13
1.3 El Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB)	14
1.4 Astrocitos en el MNTB	22
ANTECEDENTES	27
2.1 Receptores a GABA en el MNTB.....	27
2.2 GABA _A en el MNTB.....	28
2.3 GABA _A en astrocitos	33
JUSTIFICACIÓN	36
HIPÓTESIS	36
OBJETIVO	37
MATERIAL Y MÉTODOS	38
Inmunohistofluorescencia	38
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).....	40
Análisis de datos	41
RESULTADOS	42
Identificación del MNTB en cortes coronales de ratón	42

RT-PCR: expresión del mRNA de GABA ρ 3 en rebanadas ventrales de tallo cerebral que incluyen al MNTB	43
Expresión de GABA ρ 3 en astrocitos del MNTB del ratón.....	45
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS.....	59
INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	75
APÉNDICE	81

TABLA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxiribonucléico

ARN: Ácido Ribonucléico

ATP: Adenosín trifosfato

AVCN: Núcleo coclear ventral anterior

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BGT-1: Transportador GABA-**Betaina**

CACA: Ácido 4-*cis*-aminocriotónico

cDNA: ADN complementario

Cx: Conexina

CoH: Cáliz de Held

DAPI: 4'6'-Diamino-2-Phenylindele-Dilactato

EdU: Timidina-5-etinil-2'-Deuxiuridina

GABA: Ácido γ -amino **butírico**

GABA_A: Receptor tipo A para GABA

GABA_B: Receptor tipo B para GABA

GAD: Descarboxilaza del ácido glutámico

GAT(1-3): Transportador de GABA

GFAP: **Proteína ácido-gliofibrilar**

LSO: Oliva lateral superior

MAC: Complejo asociado a mitocondrias

MCT: Transportador de lactato

MNTB: Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide

mRNA: ARN mensajero

NC: Núcleo coclear

PKA: Proteína cinasa A

PVCN: Núcleo ventral coclear posterior

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

SNC: Sistema nervioso central

SOC: Complejo olivar superior

TACA: Ácido 4-*trans*-aminocriotónico

TM: Dominio transmembranal

TPMPA: Ácido metilfosfínico (1,2,5,6-Tetrahidropiridin-4yl)

TrkB: Receptor de tirosín cinasa B

INTRODUCCIÓN

1.1 El Ácido γ - Amino Butírico (GABA).

El ácido γ -amino butírico (GABA, por sus siglas en inglés) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC). Se sintetiza por células que poseen la enzima descarboxilaza del ácido glutámico (GAD), presentando las isoformas GAD65 y GAD 67 (Soghomonian & Martin, 1998). La GAD retira un grupo carboxilo al ácido L-glutámico para la conversión a GABA (Figura 1.1) (Bennett & Balcar, 1999; Soghomonian & Martin, 1998). La GAD65 puede encontrarse unida a la membrana de la terminal nerviosa, sintetizando GABA para su liberación vesicular; por otra parte la GAD67 está ampliamente distribuida en la célula, sintetizando primordialmente GABA para una liberación tónica (Bennett & Balcar, 1999; Soghomonian & Martin, 1998).

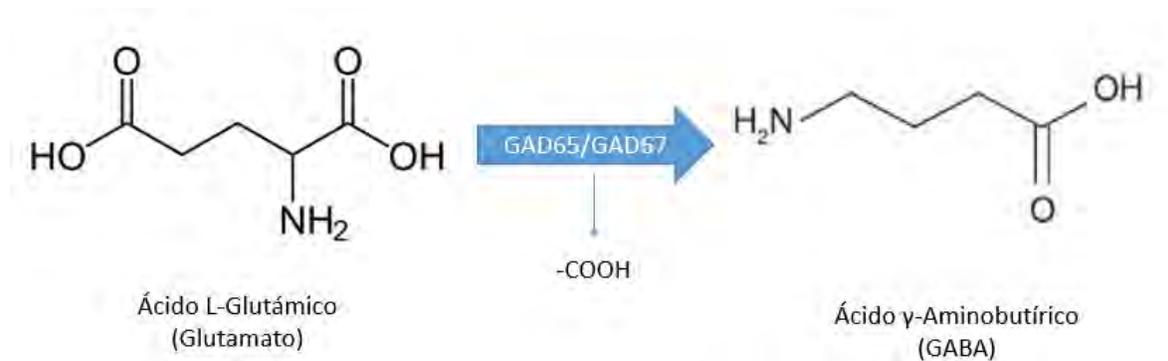


Figura 1.1.- Reacción química de la síntesis de GABA por la descarboxilaza del ácido glutámico (GAD65/GAD67).

La liberación de GABA en la hendidura sináptica ocurre como consecuencia de la despolarización de la terminal presináptica y puede ser por un mecanismo de exocitosis dependiente de Ca^{2+} o bien por liberación tónica (Kandel, 2013). El GABA liberado al **espacio sináptico** se une a sus **receptores específicos**. Después de activar a los receptores a GABA, el neurotransmisor es recapturado por transportadores GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1, todos ellos expresados tanto en neuronas como en las células gliales (Kandel, 2013; Purves, 2004) (Figura 1.2).

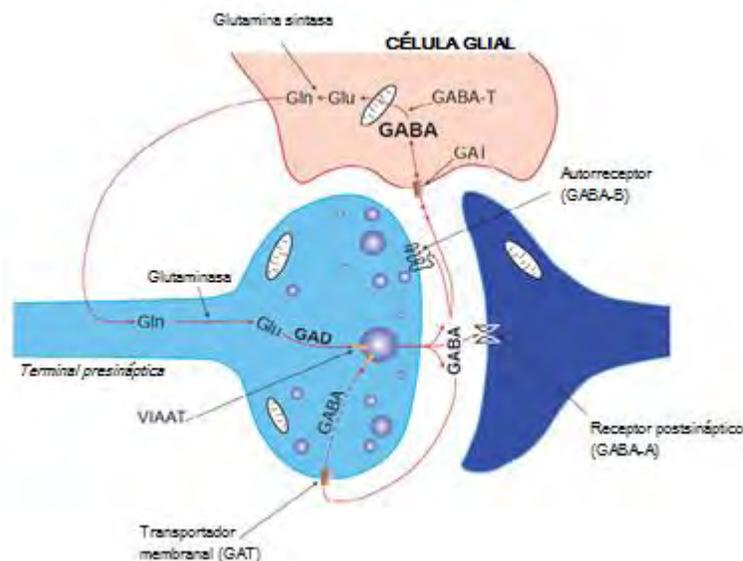


Figura 1.2.- Representación esquemática de la transmisión GABAérgica. La enzima GAD sintetiza GABA a partir del ácido L-Glutámico (Glu). El GABA es incorporado a vesículas utilizando transportadores vesiculares específicos (VIAAT). Al ocurrir una despolarización de la terminal presináptica, el GABA es liberado al espacio sináptico y activa receptores tanto en la pre como en la postsinapsis. Posteriormente los transportadores (GAT) ubicados en la terminal presináptica o en la célula glial remueven al neurotransmisor del espacio sináptico. El GABA es metabolizado y puede incorporarse al Ciclo de Krebs en la mitocondria, sintetizándose glutamina (Gln) para su exportación

y reciclaje de nuevo hacia la terminal presináptica donde de nuevo se sintetiza al ácido L-Glutámico para iniciar el ciclo (modificada de Purves, 2004).

1.2 Receptores a GABA.

Los receptores a GABA se dividen en GABA_A y GABA_B. Los receptores GABA_A son **de tipo ionotrópico, con un poro permeable al ión Cl⁻** y de los cuales se conocen 19 subunidades (**α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ρ 1-3, ϵ , π y θ**) (Kandel, 2013). Cada subunidad GABA_A posee cuatro pases transmembranales, con los grupos amino (N-terminal) y carboxilo (C-terminal) **en la parte extracelular, formando heteropentámeros para un receptor funcional** y cuyas regiones TM-2 forman el canal permeable a Cl⁻ (Bormann, 1998; Bormann, 2000) (Figura 1.3). Los receptores GABA_A **también son blancos de acción de fármacos de gran relevancia clínica como son los barbitúricos o las benzodiazepinas, ampliamente utilizados en trastornos psiquiátricos (por ejemplo, trastornos de ansiedad)** (Bormann, 1998; Bormann, 2000; Kandel, 2013; Purves, 2004).

Por otra parte, los receptores GABA_B **son de tipo metabotrópico, por lo que se encuentran acoplados a una proteína G en su parte intracelular, la cual regula la apertura de canales de K⁺ que modulan la excitabilidad neuronal al hiperpolarizar la postsinapsis (Kandel, 2013; Purves, 2004), además de modular también el cierre de canales de Ca²⁺ en las terminales presinápticas, disminuyendo la liberación de**

neurotransmisor (Isaacson, 1998). Los receptores GABA_B se conforman por las subunidades R1 y R2, que poseen siete segmentos transmembranales y forman heterodímeros entre ellas.

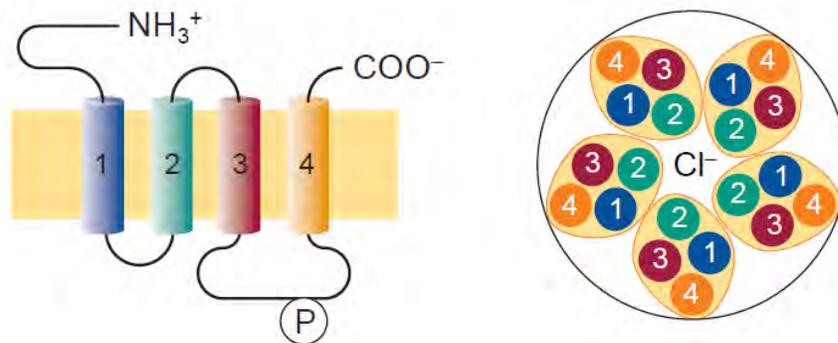


Figura 1.3.- **Representación esquemática de la estructura de las subunidades** que componen al receptor GABA_A. A la izquierda se pueden apreciar los cuatro pases transmembranales, con la N-terminal y C-terminal en el espacio extracelular, además de un sitio de modulación intracelular por proteína cinasa A (PKA). A la derecha se observa el arreglo pentamérico de las subunidades. Nótese cómo los dominios transmembranales (TM-2) forman el poro permeable al ión Cl⁻ (tomada de Borman, 1998).

1.3 El Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB).

El Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide (MNTB, por sus siglas en inglés) forma parte de la vía auditiva como parte del Complejo Olivar Superior (SOC), localizado en el tallo cerebral a la altura del puente y cuyos núcleos sirven como relevos

organizados por escala de frecuencias (tonotopía) provenientes de estructuras previas (oído interno, núcleo coclear) (Figura 1.3) (Kuwabara & DiCaprio1991; Masterton, 1967; Rees & Palmer, 2010).

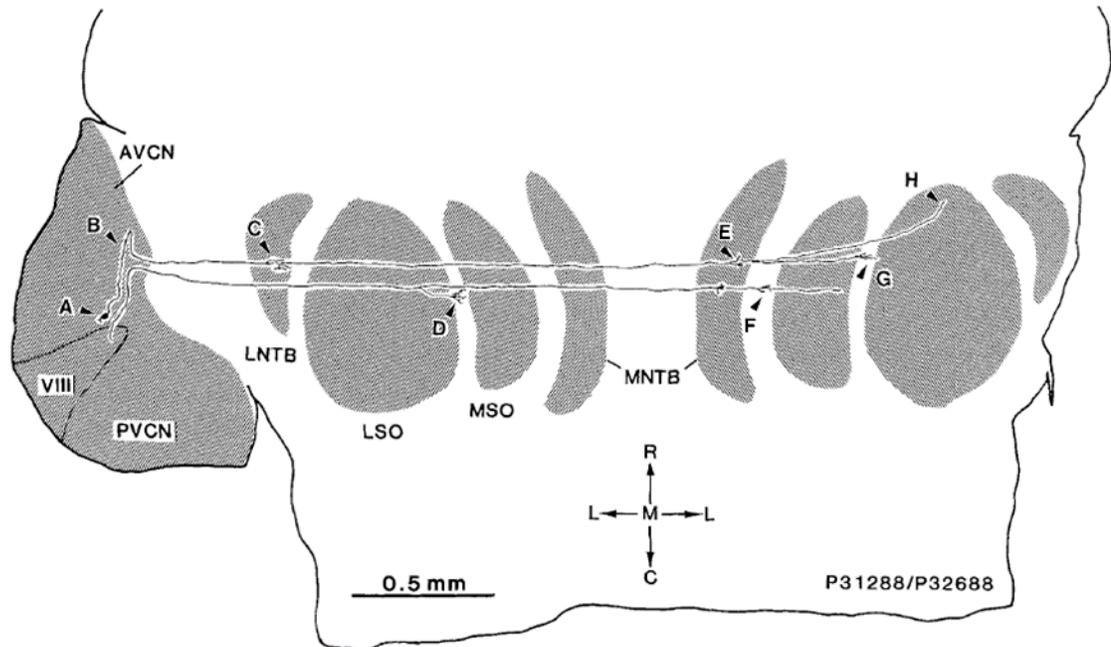


Figura 1.3- Organización anatómica de los núcleos del Complejo Olivario Superior en un esquema que representa un corte horizontal, visto desde la zona ventral del puente del ratón. Se pueden apreciar las aferencias desde las diferentes zonas del Núcleo Coclear (AVCN/PVCN) hacia los núcleos olivares, notando el cruce de la vía contralateralmente para llegar al MNTB. (Esquema tomado de Kubawara & DiCaprio, 1991)

El sistema auditivo requiere de una organización particular para la localización de sonidos de frecuencias e intensidades que le permitan a cada especie su adaptación. Así, en el ser humano se tiene un rango de frecuencias que va de 20Hz

a 20KHz, con una tolerancia de cercana a **90 dB de intensidad**, en cuyo límite inicia la percepción de intensidades que pueden resultar dolorosas (Rees & Palmer, 2010; Willot, 2001). Por otra parte, especies como el ratón poseen un rango de frecuencias que alcanzan sonidos ultrasónicos (hasta 50 KHz), sin embargo, la vía auditiva es funcional hasta el día postnatal 12 (P12), cuando el canal auditivo se abre y los sonidos pueden ser procesados (Kim & Kandler 2003; Saliu et al. 2013; Willot, 2001).

El MNTB del ratón comienza su desarrollo aproximadamente en el día embrionario 15 (E15) y alcanza su organización tonotópica significativa entre los días P5 y P9 (Kim & Kandler, 2003), previo a la apertura del canal auditivo en P12. Esto sugiere que los procesos de maduración y diferenciación de la vía auditiva ocurre por un refinamiento sináptico que debe concluirse antes de que la vía sea usada (Kim & Kandler, 2003; Saliu et al., 2013). Además, se ha observado que la tasa de proliferación celular en el ratón es mayor alrededor del día P10, muy cercano a la edad de la apertura del canal auditivo y comparativamente mayor con respecto a edades menores (P0) e incluso posteriores (P15), cuando la audición ya es completamente funcional (Saliu et al., 2014) (Figura 1.2).

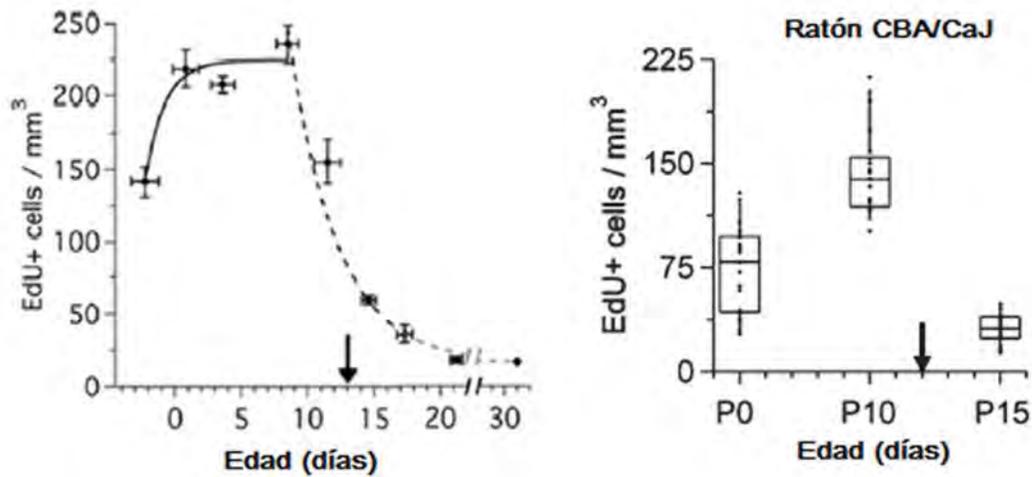


Figura 1.4.- Patrones de proliferación celular en el MNTB. Se ejemplifica la línea del desarrollo de la proliferación celular en el MNTB de la rata (gráfica de la izquierda) comparada con el ratón (gráfica de la derecha) mediante el uso del marcador de proliferación celular análogo de timidina 5-etilnil-2'deoxiuridina (EdU). Se puede observar en ambas especies que el pico máximo de proliferación celular se encuentra en el día postnatal 10 (P10) y que en edades previas y posteriores la tasa es menor. Las flechas en ambas gráficas indican el momento de la apertura del canal auditivo para ambas especies. (Tomada y modificada de Sallu et al., 2014).

El MNTB cumple una función inhibitoria con respecto a las eferencias que proyecta, con la finalidad de contribuir a la localización de los sonidos (Masterton, 1967). Recibe aferencias directas de las células en racimo de la zona ventral del núcleo coclear contralateral (VCN) de tipo excitatorio, hacia los somas de sus células principales formando una sinapsis axosomática muy particular, que en mamíferos se conoce como la sinapsis del Cáliz de Held (CoH) (Figura 1.5) (Rees & Palmer, 2010; Schneggenburger & Forsythe, 2006). El soma de las células principales del

MNTB contiene primordialmente receptores glutamatérgicos tipo AMPA (Borst et al., 1995); la zona terminal del axón envuelve al soma de una sola célula principal (Figura 1.5); en este contacto se pueden localizar múltiples zonas activas que permiten una alta eficacia en la transmisión de estímulos de altas frecuencias. (Borst et al., 1995; Rees & Palmer, 2010; Schneggenburger & Forsythe, 2006)

La sinapsis del Cáliz de Held requiere de un alto costo energético para la eficiencia de la transmisión de altas frecuencias, siendo posible gracias a los llamados complejos adherentes asociados a mitocondrias (MAC), conformados por las mismas mitocondrias, complejos vesiculares y zonas de adherencia. En algunos núcleos del Complejo Olivario Superior se han encontrado terminales post sinápticas con MACs, pero en particular las terminales axónicas hacia el MNTB contienen una mayor cantidad de ellos en sus zonas activas (Rowland et al., 2000).

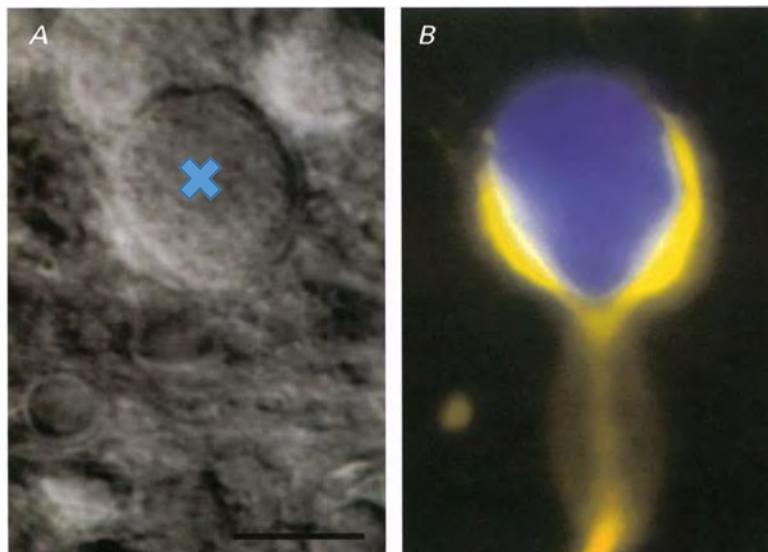


Figura 1.5.- **A) Microfotografía por Contraste Diferencial de Interferencia, donde se aprecia el soma de una célula principal del MNTB (cruz). B) Microfotografía de fluorescencia donde se aprecia el soma de la célula principal tomada A (Azul/Cascade Blue) y un Cáliz de Held de la terminal axónica de una célula en racimo (Amarillo/Lucifer Yellow).** (Barra de calibración 10 μ m, modificada de Borst et al., 1995).

Las neuronas principales del MNTB proyectan sus axones directamente a la oliva lateral superior ipsilateral con una sinapsis inhibitoria (principalmente glicinérgica, cuando la vía es madura) (Kim & Kandler, 2003), lo que genera que los estímulos de ese plano se inhiban y permitan que la diferencia en el retraso del tiempo entre un oído y otro ubique la fuente del sonido (Rees & Palmer, 2010).

Adicional al contacto glutamatérgico proveniente del Cáliz de Held, las células principales también reciben contacto de tipo GABAérgico, mismo que podría provenir de las colaterales de interneuronas que podrían surgir del mismo MNTB en su zona ventral (VNTB, Figura 1.6) (Kuwabara & DiCaprio, 1991), aunque también se ha propuesto que las aferencias GABAérgicas podrían surgir en el núcleo coclear (Raza et al., 1994) o en algún otro núcleo dentro del Complejo Olivar Superior, como la Oliva Media Superior (MSO) (Adams & Mugnaini, 1990).

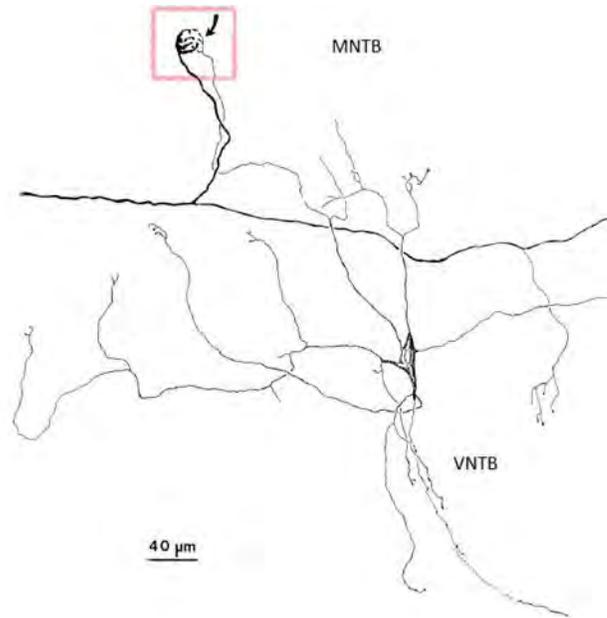


Figura 1.6.- **Representación esquemática** de una colateral proveniente de la zona ventral del Cuerpo Trapezoide (VNTB) hacia el MNTB y su contacto con uno de los Cálices (Recuadro rojo) (Tomada de Kuwabara & DiCaprio, 1991).

La transmisión inhibitoria en el MNTB varía en el desarrollo entre la transmisión glicinérgica y la GABAérgica (Awatramani et al., 2004). Estudios electrofisiológicos realizados en las células principales mostraron que las respuestas registradas entre P5 y P7 corresponden principalmente a GABA y no a glicina, cuando los receptores glutamatérgicos son bloqueados; las respuestas a esta edad producen una despolarización debido a que la concentración de Cl^- intracelular es mayor en la célula que en la edad adulta. Posteriormente (P13-P15) la transmisión glicinérgica se incrementa gradualmente superando a la GABAérgica, inmediatamente después

de la apertura del canal auditivo, edad a partir de la cual la transmisión glicinérgica predomina (Awatramani et al, 2004) (Figura 1.5).

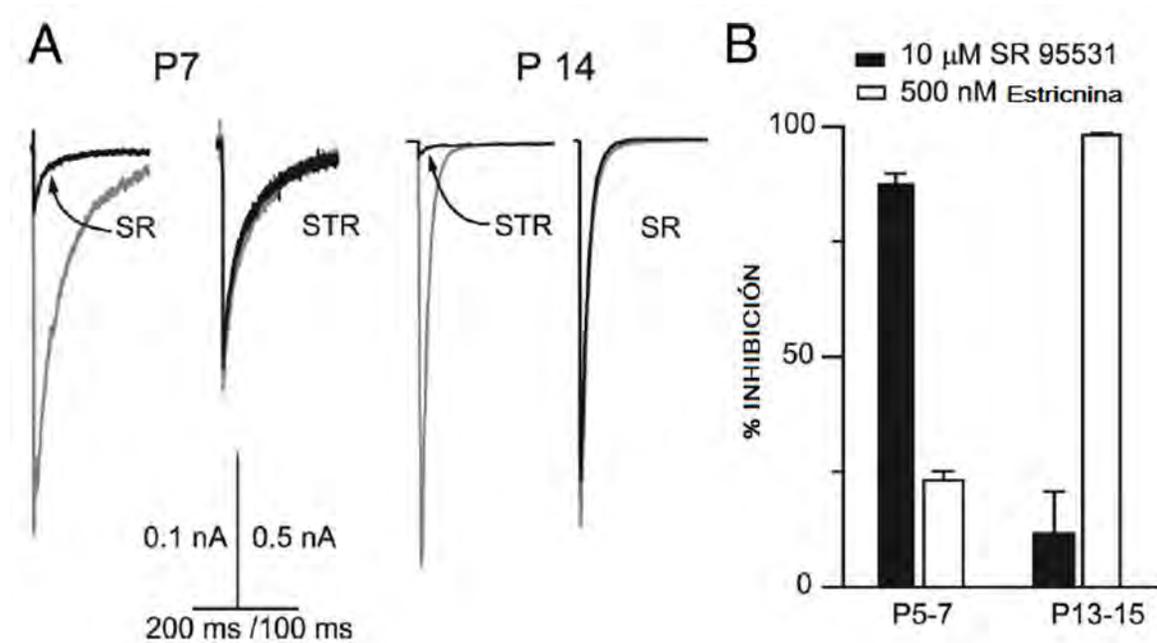


Figura 1.7.- Corrientes inhibitorias postsinápticas en células principales del MNTB. A) Registros de corrientes evocadas en presencia de antagonistas glutamatérgicos. El componente glicinérgico se identificó con la aplicación extracelular de SR 95531 (10 μ M, antagonista específico a receptores GABA_A), mientras que la aplicación extracelular de estriquina permitió identificar el componente GABAérgico (STR, 500nM, antagonista específico a receptores de glicina). En P7 se observa que la respuesta total (registro en gris) se inhibe principalmente con SR 95531, pues la estriquina no tiene un efecto significativo en la corriente evocada; sin embargo, en P14 la estriquina antagoniza significativamente la respuesta, lo que indica una mayor contribución del componente glicinérgico. B) Resumen del efecto observado en los registros electrofisiológicos mediante el uso de los antagonistas a GABA y glicina (Modificada de Awatramani et al., 2004).

1.4 Astrocitos en el MNTB.

Los astrocitos son células macrogliales, de origen ectodérmico similar al de las neuronas (Kettenmann & Ransom, 2013).

Forman parte de la barrera hemato-**encefálica y establecen contacto directo con los vasos sanguíneos**, de los cuales incorporan nutrientes que son suministrados a las **neuronas y otras células nerviosas por medio de transportadores especializados para lactato (Magistretti, 2006; Rouach et al., 2008), siendo los MCT1 y MCT4 específicos de astrocitos, los cuales acarrean lactato, piruvato y cuerpos cetónicos a la célula (Suzuki et al., 2011).**

Los astrocitos pueden formar redes por medio de uniones comunicantes compuestas de conexinas (Cx), siendo las Cx40 y Cx 43 propias de astrocitos (Ezan et al., 2012).

Los astrocitos pueden ser identificados por la expresión de la proteína ácido gliofibrilar (GFAP) que es específica del citoesqueleto de esta célula glial (Eng et al. 1971; Eng et al., 1985; Eng et al., 2000).

La participación de los astrocitos en la sinapsis tripartita es fundamental para la modulación de la actividad sináptica a través de la liberación de gliotransmisores. Adicionalmente, los astrocitos **se encargan de la remoción de iones como el potasio (K⁺) y el sodio (Na⁺), además de ser elementos clave en la recaptura de los**

neurotransmisores liberados al espacio sináptico (Araque et al, 1999; Hennenberger et al, 2010; Newman, 2003; Panatier & Theodosis, 2006).

Los astrocitos son células excitables, aunque no producen potenciales de acción (Kettenmann, 1984; Reyes-Haro et al., 2014). Al igual que las neuronas, los astrocitos expresan receptores a **neurotransmisores clásicos** como el glutamato, la dopamina, el GABA y el ATP (Kettenmann, 1984; Kettenmann 1985).

Estudios **electrofisiológicos y farmacológicos** realizados en cultivos primarios de astrocitos reportaron que **la aplicación extracelular de GABA produce una despolarización que contrasta con el** efecto hiperpolarizante que se observa en las neuronas (Kettenmann, 1984). **Adicionalmente la estimulación con GABA produce** oscilaciones de Ca^{2+} en astrocitos que se propagan a astrocitos vecinos por la **estimulación de receptores tanto $GABA_A$ como $GABA_B$, al activar canales de Ca^{2+} o bien, por la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares, promoviendo la liberación de gliotransmisores para modular la actividad neuronal** (Nilsson et al., 1993).

El efecto despolarizante del GABA sobre los astrocitos se debe a que la **concentración intracelular del ión Cl^- es aproximadamente 10 veces más alta que** en las neuronas (35 mM vs 3-5 mM, respectivamente), lo que genera un potencial de equilibrio para el Cl^- menos negativo que en las neuronas (-40mV vs -70mV, respectivamente) (Kandel, 2013; Kettenmann & Ransom, 2013). La diferencia entre

la concentración del Cl^- entre el espacio extracelular e intracelular genera que esta Cl^- se movilice por su gradiente electroquímico al exterior de la célula (Kettenmann, 1984), lo que produce la despolarización por GABA.

En relación a la vía auditiva, en regiones cercanas al MNTB como lo es la oliva lateral superior (LSO) se demostró que los astrocitos responden a la aplicación extracelular a GABA (Stephan & Friauf, 2014). Los registros electrofisiológicos en astrocitos mostraron que el GABA produce corrientes despolarizantes.

La relación funcional entre los astrocitos y las células principales del MNTB en la sinapsis del **cáliz de Held** fue descrita previamente (Reyes-Haro et al., 2010).

Los astrocitos mantienen un contacto muy cercano con la sinapsis del cáliz de Held, en sitios vecinos a las zonas activas (pero sin formar una sinapsis con las neuronas), además de que en algunas ocasiones un mismo astrocito podía tener contacto con más de un cáliz (Figura 1.8) (Reyes-Haro et al, 2010).

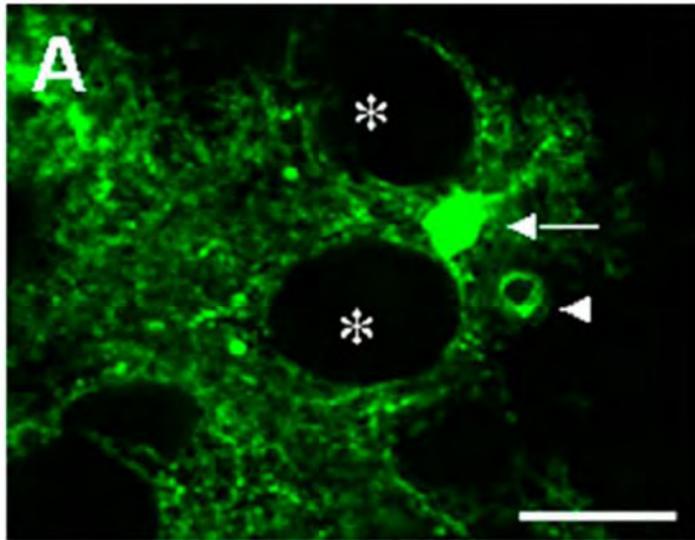


Figura 1.8.- Astrocito GFAP+ del MNTB de un ratón transgénico GFAP-eGFP (flecha). Se observa que un solo astrocito contacta con más de una neurona postsináptica (asteriscos) por medio de sus procesos, al mismo tiempo que tiene contacto con un vaso sanguíneo (cabeza de flecha) (Tomada de Reyes-Haro et al., 2010; barra de calibración, 20 μm).

Los registros **electrofisiológicos** permitieron identificar un perfil de corriente distintivo para las neuronas y los astrocitos. En neuronas al utilizar **la técnica de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa**, se registraron corrientes de Na^+ . Para ello se aplicaron pulsos de voltaje despolarizantes que favorecían la apertura de canales de Na^+ dependientes de voltaje, implicados en la generación de los potenciales de acción. Por otra parte, los registros de los astrocitos mostraron un perfil de corriente pasivo, esto debido a que los astrocitos forman un sincicio a través

de uniones comunicantes lo que deriva en una red astrocítica de gran tamaño que imposibilita la fijación del voltaje de una sola célula. (Reyes-Haro et al., 2010).

También se reportó que los astrocitos expresan receptores (tipo AMPA) y transportadores (D-aspartato) funcionales a glutamato. Se registraron corrientes entrantes con **la aplicación de agonistas a AMPA y D-aspartato**, confirmando esa **relación funcional al aplicar los antagonistas específicos (CNQX y TBOA**, respectivamente) (Reyes-Haro et al., 2010).

Por otra parte, las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular juegan un papel fundamental en **la actividad espontánea de los astrocitos**. Las mediciones de calcio intracelular se realizaron en los astrocitos del MNTB utilizando al Fluo - 4AM, un indicador fluorescente que permite registrar el incremento de calcio **intracelular**. **La excitación de los astrocitos produjo la liberación de gliotransmisores como el glutamato y/o la D-serina**, mismos que eran detectados por los receptores NMDA extrasinápticos expresados en las neuronas principales del MNTB (Reyes-Haro et al., 2010). Esta **vía de señalización se** expresa durante el desarrollo del sistema auditivo y **podría ser determinante para que la plasticidad de esta vía se lleve a cabo de manera adecuada** (Kim et al., 2003; Reyes-Haro et al., 2010).

ANTECEDENTES

2.1 Receptores a GABA en el MNTB.

Las neuronas principales del MNTB expresan fundamentalmente receptores a glutamato tipo AMPA (Borst et al., 1995), por lo que la sinapsis del cáliz de Held se describe generalmente como glutamatérgica.

Sin embargo, también existen estudios que han descrito la expresión de receptores a GABA en el MNTB (Campos et al., 2001; Isaacson, 1998; Reyes-Haro, 2013; Takahashi et al., 1998). En particular, estudios de hibridación *in situ* demostraron la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ en neuronas principales del MNTB (Campos et al., 2001). Adicionalmente, estudios de inmunofluorescencia, RT-PCR, Western blot y registros electrofisiológicos reportaron la expresión funcional de las subunidades GABA_A en las neuronas principales del MNTB (Reyes-Haro et al., 2013).

Por otra parte, estudios electrofisiológicos y farmacológicos demostraron la expresión funcional de receptores GABA_B en las terminales presinápticas del cáliz de Held del MNTB (Isaacson et al., 1998; Takahashi et al., 1998). La activación de los receptores GABA_B (utilizando baclofen como agonista) produce una inhibición en las corrientes de Ca²⁺ en la terminal axónica, con una subsecuente disminución en la liberación vesicular de glutamato (Isaacson et al., 1998; Takahashi et al., 1998)

2.2 GABA ρ en el MNTB.

Una subunidad muy particular de los receptores GABA $_A$ es la subunidad GABA ρ (rho).

Esta subunidad comprende tres variantes y presenta ciertas características, como la capacidad de formar homopentámeros funcionales con propiedades farmacológicas distintas a los receptores GABA-A clásicos (Cutting et al., 1991; Polenzani et al., 1991).

La expresión funcional de los receptores GABA ρ se describió inicialmente en interneuronas de la médula espinal del gato (Johnston et al., 1975). El ácido 4-*trans*-aminocriotónico (TACA, fármaco análogo a GABA) producía una respuesta de desensibilización rápida, característica de las subunidades GABA $_A$ clásicas (respuesta que es además sensible al bloqueo por el antagonista clásico, bicuculina). Por otra parte, el ácido 4-*cis*-aminocriotónico (CACA, fármaco análogo a GABA y agonista selectivo a las subunidades GABA ρ) evocaba una respuesta de desensibilización lenta que no era antagonizada por bicuculina (Johnston et al., 1975).

La caracterización electrofisiológica y farmacológica de los receptores GABA ρ se realizó en ovocitos de *Xenopus laevis*, inyectando mRNA aislado de la corteza cerebral y la retina de bovino (Woodward et al., 1993). Los ovocitos inyectados con el mRNA de la retina expresaron **receptores funcionales con una respuesta rápida**

y una desensibilización lenta ante la aplicación extracelular de GABA, además de una respuesta poco eficiente ante la aplicación extracelular de bicuculina con respecto a la aplicación del agonista específico a GABA ρ , CACA. La aplicación extracelular de baclofen o faclofen (agonista y antagonista GABA β , respectivamente) no generó ninguna respuesta en el ovocito. Lo anterior indica que la retina expresaba un receptor funcional con características distintas a los receptores GABA-A y GABA-B (Woodward et al., 1993).

Las subunidades GABA ρ se expresan en distintas regiones del SNC. La expresión funcional de GABA ρ ocurre en células bipolares de la retina, neuronas de la corteza visual, hipocampo, amígdala o el cerebelo, por mencionar algunas (Harvey et al., 2003; Lukasiewicz et al., 1994; Rosas-Arellano et al., 2011; Wegelius et al., 1998). Los estudios que demostraron la expresión de GABA ρ en estas regiones incluyeron experimentos de Western blot, inmunofluorescencia, hibridación *in situ*, RT-PCR y registro electrofisiológico (Figura 2.1).

Diversos estudios demostraron que la expresión de las sub unidades GABA ρ se presenta en regiones específicas del SNC durante el desarrollo. Un ejemplo es la expresión en el hipocampo y el colículo superior, donde se puede observar que la subunidad GABA ρ 2 mantiene una expresión constante en ambas regiones, pero la expresión de GABA ρ 3 tiene picos de expresión determinados (alrededor de P7 para ambas regiones) (Alakuijala et al., 2005).

Por otra parte, los receptores GABA_ρ que se expresan en las células bipolares de la retina juegan un papel importante en la temporalidad de la inhibición dirigida a las células ganglionares con las que tienen contacto, siendo la retina un sitio donde la expresión de las tres subunidades GABA_ρ se mantiene constante (Lukasiewicz et al., 1994).

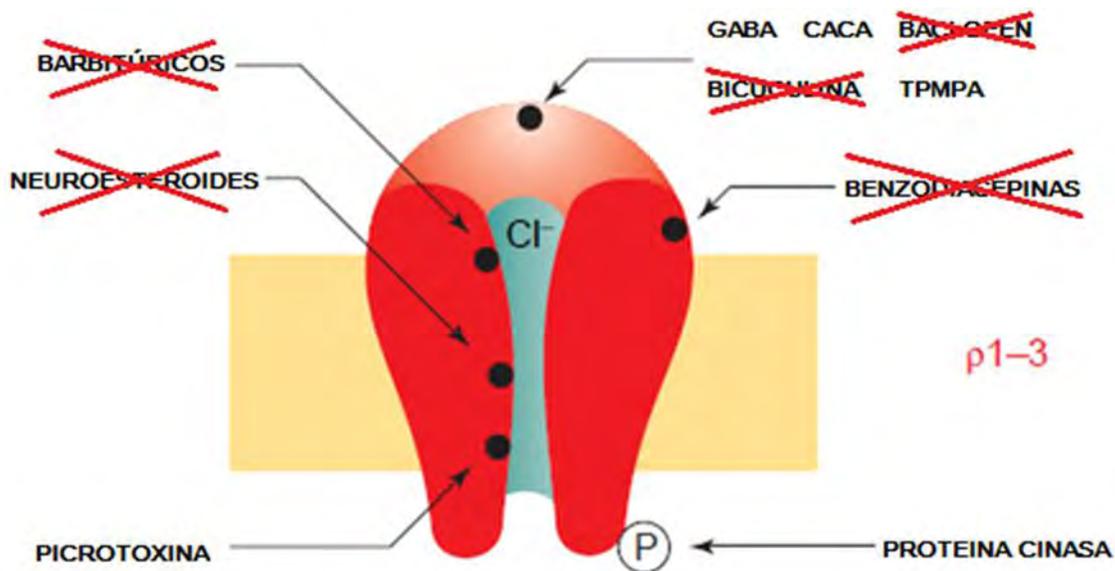


Figura 2.1.- Representación esquemática del receptor GABA_ρ. Se ilustra el sitio de unión para GABA, además de la acción de su agonista específico (CACA) y antagonista específico (TPMPA), picrotoxina y el sitio intracelular de la acción de la PKA (modulación de la tasa de endocitosis del receptor). Las leyendas tachadas indican la ausencia de sitios de unión a diferentes sustancias que tienen efecto en las subunidades GABA_A clásicas (modificada de Bormman et al., 2000).

La expresión funcional de $GABA_{\rho}$ ocurre también en el MNTB (Reyes- Haro, et al., 2013). Los estudios electrofisiológicos demostraron que las células principales del MNTB responden a GABA con una corriente que presenta dos componentes: uno de rápida desensibilización antagonizado por gabazina (antagonista selectivo de los receptores $GABA_A$) y otro de desensibilización lenta, antagonizado por TPMPA (antagonista selectivo de $GABA_{\rho}$) (Figura 2.2). Ambos componentes eran eliminados cuando se co-aplicaban los antagonistas (Reyes-Haro et al., 2013).

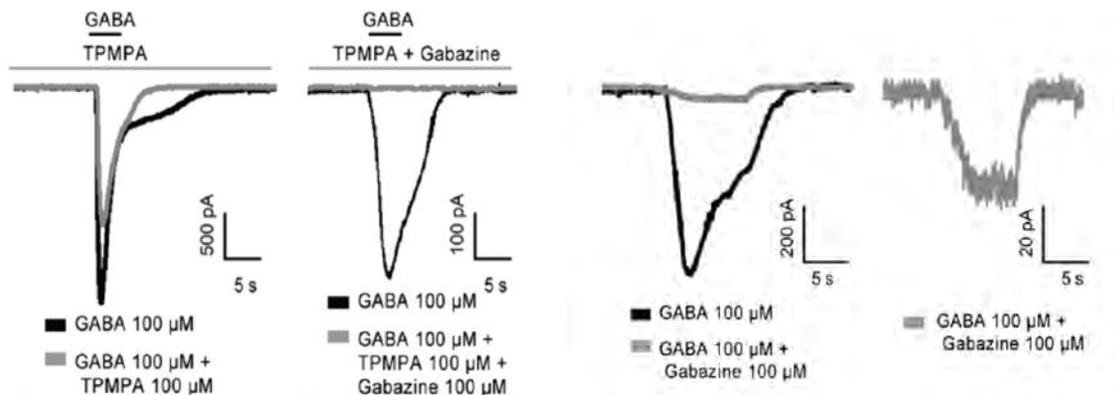


Figura 2.2.- Registros electrofisiológicos de neuronas del MNTB. De izquierda a derecha: Aplicación de GABA (100 μ M) + antagonista selectivo de $GABA_{\rho}$ (TPMPA, 100 μ M) \rightarrow El componente de desensibilización lenta desaparece ante la aplicación extracelular de TPMPA. Aplicación de GABA (100 μ M) + TPMPA (100 μ M) + antagonista selectivo $GABA_A$ (gabazina, 100 μ M) \rightarrow La respuesta total a GABA se elimina cuando ambos antagonistas son co-aplicados. Aplicación de GABA (100 μ M) + gabazina (100 μ M) \rightarrow la mayor parte de la amplitud de la corriente inducida por el GABA se ve abolida, sin embargo se observa un pequeño remanente con una desensibilización lenta (registro ampliado en el extremo derecho de la figura). (Tomada de Reyes-Haro et al, 2013).

Estos experimentos indican la expresión funcional de receptores GABA_A en las células principales del MNTB, además de la presencia de un componente que no presenta desensibilización y es antagonizado por TPMPA.

Para comprobar su expresión, se realizaron estudios de RT-PCR en las edades en las que se realizaron los registros (P9) y en una edad adulta (30g de peso) (Figura 2.3). Se observó que la expresión de GABA_ρ3 ocurría en P9 mientras que las otras dos subunidades no se expresaban. Este patrón de expresión se invertía en el adulto, pues las subunidades GABA_ρ1 y GABA_ρ2 se expresaban mientras que la expresión de GABA_ρ3 no ocurría más. Finalmente, para corroborar esta información se realizaron estudios de inmunohistofluorescencia para las tres subunidades en ratones de edad P9 y adultas (más de 30g de peso). Los resultados confirmaron que la expresión de GABA_ρ3 solo ocurría en P9, mientras que la expresión de GABA_ρ1 y GABA_ρ2 se presentaba solamente en el adulto (Reyes-Haro, 2013).

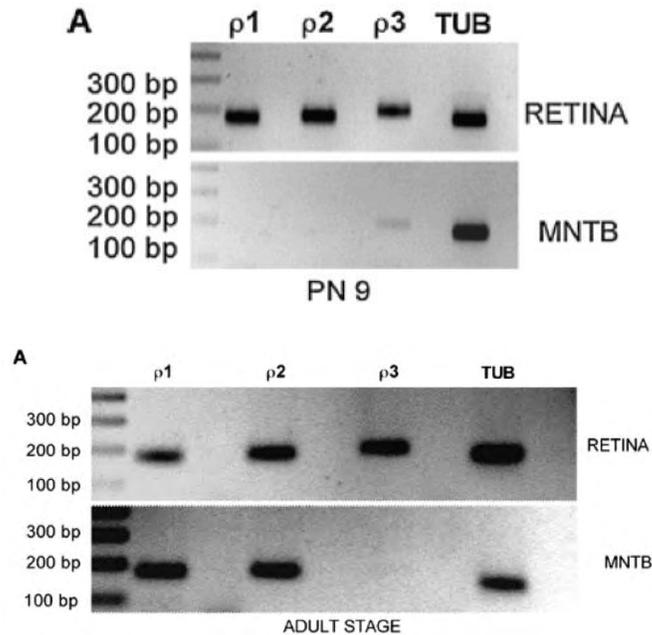


Figura 2.3.- RT-PCR de las tres subunidades GABA ρ en el MNTB. Se aprecia el patrón de expresión dependiente de la edad y se observa solamente la expresión de GABA ρ 3 en P9. En el ratón adulto sólo se expresan GABA ρ 1 y GABA ρ 2. (Tomada de Reyes-Haro et al., 2013).

Los datos sugieren que GABA ρ 3 se expresa previo a la apertura del canal auditivo (P12), mientras las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2 se expresarían cuando la audición es funcional (Reyes-Haro et al., 2013). La expresión y el patrón de cambio de estas subunidades en células gliales del MNTB se desconoce por el momento.

2.3 GABA ρ en astrocitos.

Estudios recientes reportaron la expresión funcional de GABA ρ en astrocitos mediante diversas técnicas como hibridación *in situ*, RT-PCR,

inmunohistofluorescencia, registros electrofisiológicos, entre otras. Por inmunohistofluorescencia se identificó la expresión de GABA ρ 1 en cultivos primarios de astrocitos del cerebelo (Martínez-Delgado et al., 2011), además de demostrar su expresión *in situ* en la glía ependimal del cerebelo de ratón y los astrocitos de la capa granular (Figura 2.4) (Reyes-Haro et al., 2013B; Pétriz et al., 2014).

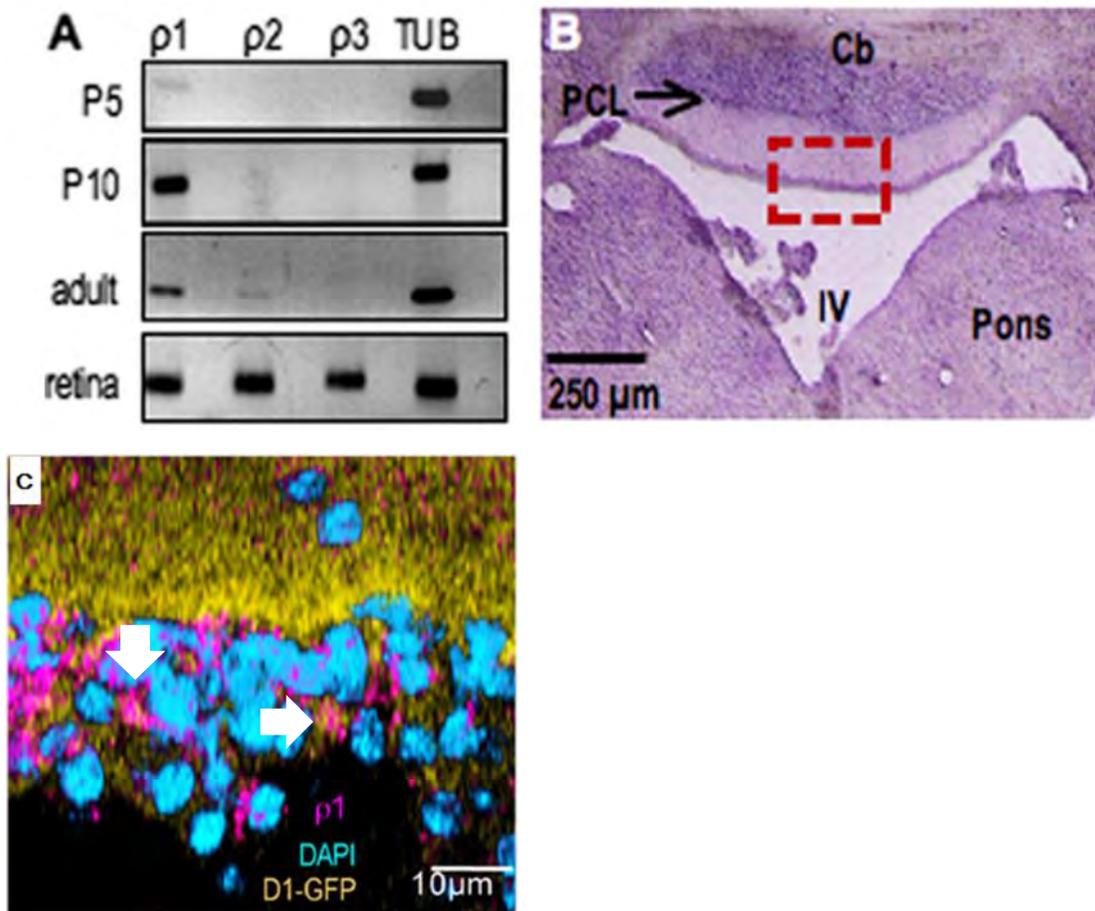


Figura 2.4.- Expresión de GABA ρ 1 en la glía ependimal del cuarto ventrículo. A) Mediante RT-PCR se puede observar la expresión del mRNA en P5, P10 y la edad adulta, con una tenue banda de expresión de la subunidad GABA ρ 2 en el adulto. B) Hibridación In situ que ilustra la expresión de

GABA_p1 en la lámina de la capa granular externa del cerebelo adyacente al cuarto ventrículo (rectángulo rojo), así como en la capa de células de Purkinje (PCL). C) Inmunofluorescencia en el ratón transgénico D1-GFP, donde cierta población de la glía ependimal del cerebelo, cercana al cuarto ventrículo (amarillo, D1-GFP) colocaliza (flechas blancas) con el inmunomarcaje a GABA_p1 (magenta) (Tomada de Reyes-Haro et al., 2013B).

Esto abre la posibilidad de que los astrocitos de otras áreas del cerebro presenten una expresión funcional de las sub unidades GABA_p.

JUSTIFICACIÓN

La expresión funcional de la subunidad GABA ρ 3 se presenta en las neuronas principales del MNTB del ratón previo a la apertura del canal auditivo, posteriormente, en el estadio adulto, la expresión de GABA ρ 3 es sustituida por GABA ρ 1 y GABA ρ 2 (Reyes-Haro et al., 2013). Sin embargo, se desconoce el curso temporal de la expresión de GABA ρ 3 durante el desarrollo postnatal temprano del MNTB. Adicionalmente, existe evidencia de que los astrocitos de la vía auditiva responden electrofisiológicamente a la aplicación extracelular de GABA (Stephan & Friauf, 2014). Tomando estos antecedentes en cuenta, planteamos que los astrocitos del MNTB podrían expresar receptores del tipo GABA-A que incluyan la expresión de la subunidad GABA ρ 3 en un periodo específico del desarrollo postnatal.

HIPÓTESIS

La expresión de la subunidad GABA ρ 3 ocurre en etapas tempranas del desarrollo postnatal, previo a la apertura del canal auditivo.

Los astrocitos del Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide del ratón expresan la subunidad GABA ρ 3 en etapas tempranas del desarrollo postnatal.

OBJETIVO

Principal

Investigar si la subunidad GABA ρ 3 se expresa durante el desarrollo postnatal y si los astrocitos expresan esta subunidad en el MNTB.

Particulares

- **Investigar si la expresión del mRNA de la subunidad GABA ρ 3 ocurre durante el desarrollo postnatal del ratón, previo y posterior a la apertura del canal auditivo (P12).**
- **Investigar si la densidad de células GABA ρ 3+ cambia durante el desarrollo postnatal del ratón, previo a la apertura del canal auditivo (P9), durante (P12) y posteriormente (P18), cuando la vía auditiva es funcional.**
- **Investigar si la expresión de la subunidad GABA ρ 3 ocurre en astrocitos del MNTB durante el desarrollo postnatal del ratón (P9, P12 y P18).**

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos se realizaron **siguiendo las normas éticas del Instituto de Neurobiología, U.N.A.M.**

INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

La expresión de la subunidad GABA α 3 se investigó en el MNTB de ratones de la **cepa transgénica GFAP-eGFP** (sin importar sexo), en las edades P9 (n=5), P12 (n=3) y P18 (n=3). Los animales se perfundieron intracardiamente con buffer de **fosfatos (PBS, 0.1M, pH 7.4) y solución de fijación (Paraformaldehido, 4% en PBS 0.1M, pH 7.4)**. Los cerebros fueron aislados y crioprotegidos en gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%). Se obtuvieron cortes coronales de tallo cerebral que **contenían el MNTB (40 μ m) en criostato (Leika)**.

Para la identificación del MNTB se siguieron varios criterios: uso de guía estereotáctica (Bregma: -4,96 - -5,68 mm, antero-posterior) (Franklin, 2008), observando en la vista más anterior el inicio del Colículo Inferior y en la vista más posterior el inicio del 4° ventrículo. Además, la observación en microscopio de luz por la técnica de contraste de fases permitió identificar los somas de las células principales en la región ventral – central.

Los cortes seleccionados se lavaron (dos ocasiones, 10 minutos c/u) con PBS 0.1M y se incubaron en suero de bloqueo (Suero de Burro, 1:50 en PBS) durante una

hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron a 4°C durante 48 horas con el anticuerpo primario (rabbit anti-GABA ρ 3 (1:100) [Santa Cruz Biotechnology]) en Tween20 0.3%. Los cortes fueron lavados nuevamente en dos ocasiones con PBS 0.1M y a continuación se incubaron por una noche a 4°C en el anticuerpo secundario biotinilado Anti-Rabbit IgG (1:500) [Vector Labs] en Tween20 0.3%. Mediante el protocolo de revelado Biotina – Avidina, el tejido se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con Texas Red Avidin D (1:500; **Excitación: 595nm/Emisión: 606nm**) [Vector Labs]. Al final, se realizó una contratinción para **núcleos** celulares utilizando 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole Dilactato (DAPI, 1:5000) [Invitrogen] **45 minutos a temperatura ambiente (Excitación: 358nm/Emisión: 461nm)**.

Los cortes fueron montados en portaobjetos con el medio de montaje para fluorescencia Vectashield [Vector Labs].

Para la captura de imágenes se utilizó microscopía confocal (Zeiss, LSM780), utilizando láseres de excitación de 561nm para Texas Red, 488nm para GFP y Chamaleon 358nm para DAPI.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR)

Se utilizaron ratones CD-1 (n=5, por grupo; tres repeticiones) de distintas edades (P3, P9, P12, P18, P30, P60), los cuales fueron anestesiados y decapitados para obtener el tallo cerebral y los globos oculares (retina). Los tejidos se sumergieron en solución salina libre de RNAsas (PBS 0.1M + 1:1000 DEPC). Se obtuvieron cortes coronales de tallo cerebral en vibratomo (Leika) de entre 200 y 400 μ m que contuvieran el MNTB. Tanto los tejidos de tallo cerebral como los globos oculares fueron almacenados en 1mL de TRizol [Life Technologies] para la extracción del RNA total. La integridad del mismo se determinó en geles de agarosa al 0.7% por electroforesis y por el método de espectrofotometría en Nanodrop 1000 (Leika).

La síntesis de cDNA se efectuó con el kit Superscript III Reverse Transcriptase [Invitrogen, 18080-044] y su amplificación se llevó a cabo con la Taq DNA Polimerasa [Invitrogen, 11615-010]. El ciclo de amplificación y la secuencia de oligonucleótidos utilizados se resumen en la tabla 6.1. La retina se utilizó como control positivo de la expresión de la sub unidad GABA ρ 3 y la β -tubulina como control positivo de la reacción RT-PCR. Las reacciones de amplificación fueron observadas en geles de agarosa al 2%.

MARCADOR	SECUENCIAS	CONDICIONES DE ALINEAMIENTO
GABA ρ 3	S: 5'-CCTCACCACAGTGGAGGAGTG-3' A: 5'-CTGCACAGGGGCTTCCTGTG-3'	65°C, 50s

β -Tubulina	S: 5'-GCCTCCCACTGTGGTACCCG-3' A: 5'-CCCTCCTCCATGCCCTCACC-3'	55°C, 30s
-------------------	--	-----------

Tabla 6.1.- **Secuencias de oligonucleótidos y condiciones de alineamiento de los cuatro marcadores utilizados. Se realizó la reacción con una temperatura inicial de 94°C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 94°C (30s), 55-65°C (condiciones particulares de alineamiento) y 72°C (1 min), continuando con una extensión final de 72°C por 10 min.**

ANÁLISIS DE DATOS

La cuantificación celular de los experimentos de inmunofluorescencia se llevó a cabo de forma manual y utilizando los softwares Image J y Cell Profiler, comparando entre las tres herramientas para observar cuál era la más eficiente y confiable (para más detalles de los comparativos de las herramientas, ir a Información Suplementaria).

Las herramientas computacionales arrojaron datos crudos sobre el número de células, área de intensidad de inmunomarcaje (en unidades arbitrarias) y co-localización.

Los datos se analizaron estadísticamente con el software RStudio, obteniendo medidas de tendencia central (media, error y desviación estándar) y comparaciones estadísticas (ANOVA de una vía; Prueba T de Student; Correlación de Pearson).

RESULTADOS

7.1 Identificación del MNTB en cortes coronales.

Los cortes se tiñeron solamente con DAPI y se observaron al microscopio de fluorescencia para la identificación del núcleo. Se seleccionaron cortes histológicos coronales que incluyeran al MNTB (Figura 7.1).

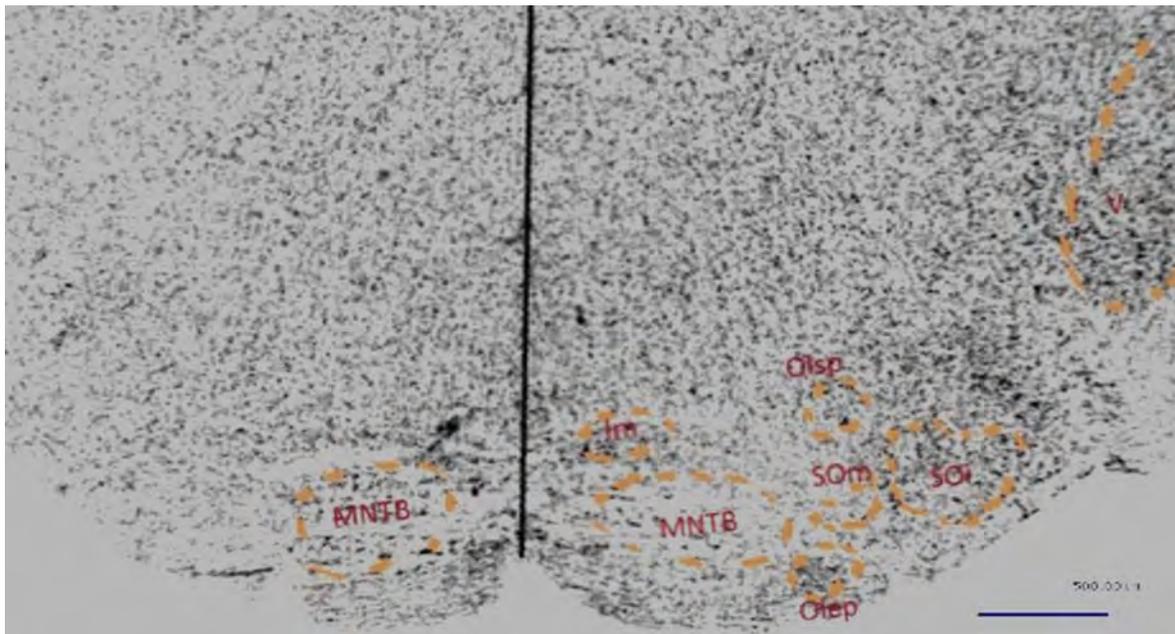


Figura 7.1.- Corte coronal de tallo cerebral ratón P18 teñido con DAPI (monocromático) que contiene al MNTB y algunas otras estructuras propias del Complejo Olivar Superior. Abreviaturas (MNTB: Núcleo Medio del Cuerpo Trapezoide; Im: Lemnisco Medial; SOM: Oliva Media Superior; SOI: Oliva Lateral Superior; Oisp: Oliva superior periférica; Olep: Oliva Inferior periférica; V: Nervio trigémino).

En los cortes coronales se identificaron los núcleos del Complejo Olivar Superior (Oliva Media Superior [MSO], Oliva Lateral Superior [LSO], Lemnisco Medial [Im]) y

que incluyen al MNTB. En un sentido caudal – rostral, se **observó** que el MNTB puede tener una longitud aproximada de entre 480 y 1000 μm **en función de la edad** al obtener cortes coronales de 40 μm , **rango que está dentro de límites ya reportados** (entre 500 y 1100 μm para ratón) (Saliu, 2014).

7.2 RT-PCR: expresión del mRNA de GABA ρ 3 en rebanadas ventrales del tallo cerebral que incluyen al MNTB.

Estudios previos identificaron la expresión de la subunidad GABA ρ 3 en el día postnatal nueve (P9), previo a la apertura del canal auditivo (Reyes-Haro, 2013).

Sin embargo, se desconocía si esta expresión continuaba a lo largo del desarrollo postnatal, posterior a la apertura del canal auditivo. Por ello, se realizaron estudios de RT-PCR para determinar si la expresión del mRNA de GABA ρ 3 ocurría en distintas etapas del desarrollo postnatal (P3, P9, P12, P18, P30, P60).

Los resultados muestran que el mRNA de la subunidad GABA ρ 3 se expresa desde **la edad más temprana analizada (P3) y que su expresión es tenue en edades adultas (>P30)** (Fig 7.2).

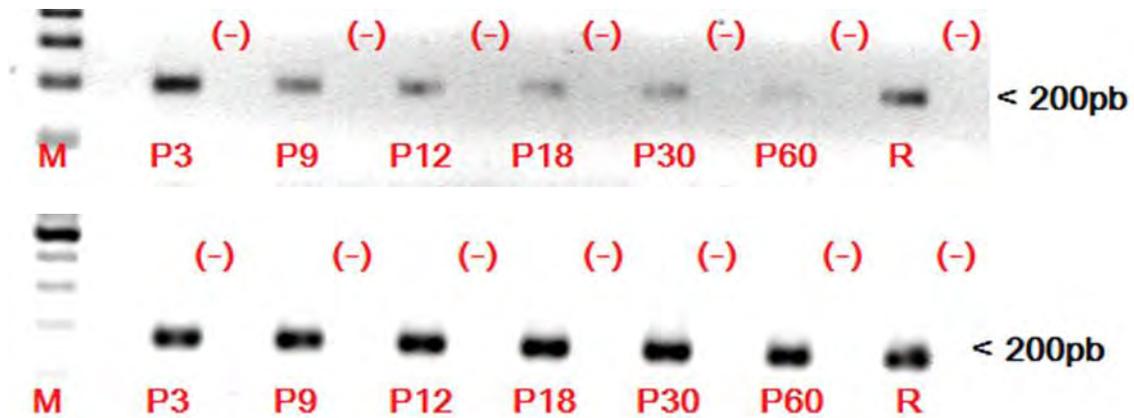


Figura 7.2.- RT-PCR. Geles representativos de la expresión del mRNA de GABA α 3 (gel superior). La expresión del mRNA de la subunidad GABA α 3 ocurre durante etapas tempranas del desarrollo postnatal, con una expresión apenas detectable en edades adultas (>P30). La retina (R) sirvió como control positivo del transcrito de GABA α 3, mientras que la β -Tubulina (gel inferior) sirvió como control positivo de la reacción. Los signos (-) representan el control negativo de la reacción sin retrotranscriptasa para cada edad. M: Marcador de peso molecular.

Los resultados indican que la expresión de la subunidad GABA α 3 ocurre en etapas tempranas del desarrollo postnatal, y se conserva posterior a la apertura del canal auditivo y presenta niveles apenas detectables en las edades adultas (>P30).

Sin embargo, una limitante de estos estudios de RT-PCR es que se realizaron en la región del tallo cerebral que contenía al MNTB, por lo que la expresión de GABA α 3 podría no corresponder exclusivamente a este núcleo. Por ello se contempló realizar estudios de inmunohistofluorescencia que permitieran identificar la expresión de la proteína en células del MNTB.

7.3 Expresión de la subunidad GABA ρ 3 en astrocitos del MNTB.

7.3.1 Densidad celular en el MNTB.

Se analizaron tres diferentes edades **del ratón transgénico GFAP-eGFP (P9, P12, P18)**, para estimar la densidad celular total con base en el conteo de los núcleos celulares teñidos con DAPI en un área de 300 x 100 μm , multiplicando por un factor de 3.3 para su representación en 1mm^2 .

Los resultados mostraron diferencias significativas entre las tres edades (ANOVA una vía $p < 0.001$), con una densidad celular de 1015.74 ± 8.13 en P9 (n=5), un aumento significativo del 42% en P12 (1448.04 ± 74.18 ; n=3). En P18 existe una **disminución del 63% con respecto a P12** (922.02 ± 64 ; n=3) (P9-P12, $p = 0.002^{**}$; P9-P18, $p = 0.054$; P12-P18, $p = 0.001^{**}$; Prueba t de Student) (Figura 7.3).

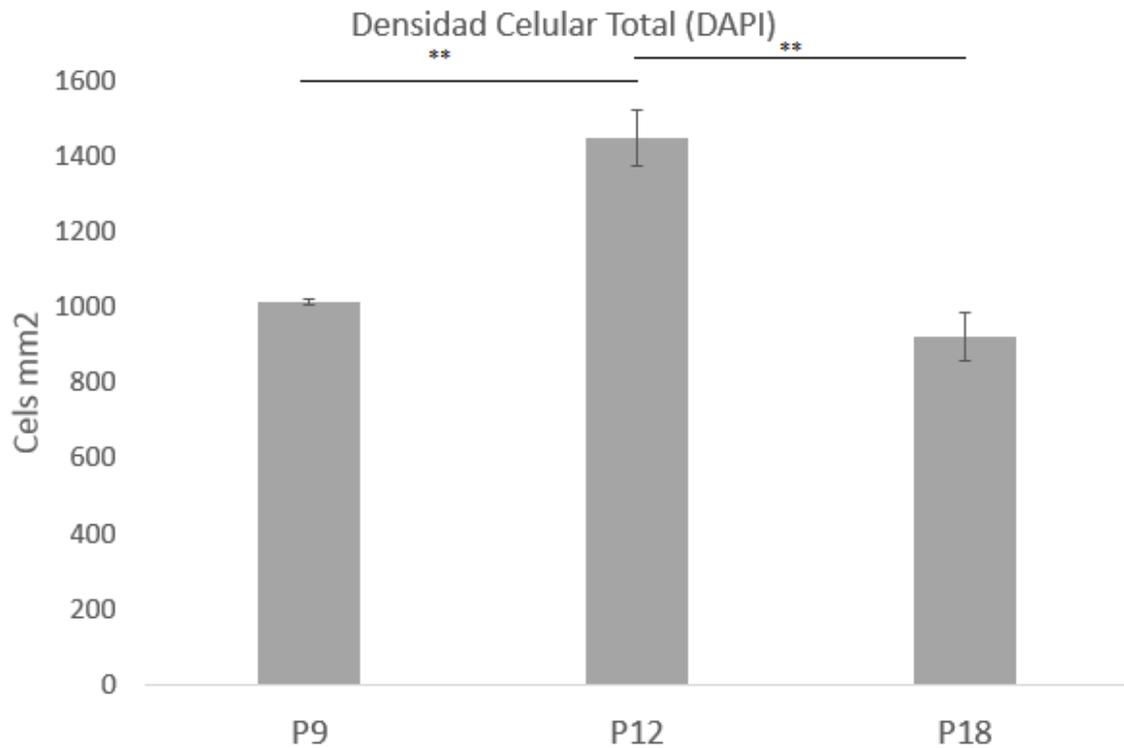


Figura 7.3.- Densidad celular en el MNTB. Se puede apreciar el pico en la densidad celular total en el día P12 con respecto a una edad previa a la apertura del canal auditivo (P9) y una posterior (P18). (ANOVA de una vía [$p=0.001^{***}$, significativa entre las tres edades]; [P9-P12, $p=0.0026^{**}$; P9-P18, $p=0.0541$, n.s.; P12-P18, $p=0.0017^{**}$]).

7.3.2 Expresión de la subunidad GABA ρ 3 en el MNTB

Los resultados de RT-PCR mostraron que la expresión de la subunidad GABA ρ 3 ocurre durante el desarrollo postnatal en el tallo cerebral. Sin embargo, estos estudios se realizaron con la porción del tallo cerebral que contiene al MNTB, por lo que la expresión de GABA ρ 3 podría corresponder también a otras regiones del tallo

cerebral ventral. Por ello, se realizaron estudios de inmunofluorescencia para determinar si la expresión de GABA ρ 3 ocurre específicamente en el MNTB.

Los resultados mostraron que la densidad de células inmunoreactivas a GABA ρ 3 en la edad P9 fue de 231.66 ± 0.73 (n=5), mientras que para la edad P12 se encontró un incremento del 63% (378.51 ± 13.98 , n=3), mientras que en P18 se encontró una densidad menor de células GABA ρ 3+ (151.998 ± 4.77 , n=3) (P9-P12, p=0.0148*; P9-P18, p=0.003**; P12-P18, p=0.003**; Prueba t de Student) (Figura 7.4).

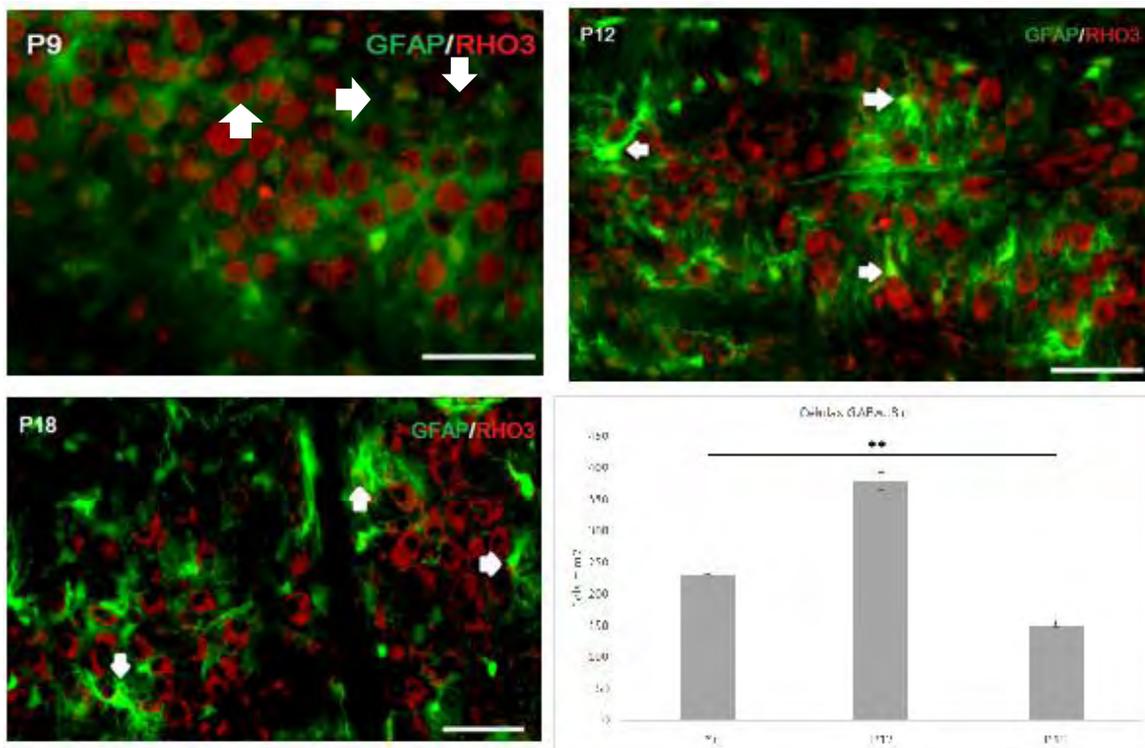


Figura 7.4.- **Expresión de la subunidad GABA ρ 3** en el MNTB. Se ejemplifican las tres edades analizadas con la clara **expresión de células positivas GABA ρ 3** (rojo) y algunos ejemplos de **colocalización con astrocitos (flechas)**. Se observa un **incremento significativo en la densidad de células GABA ρ 3+** en P12 respecto a P9 (63%, $p=0.014$) y a P18 (149%, $p=0.003$), así como una diferencia significativa entre P9 y P18 ($p=0.003$). Bar cal.- 50 μ m.

7.3.3 Los astrocitos del MNTB expresan la subunidad GABA ρ 3.

El siguiente objetivo fue determinar si los astrocitos del MNTB expresaban a la subunidad GABA ρ 3. **Para ello, se utilizó al ratón transgénico GFAP-eGFP, herramienta que facilitó la identificación de las células GFAP+, gracias a la fluorescencia verde (Figura 7.4), y se realizaron estudios de inmunofluorescencia para detectar células inmunoreactivas a GABA ρ 3 que colocalizaran con los astrocitos (Figura 7.4 y 7.5).** Los resultados revelan que en las tres edades analizadas existe una fracción de astrocitos que son positivos a la subunidad GABA ρ 3. En la edad P9 un total de 27.72 ± 1.2 son astrocitos GABA ρ 3+, lo que representa a cerca del 21.62% del total de este tipo celular.

En P12 se encontró un total de células GFAP+ de 37.91 ± 3.37 que son GABA ρ 3+, que representan un 26.62% del total de astrocitos.

Por último, el total de astrocitos que expresan a la subunidad GABA ρ 3+ en P18 es de 24.25 ± 0.95 , que representan al 15.12% de los astrocitos totales cuantificados

(P9-P12, $p=0.1427$; P9-P18, $p=0.1012$; P12-P18, $p=0.0896$; Prueba t de Student)

(Figura 7.5).

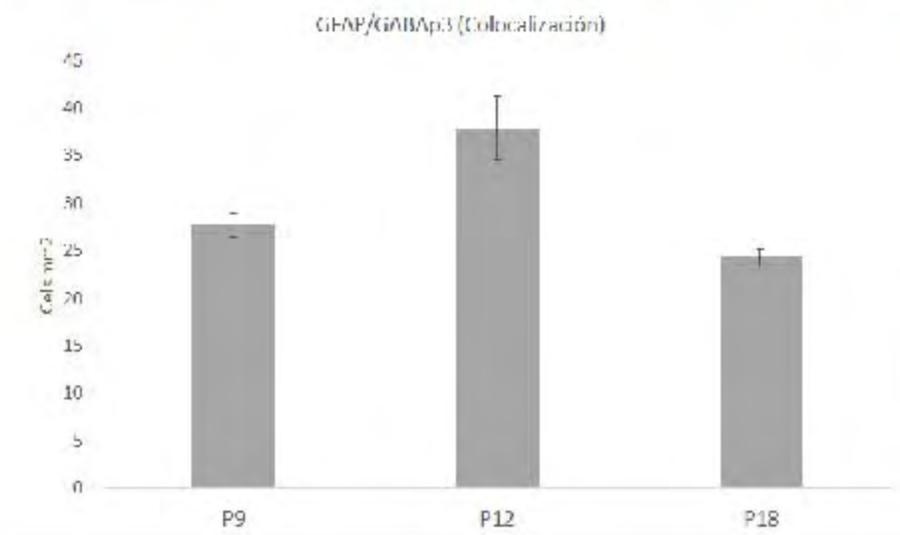
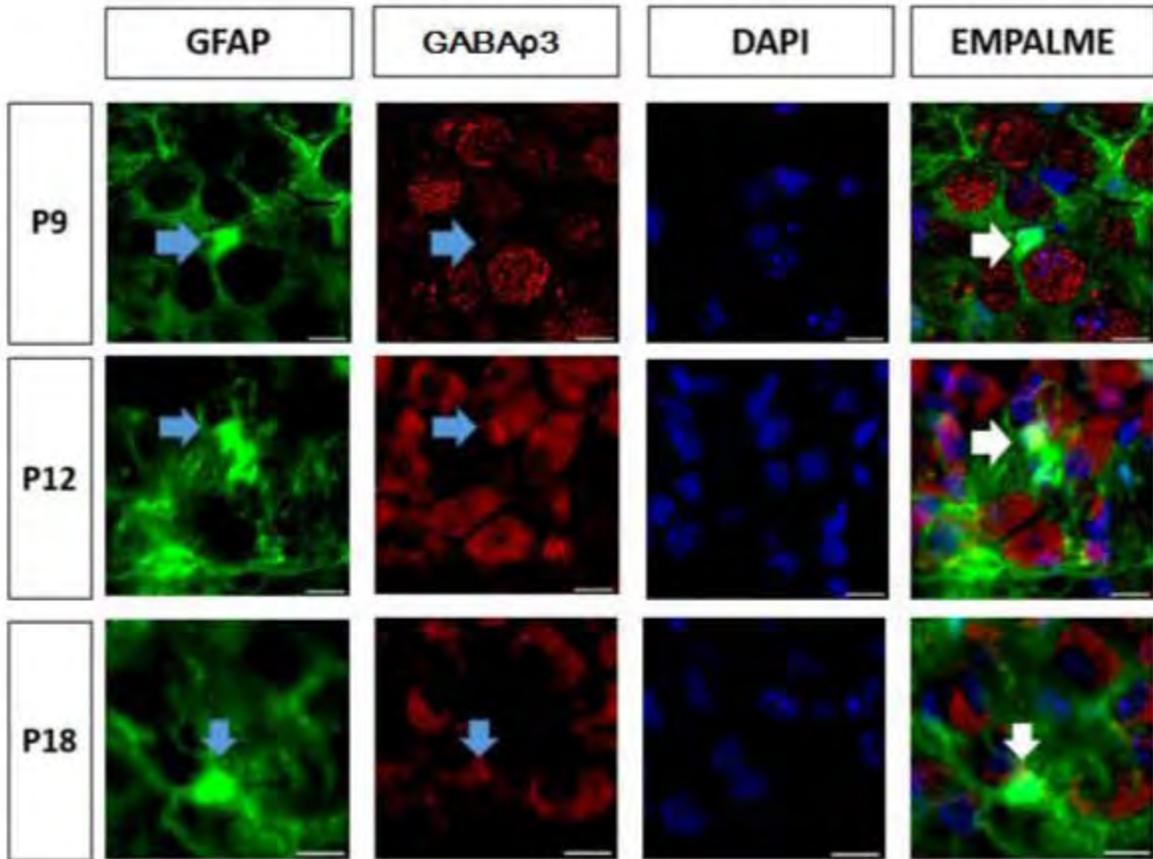


Figura 7.5.- **Expresión de la subunidad GABA ρ 3** en astrocitos del MNTB. Se ejemplifican algunos astrocitos que colocalizan con la subunidad GABA ρ 3 (**flechas blancas en las imágenes de la derecha**) en las tres edades analizadas, en conjunto con el marcaje de núcleos celulares (DAPI). Las indicaciones con flechas azules señalan a los marcajes que colocalizan en la última columna. La gráfica ilustra la cantidad de astrocitos estimados que colocalizan con el inmunomarcaje a GABA ρ 3, no encontrándose diferencias significativas entre las tres edades (ANOVA de una vía $p>0.05$). Bar cal.- 10 μ m.

DISCUSIÓN

El desarrollo postnatal del MNTB ocurre durante las dos primeras semanas de vida del ratón y va dirigido a completar la funcionalidad del núcleo para el momento de la apertura del canal auditivo que se presenta en el día P12. En este periodo del desarrollo postnatal se consolidan las sinapsis de los cálices con las neuronas principales, estableciendo una organización tonotópica funcional después de la apertura del canal auditivo (Kim & Kandler, 2003; Hoffpauir et al., 2006). Adicionalmente, la tasa de proliferación celular en diversos mamíferos (ratón, rata, hurón y gerbo) presenta cambios significativos alrededor del día de apertura del canal auditivo (Saliu et al., 2013). Por ejemplo, en el ratón se utilizó el marcador de proliferación celular EdU y se reportó un pico de proliferación del 100% en P10, en comparación con P0; este pico decaía hasta un 80% en P25 (Saliu et al., 2014). En este sentido, los resultados de nuestro estudio mostraron un incremento del 42% en la densidad celular total al momento de la apertura del canal auditivo (P12) con respecto a P9 y P18. Con base en estos resultados se concluye que durante la apertura del canal auditivo del ratón se produce un pico en la densidad celular total del MNTB. A la par de estos cambios, la amplitud de las corrientes postsinápticas GABAérgicas se incrementa gradualmente, hasta un nivel estable (P3 - P12) y presenta una acción despolarizante (Awatramani et al., 2004), que podría ser parte de los estímulos necesarios para el refinamiento y maduración del MNTB. Las

corrientes evocadas por GABA en las neuronas postsinápticas del MNTB mostraron ser sensibles al TPMPA (antagonista selectivo de la subunidad GABA ρ) y contenían un componente insensible a la bicuculina, lo que indicaba la expresión funcional de la subunidad GABA ρ (Reyes-Haro et al., 2013). La expresión de la subunidad GABA ρ 3 ocurría previo a la apertura del canal auditivo y en la etapa adulta (>P30) era sustituida por las subunidades GABA ρ 1-2 (Reyes-Haro et al., 2013). Sin embargo, se desconocía el patrón de expresión del mRNA de GABA ρ 3 durante el desarrollo postnatal del MNTB, y si esta desaparecía posterior a la apertura del canal auditivo (>P12). Los estudios de RT-PCR revelaron que la expresión de GABA ρ 3 ocurre previo (P3 y P9), al momento (P12) y posterior a la apertura del canal auditivo (P18 y P30). Este patrón de expresión es similar a lo reportado para el hipocampo y el colículo superior, en donde se observaron picos de expresión en la primera semana del desarrollo postnatal (P7) por medio de estudios de hibridación *in situ* (Alakuijala et al, 2004). No obstante, aún se desconocía si la apertura del canal auditivo se asociaba a cambios en la expresión de GABA ρ 3 en el MNTB. Para responder esta pregunta se realizaron estudios de inmunofluorescencia que mostraron que la densidad de las células inmunoreactivas a GABA ρ 3 era mayor al momento de la apertura del canal auditivo (P12) (>50% respecto a P9 y P18). De esta manera, la expresión temprana de la subunidad GABA ρ 3 (durante la primera semana del desarrollo postnatal) coincide con la

despolarización que ejerce el GABA sobre las neuronas inmaduras del MNTB (Awatramani et al., 2004).

La expresión funcional de GABA ρ 3 podría ser responsable de que la desensibilización a GABA sea más lenta previo a la apertura del canal auditivo (53.2ms [P5-P7] vs 13.1ms [P12]) (Awatramani et al, 2004; Reyes-Haro et al., 2013).

Con base en estos resultados se sugiere que la expresión funcional de la subunidad GABA ρ 3 confiere una cinética de desensibilización lenta que promovería una despolarización prolongada, esto podría contribuir al refinamiento sináptico del MNTB, que tiene su periodo crítico de desarrollo postnatal entre los días P3 y P14, etapa en la cual suceden eventos de proliferación celular y apoptosis (Saliu et al., 2014), maduración de la transmisión inhibitoria (Awatramani et al., 2004) y cambios en la organización tonotópica (Kim & Kandler, 2003). Además, el locus del genoma que codifica para la subunidad GABA ρ 3 (3q11-13.3) se asocia a patologías como la ataxia espino cerebelar y las cataratas juveniles o congénitas, por lo que esta subunidad tal vez podría estar implicada en el desarrollo y maduración de sistemas sensoriales y motores, siendo el sistema visual una aproximación a ello dada la expresión constante a través de esta vía (Ogurusu et al, 1997).

Particularmente los astrocitos modulan la función de las neuronas postsinápticas del MNTB, a través de la gliotransmisión (Reyes-Haro et al., 2010). Los astrocitos de la vía auditiva son sensibles a la aplicación extracelular de GABA, que produce

corrientes entrantes y despolarizan a las células registradas en la Oliva Lateral Superior, relevo inmediato de las neuronas postsinápticas del MNTB (Stephan et al., 2014). Con base en estos antecedentes se investigó si los astrocitos del MNTB también expresaban la subunidad GABA ρ 3. Los estudios de inmunofluorescencia en ratones transgénicos GFAP-eGFP revelaron que la expresión de GABA ρ 3 ocurre en los astrocitos del MNTB previo, durante y posterior a la apertura del canal auditivo (P9, P12 y P18 respectivamente). Esta información se suma a otras regiones del cerebro (cerebelo, por ejemplo) (Martínez-Delgado et al., 2011; Reyes-Haro et al., 2013B; Pétriz et al., 2014) en donde las células gliales expresan a alguna de las subunidades GABA ρ , siendo el primer estudio donde se pudo comprobar la expresión *in situ* de GABA ρ 3 en los astrocitos del MNTB.

Observaciones previas indican que la expresión de marcadores para astrocitos (GFAP, ALDH1 y S100 β) varía durante el desarrollo postnatal de la vía auditiva, particularmente el Nervio Coclear (NC), Núcleo Coclear Ventral (VCN) y el MNTB (Dihn et al, 2014). Los marcadores se expresan a la par de los cambios reportados previamente, tales como la sinaptogénesis en el Cáliz de Held que se desarrolla fuertemente entre los días P3 y P14 (Hoffpaur & Grimes, 2006), donde en etapas tempranas (durante la formación de los cálices), los astrocitos presentan una morfología protoplasmática, con pocos procesos, comprobada con el inmunomarcaje con S100 β y que se ha descrito son importantes para la maduración

de las vías (Dihn et al, 2014). Se ha comprobado que la estimulación de receptores GABA_A en los astrocitos genera la oscilación de ondas de Ca²⁺, induciendo la liberación de factores y gliotransmisores (Nilsinn et al, 1993). Previamente en modelos como el pollo se reportó que los astrocitos en la vía auditiva (Nucleus Laminaris, equivalente a la Oliva Media Superior en mamíferos) son fundamentales para la maduración de las vías inhibitorias, (Korn & Cramer, 2008). Por otra parte, los astrocitos responden a factores como el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) o al Receptor de Tirosin Kinasa B (TrkB), que promueven la formación de sinapsis GABAérgicas en el hipocampo (Elmariah et al, 2005). El hallazgo de la expresión de la subunidad GABA_ρ3 en las primeras semanas de vida del ratón (y particularmente su pico de expresión alrededor del día P12) podría ser clave para favorecer una despolarización prolongada del astrocito, que a su vez podría favorecer la formación de terminales inhibitorias.

La relevancia funcional de que los astrocitos expresen a la subunidad GABA_ρ3 se desconoce por el momento. Sin embargo es importante complementar la información obtenida en el presente estudio con experimentos de electrofisiología para determinar que la expresión funcional de GABA_ρ3 ocurre en astrocitos.

Adicionalmente, el uso del ratón silvestre y algunos anticuerpos específicos para astrocitos (anti-GFAP y/o anti-S100 β) podrían contribuir a realizar un estimación más precisa sobre la población de astrocitos GABA_ρ3+, pues solo una fracción de

los astrocitos del MNTB en el ratón transgénico GFAP-eGFP expresan la proteína verde fluorescente (GFP) (Reyes-Haro et al. 2010). Los estudios de inmunofluorescencia con distintos marcadores de astrocitos deberían de acompañarse de estudios de Western Blot que complementarían a la información sobre cambios en la expresión de marcadores de astrocitos durante el desarrollo postnatal del MNTB.

Adicionalmente, la localización precisa de la subunidad GABA ρ 3 en los astrocitos del MNTB podría ser explorada a detalle mediante estudios de microscopía electrónica, herramienta que permitiría explorar la ultra estructura celular y observar la ubicación precisa de la subunidad.

El uso de herramientas de biología molecular (ratones knockout o represión de la transcripción por CRISPR/Cas9, por ejemplo), podrían explicar de forma más específica el papel de la subunidad GABA ρ 3 en el desarrollo del MNTB en las dos primeras semanas de vida, explorando los efectos de la ausencia de esta subunidad sobre la proliferación celular, apoptosis o la fisiología del núcleo.

Estos experimentos propuestos pueden ser complementados con la exploración de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2, estableciendo de manera definitiva el punto en el desarrollo donde existe el intercambio con la subunidad GABA ρ 3, o tal vez encontrando una co-expresión entre las tres subunidades.

Se sugiere explorar también de manera más concisa las fuentes de la transmisión GABAérgica hacia el MNTB. Si bien se tienen aproximaciones al respecto (Adams et al., 1990; Raza et al., 1994), la información aún no es concluyente. Experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-GAD o el uso de trazadores neuronales, podrían ampliar la información.

CONCLUSIONES

1. El mRNA de GABA ρ 3 se expresa en las muestras de tallo cerebral ventral que incluyen al MNTB en distintas etapas del desarrollo postnatal del ratón (P3, P9, P12, P18, P30).
2. La densidad celular total del MNTB se incrementa en P12 con respecto a P9 y P18.
3. La densidad de células GABA ρ 3+ alcanza un pico de expresión en P12 respecto a P9 y P18. De las tres edades estudiadas, P18 es la que mostró una menor densidad de células GABA ρ 3+.
4. Sólo una fracción de células GFAP+ en el MNTB (entre un 18 y un 26%) expresan GABA ρ 3 en las tres de las edades analizadas (P9, P12 y P18). Sin embargo esta población podría estar subestimada.
5. La expresión de GABA ρ 3 en los astrocitos podría estar implicada en la maduración del MNTB.

REFERENCIAS

Adams, J. & Mugnaini, E. (1990) *Immunocytochemical evidence for inhibitory and disinhibitory circuits in the superior olive*. Hearing Research. 49: 281 – 298.

Alakujala A., Palgi M., Wegelius K., Schmidt M., Enz R., Paulin L., Saarma M. & Pasternack M. (2005) *GABA receptor ρ expression in the developing rat brain*. Developmental Brain Research. 154: 15 – 23.

Allen, N. J. & Barres, B. A. (2009) *Glia – more than just brain glue*. Nature. 457, 675 – 677.

Angulo M. Le Meur K., Koslov A., Charpak S. & Audinat E. (2008) *GABA, a forgotten gliotransmitter*. Progress in Neurobiology. 86, 297 – 303.

Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. & Haydon P. (1999) *Tripartite Synapses: glía, the unacknowledged partner*. Trends in Neuroscience. 22: 208 – 215.

Awatramani G., Turecek R. & Trussell, L. (2004) *Inhibitory control at a Synaptic Relay*. The Journal of Neuroscience. 24(11): 2643 – 2647.

Awatramani G., Turecek R., & Trusell L. (2005) *Staggered Development of GABAergic and Glycinergic Transmission in the MNTB*. Journal of Neurophysiology. 93: 819 – 828.

Bennett, M. & Balcar, V. (1999) *Forty years of amino acid transmission in the brain*. Elsevier. Neurochemistry International. 35, 269 – 280.

Bormann, J. & Feigspan, A. (1995) *Differential Pharmacology of GABA-A and GABA-C receptor on rat retinal bipolar cells*. Eur J Pharmacology. 288: 97 – 104.

Bormann, J. & Kettenmann, H. (1998) *Patch-clamp study of γ -aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 9336 – 9340.

Bormann, J. (2000) *The 'ABC' of GABA receptors*. Elsevier Science. TIPS. 21, 16 – 19.

Borst J., Helmchen F. & Sakmann B. (1995) *Pre – and postsynaptic whole – cell recordings in the medial nucleus of trapezoid body of the rat*. Journal of Physiology. 489.3: 825 – 840.

Borst, J. & Rusu, S. (2012) *The Calyx of Held Synapse. Synaptic Mechanism in the Auditory System*. Springer Science. 95 – 134.

Boue E., Roudbaraki M., Bascles L., Tramu G, Bloch B. & Garret M. (1998) *Expression of GABA receptor ρ Subunits in rat brain*. Journal of Neurochemistry. 70, 899 – 907.

Campos M., De Cabo C., Wisden W., Juiz J. & Merlo D. (2001) *Expression of GABA A receptor subunits in rat brainstem auditory pathways: cochlear nuclei, superior olivary complex and nucleus of the lateral lemniscus*. Neuroscience. 102, 3: 625 – 638.

Caspary D., Holder T., Hughes L., Mildbrant J., McKernan R., & Naritoku D. (1999) *Age-related changes in GABA-A receptor subunit composition and function in rat auditory system*. Neuroscience. 93(1): 307 – 312.

Chebib M., Hinton T., Schmid K., Brinkworth D., Qian H., Matos S., Kim H., Abdel-Halim H., Kumar R., Johnston G. & Hanrahan J. (2009) *Novel, potent and selective GABA-C antagonist inhibit myopia development and facilitate learning and memory*. J Pharmacology Exp Ther. 328: 448 – 457.

Cunha C., Monfils M. & LeDoux J. (2010) *GABA-C receptors in the lateral amygdala: a possible novel target for the treatment of fear and anxiety disorders?* Frontiers in Behavioral Neuroscience. 4, 6: 1 – 9.

Cutting G., Lu L., O'Hara B., Kasch L., Montrose-Rafidazeh C., Donovan D., Shimada S., Antonarakis S., Guggino W & Uhl G. (1991) *Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 1 cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 2673 – 2677.

Dihn, M., Koppel, S., Korn, M. & Cramer, K. (2014) *Distribution of Glial Cells in the Auditory Brainstem: Normal Development and Effects of Unilateral Lesion*. Neuroscience. 278: 237 – 252.

Elmariah, S., Joo Oh, E., Hughes, E., Balice – Gordon, R. (2005) *Astrocytes Regulate Inhibitory Synapse Formation via Trk-Mediated Modulation of Postsynaptic GABA A Receptors*. The Journal of Neuroscience. 25(4): 3638 – 3650.

Eng L., Vanderhaeghen J., Bignami A. & Gerstl B. (1971) *An acid protein isolated from fibrous astrocytes*. Brain Research. 28: 351 – 354.

Eng L. (1985) *Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): The Major Protein of Glial Intermediate Filaments in Differentiated Astrocytes*. Journal of Neuroimmunology. 8: 203 – 214.

Eng L., Ghirnikar R., & Lee Y. (2000) *Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969 – 2000)*. Neurochemical Research. 25: 1439 – 1451.

Ezan P., André P., Cisternino S. & Saubaméa B. (2012). *Deletion of astroglial connexins weakens the blood – brain barrier*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 32, 1457 – 1467.

Franklin, K. & Paxinos, G. (2008) *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*. Third Edition. ELSEIVIER. New York, USA.

Harvey V. Duguid I. & Krasel C. (2006). *Evidence that GABA ρ subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells*. Journal of Physiology. 577, 127 – 139.

Henneberger C., Papouin T., Oliet S. & Rusakov D. (2010). *Long Term Potentiation depends on release of D – serine from astrocytes*. Nature. 463: 232 – 236.

Hösli L., Hösli E., Andres P. & Landlot H. et al. (1981). *Evidence that the Depolarization of Glial Cells by Inhibitory Amino Acids is Caused by an Efflux of K⁺ from Neurones*. Experimental Brain Research. 42: 43 – 48.

Hoffpauir B., Grimes J., Mathers P. & Spirou G. (2006). *Synaptogenesis of the Calyx of Held: Rapid onset on function one-to-one morphological innervation*. The Journal of Neuroscience. 26(20): 5511 – 5523.

Hudspeth, A. J., Jessell, T. M., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Siegelbaum, S. A. (Eds.). (2013). *Principles of neural science*.

Isaacson J. (1998). *GABA B Receptor-Mediated Modulation of Presynaptic Currents and Excitatory Transmission at a fast Central Synapse*. The American Physiological Society. 0022: 3077 – 3098.

Johnston G., Curtis D., Beart P., Game C., McCulloch R. & Twitchin B. (1975) *Cis- and Trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation*. Journal of Neurochemistry. 24: 157 – 160.

Kettenmann, H., Backus K. & Schachner M. (1984) *Aspartate, Glutamate and γ -aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes*. Neuroscience Letters. 52: 25 – 29.

Kettenmann, H. & Shachner M. (1985) *Pharmacological Properties of γ -aminobutyric acid-, Glutamate-, and Aspartate-induced Depolarizations in Cultured Astrocytes*. The Journal of Neuroscience. 12: 3295 – 3301.

Kettenmann, H. & Ransom, B. (2013) *Neuroglia*. Third edition. Oxford University Press. New York, United States of America.

Kim, G. & Kandler, K. (2003) *Elimination and strengthening of glycinergic/GABAergic connections during tonotopic map formation*. Nature. 6: 282 – 290.

Korn, M. & Cramer, K. (2008) *Distribution of Glial – Associated Proteins in the Developing Chick Auditory Brainstem*. Developmental Neurobiology. 68 (8): 1093 – 1106.

Kuwabara N., DiCaprio R. & Zook J. (1991) *Afferents to the Medial Nucleus of Trapezoid Body and Their Collateral Projections*. The Journal of Comparative Neurology. 314: 684 – 706.

Lukasiewicz, P. & Werblin, F. (1994) *A novel GABA receptor modulates synaptic transmission from bipolar to ganglion and amacrine cells in the tiger salamander retina*. *The Journal of Neuroscience*. 14(3): 1213 – 1223.

Magistretti, J. (2004). *Brain Energy Metabolism. From Molecules to Networks*. Elsevier Science. United States of America. 67 – 89.

Magistretti, J. (2006). *Neuron-Glia metabolic coupling and plasticity*. *The Journal of Experimental Biology*. 209: 2304 – 2311.

Masterton B., Jane J. & Diamond I. (1967) *Role of brainstem auditory structures in sound localization. I. Trapezoid Body, Superior Olive, and Lateral Lemniscus*. *Journal of Neuropsychology*. 30(2): 341 – 359.

Müller J., Reyes-Haro D., Pivneva T., Nolte C., Shaette R., Lübke J. & Kettenmann H. (2009). *The principal neurons of the medial nucleus of the trapezoid body and*

NG2+ glial cells receive coordinated excitatory synaptic input. The Journal of General Physiology. 134, 2:115 – 127.

Newman, E. (2003) *New roles of astrocytes: Regulation of synaptic transmission.* Elsevier. Trends in Neurosciences. 26, 10: 536 – 542.

Nilsson M., Eriksson P., Rönnbäck L. & Hansson E. (1993) *GABA induces Ca²⁺ transients in astrocytes.* Neuroscience. 54(3): 605 – 614.

Ogurusu T., Eguchi G. & Shingai R. (1997). *Localization of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor $\rho 3$ subunit in rat retina.* Molecular Neuroscience. Neuroreport. 8, 4: 925 – 927.

Panatier A., Theodosis D., Mothet J.P., Touquet B., Pollegioni L., Poulain D. & Oliet S. (2006) *Glia derived D – serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory.* Cell. 125: 775 – 784.

Perea G., Navarrete M. & Araque A. (2009) *Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information*. Trends in Neurosciences. 32, 8: 421 – 431.

Pétriz A. & Reyes-Haro D., González-González M., Miledi R. & Martínez-Torres A.
(2014) *GABA ρ subunits confer a bicuculline – insensitive component to GFAP+ cells of cerebellum*. PNAS. 1-6.

Polenzani L., Woodward R. & Miledi R. (1991) *Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in Xenopus oocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 88: 4318 – 4322.

Purves, D. (2004). *Neuroscience*. Third Edition. Sinauer Associates Inc. Massachusetts, USA.

Ragozzino D., Woodward R., Murata Y., Eusebi F. Overman L. & Miledi R. (1996). *Design and In Vitro Pharmacology of a Selective γ – Aminobutyric Acid C Receptor Antagonist*. Molecular Pharmacology. 50: 1024 – 1030.

Raza A., Milbrandt J., Americ S. & Caspary D. (1994) *Age – related changes in brainstem auditory neurotransmitters: Measures of GABA and acetylcholine function*. Hearing Research. ELSEIVER. 77: 221 – 230.

Rees, A. & Palmer, A. (2010) *The Oxford Handbook of Auditory Science: The Auditory Brain*. Oxford University Press. USA.

Reyes – Haro D., Müller J., Boresch M., Pinveva T., Benedetti B., Scheller A., Nolte C. & Kettenmann H. (2010) *Neuron – astrocyte interactions in the medial nucleus of trapezoid body*. The Journal of General Physiology. 135(6): 583 – 594.

Reyes – Haro D., Rosas-Arellano A., González-González M., Mora-Loyola E., Miledi R., Martínez-Torres A. (2013) *GABA ρ expression in the medial nucleus of the trapezoid body*. Neurocience Letters, Elseiver. 532: 23 – 28.

Reyes – Haro D. & González-González M., Pétriz A., Rosas-Arellano A., Kettenmann H., Miledi R., Martínez-Torres A. (2013B) *γ – Aminobutyric Acid – ρ Expression in Ependymal Glial Cells of the Mouse Cerebellum*. Journal of Neuroscience Research. 91: 527 – 534.

Reyes – Haro D., Bulavina L. & Pinveva T. (2014) *El pegamento de las ideas*. Ciencia. Abril – Junio: 12 – 18.

Rosas–Arellano A., Parodi J., Machuca-Parra A., Sánchez-Gutiérrez A., Inestrosa N., Miledi R. & Martínez-Torres A. (2011) *The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amígdala and visual cortex*. Neuroscience Letters. 1: 20 – 25.

Rouach N., Koulakoff A., Abudara V., Willecke K. & Giaume C. (2008) *Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission*. Science. 322: 1551 – 1554.

Rowland K., Irby N. & Spirou G. (2000) *Specialized Synapse-Associated Structures within the Calyx of Held*. The Journal of Neuroscience. 20(24): 9135 – 9144.

Saliu A., Adise S., Xian S., Kudelska K. & Rodríguez-Contreras A. (2013). *Natural and Lesion-Induced Decrease in Cell Proliferation in the Medial Nucleus of the Trapezoid Body During Hearing Development*. The Journal of Comparative Neurology. 971 – 985.

Sanes, D.H. & Friauf, E. (2000) *Development and influence of inhibition in the lateral superior olivary nucleus*. Hearing Research. 147: 46 – 58.

Schneggenburger, R. & Forsythe, I. (2006) *The Calyx of Held*. Cell Tissue Res. 326: 311 – 337.

Siegel, G. (2006) *Basic Neurochemistry*. Elseiver. USA.

Soghomonian, J. J. & Martin, D. (1998) *Two isoforms of glutamate decarboxylase: Why?* Elseiver Science. TIPS. 19: 500 – 505.

Stephan, J. & Friauf, R. (2014) *Functional Analysis of the Inhibitory Neurotransmitter Transporters GlyT1, GAT-1, and GAT-3 in Astrocytes of the Lateral Superior Olive*. *Glia*. 62: 1992-2003.

Suzuki A., Stern S., Bozdagi O., Huntley O., Walker R., Magistretti P., Alberini C. (2011) *Astrocyte – Neuron Lactate Transport is Required for Long – Term Memory Formation*. *Cell*. 144: 810 – 823.

Takahashi T., Kajikawa Y. & Tsujimoto T. (1998). *G – Protein – Coupled Modulation of Presynaptic Calcium Currents and Transmitter Release by a GABA B Receptor*. *The Journal of Neuroscience*. 18(9): 3138 – 3146.

Wegelius K., Pasternack M., Hiltunen J., Rivera C., Kaila K., Saarma M. & Reeben M. (1998) *Distribution of GABA receptor ρ subunit transcripts in the rat brain*. *European Journal of Neuroscience*. 10(1): 350 – 357.

Willet, J. (2001) *Handbook of mouse auditory research: from behavior to molecular biology*. CRC Press. USA.

Woodward, R. M., Polenzani, L. & Miledi, R. (1993) *Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (rho-like) gamma-aminobutyric acid receptors expressed in Xenopus oocytes. II. Pharmacology of gamma-aminobutyric acidB receptor agonist and antagonist.* Molecular Pharmacology. 43(4): 609 – 625.

Zhang D., Pan Z., Awobuluyi M. & Lipton S. (2001) *Structure and function of GABA_A receptors: a comparison of native versus recombinant receptors.* Trend in Pharmacology Science. 22: 121 – 132.

INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

CUANTIFICACIÓN DE ASTROCITOS DEL MNTB EN EL RATÓN TRANSGÉNICO

GFAP-eGFP.

El ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de la proteína ácido gliofibrilar (GFAP) se utilizó para como herramienta para identificar la colocación con la subunidad GABA ρ 3. Sin embargo, estudios previos reportaron que una fracción de los astrocitos no expresan la proteína verde fluorescente (Reyes-Haro et al., 2010), por lo que la estimación de este tipo celular realizada en este estudio podría estar subestimada.

La densidad de los astrocitos del MNTB fue de 126.72 ± 4.43 en P9, sin cambios significativos en P12 (141.86 ± 14.42) ni en P18 (129.12 ± 6.67) (ANOVA una vía, $p=0.3808$, n.s. Prueba t de Student \rightarrow P9-P12, $p=0.2657$, n.s; P9-P18, $p=0.8211$, n.s; P12-P18, $p=0.3593$, n.s.).

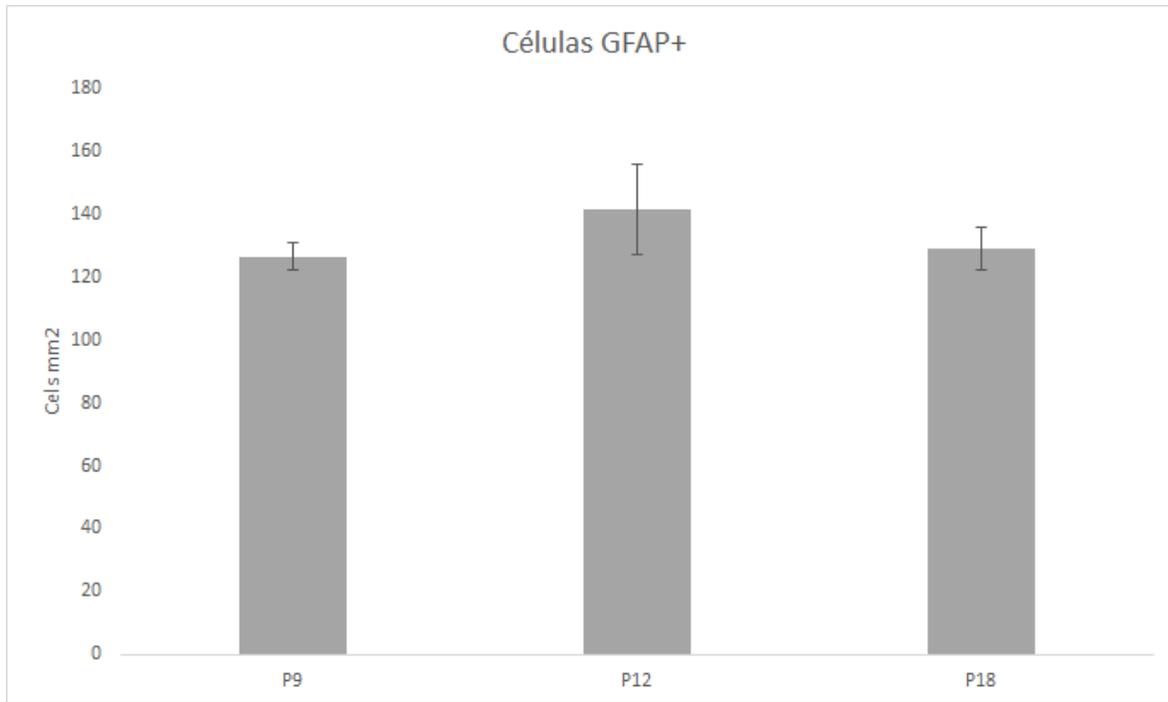


Figura S1.- **Densidad de astrocitos en el MNTB del ratón transgénico GFAP-eGFP. No se encuentran diferencias significativas entre las tres edades analizadas (ANOVA de una vía, $p=0.3808$).**

Una propuesta para obtener una aproximación más precisa sobre la cuantificación de astrocitos en el MNTB es el uso de anticuerpos específicos en el ratón silvestre. Un estudio previo (Reyes-Haro et al., 2010) demostró que el uso de anticuerpos como el anti-GFAP y/o anti-S100 β son herramientas confiables para obtener una estimación más próxima en la observación de astrocitos en el MNTB.

CORRELACIÓN ANÁLISIS DE INTENSIDAD Y CONTEO CELULAR

Se realizó una correlación estadística (Correlación de Pearson) entre los valores de los conteos celulares y el análisis de área (unidades arbitrarias, U.A.) realizado en Image J, con el objetivo de observar si la cuantificación celular absoluta tiene una relación positiva con el método de cuantificación del área de cada marcador y así confirmar la confiabilidad de la cuantificación por métodos semi-automatizados.

Esta herramienta toma los puntajes medios de cada categoría (en este caso, las medias de las cuantificaciones absolutas y las medias del área de intensidad encontrada), los compara entre sí para relacionar el comportamiento de los datos y obtener el nivel de concordancia entre ellos, yendo en un rango de -1 a +1, donde los puntajes cercanos a "1" reflejan una alta correlación entre las variables y el signo determina el tipo (por ejemplo, si es positiva, la relación es proporcional ya que cuando una variable aumenta su valor la otra lo hace también; viceversa en el caso de las correlaciones negativas).

	GFAP	RHO3	COL
P9	14.8-38.078	26.4-27.44	3.2-7.249
P12	14.92-40.757	37.7-35.85	4-11.022
P18	13.16-31.164	15-15.898	2.3-5.49

CORR	0.97	0.99	0.97
------	------	------	------

Tabla S2.- **Análisis de correlación entre la cuantificación celular absoluta y el análisis de área por intensidad de fluorescencia.** Los valores expresados reflejan la media del conteo celular absoluto y la media de intensidad en unidades arbitrarias (U.A.) respectivamente (conteo absoluto-intensidad). **La última fila (CORR) refleja el resultado de la correlación entre el conteo absoluto y la intensidad para cada columna (GABA ρ 3, GFAP y Co-localización) (Correlación de Pearson).**

Se puede observar que las cuantificaciones correlacionan de manera positiva y con valores muy cercanos a “1” en las tres columnas, por lo que ambos métodos de cuantificación son confiables entre sí y con un comportamiento similar de los datos.

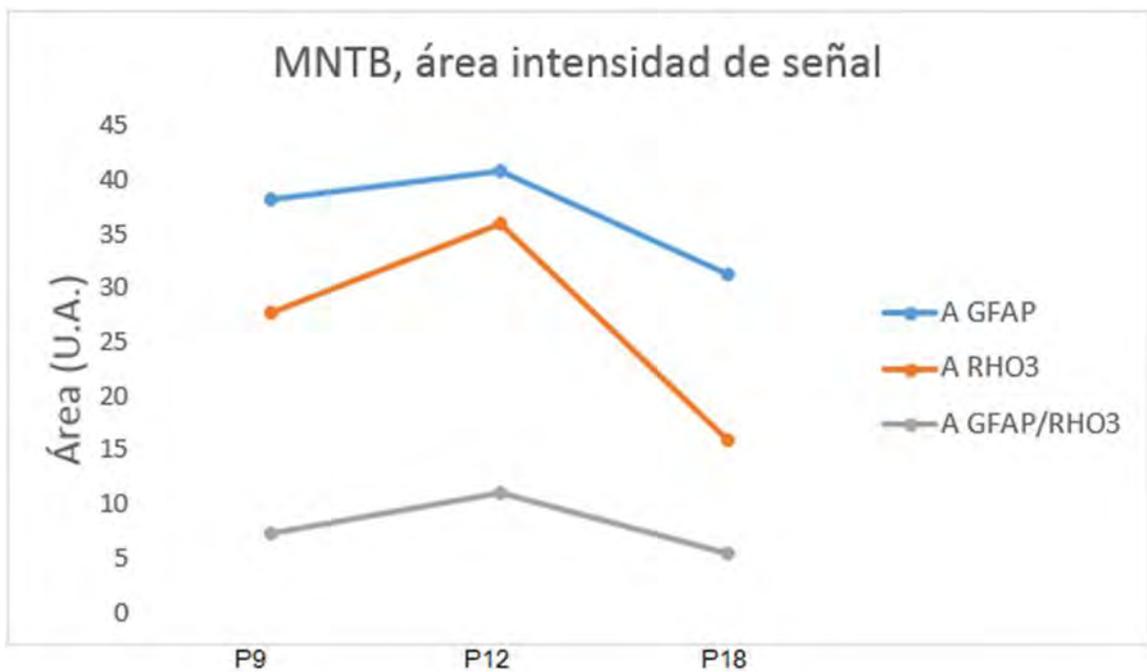
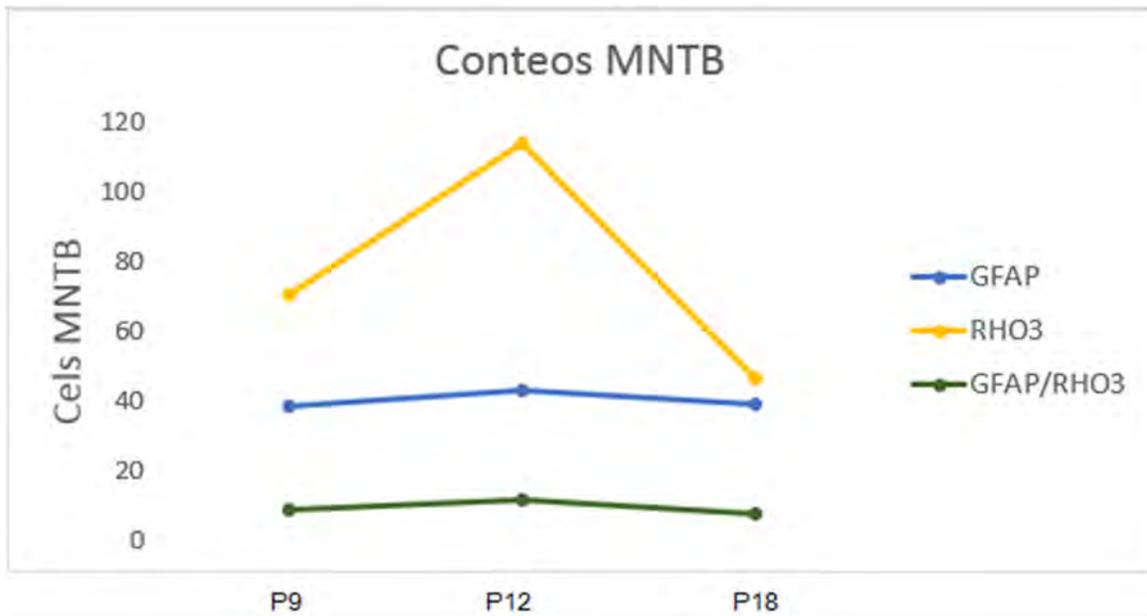


Figura S3.- Resumen de los comparativos entre las cuantificaciones brutas (gráfica superior) y el análisis de intensidad por área (gráfica inferior).

A pesar de la relación entre los métodos de medición (conteo-área intensidad), las diferencias de edad en el análisis de intensidad difieren del análisis estadístico hecho con el conteo absoluto de las densidades celulares (ir a resultados).

En el análisis de área por intensidad (U.A.), existen diferencias significativas en los astrocitos entre las tres edades (ANOVA de una vía, $p < 0.0001$; Prueba t de Student → P9-P12, $p = 0.0168$; P9-P18, $p < 0.001$; P12-P18, $p < 0.001$). Igualmente, la comparación de GABA ρ 3 tuvo diferencias significativas en las tres edades (ANOVA de una vía, $p < 0.0001$; Prueba t de Student → P9-P12, $p < 0.001$; P9-P18, $p < 0.001$; P12-P18, $p < 0.001$), así como para la co-localización (ANOVA de una vía, $p < 0.0001$; Prueba t de Student → P9-P12, $p < 0.001$; P9-P18, $p < 0.01607$; P12-P18, $p < 0.001$).

Sin embargo, el análisis de área por intensidad no refleja de manera precisa la cantidad de células inmunoreactivas, sino sólo el área que ocupa la fluorescencia que sólo es comparable en los puntajes medios individuales por edad (corroborado por la correlación realizada previamente).

APÉNDICE

COMPARACIÓN ENTRE HERRAMIENTAS DE CONTEO CELULAR

La estimación de la densidad celular se realizó mediante varios métodos, iniciando originalmente con el conteo manual. Sin embargo, también se optó por el uso de dos herramientas semi-automatizadas (ImageJ y Cell Profiler) que permitieron realizar una estimación más confiable y precisa (Tabla S1).

TIPO CELULAR

<i>P9</i>	<i>DAPI</i>	<i>GFAP</i>	<i>RHO3</i>	<i>GFAP/RHO3</i>
MANUAL	452 ±51.18	102 ±21.67	264 ±53.18	30 ±0 (29.41%)
IMAGE J	113.4 ±1.25	14.8 ±0.5	26.4 ±0.5	3.2 ±0.17 (21.62)
CELL PRO	102.6 ±0.91	12.8 ±0.83	23.4 ±0.5	2.8 ±0.16 (21.87%)
<i>P12</i>	<i>DAPI</i>	<i>GFAP</i>	<i>RHO3</i>	<i>GFAP/RHO3</i>
MANUAL	470 ±40	60 ±20	223.33 ±15.27	20 ±0 (33.3%)
IMAGE J	150.46 ±7.28	14.92 ±1.3	37.7 ±1.26	4 ±0.2 (26.62%)

CELL PRO	146.16 ±5.98	14.33 ±1.72	38 ±1.16	3.83 ±0.73 (26.72%)
<i>P18</i>	<i>DAPI</i>	<i>GFAP</i>	<i>RHO3</i>	<i>GFAP/RHO3</i>
MANUAL	296.67 ±20.81	76.7 ±11.54	136.67 ±11.54	16.67 ±5.77 (21.73%)
IMAGE J	87 ±4.83	13.16 ±0.92	15 ±0.33	2.3 ±0.17 (17.72%)
CELL PRO	79.83 ±5.58	11.16 ±0.41	13.16 ±0.58	2.1 ±0.83 (18.81%)

Tabla S1.- Comparativa entre los tres métodos de conteo celular. Los números en paréntesis de la última columna (GFAP/RHO3) expresan los porcentajes de células GFAP+ que co-localizan con inmunomarcaje GABA ρ 3+ (datos crudos, 300x100 μ m).

La tabla anterior indica las medias de los conteos por los tres métodos utilizados. Se puede observar que mediante el método manual las cuantificaciones están sobreestimadas para todos los marcadores, siendo para núcleos celulares (DAPI) una sobreestimación de entre 3.7 a 4 veces mayor con respecto a los software, para GFAP entre 4.2 y 8.5 veces, para GABA ρ 3 entre 6.02 y 11.4 veces, y para la co-localización entre 5.2 y 10.7 veces. En cambio, no hubo diferencias entre las herramientas semi-automatizadas, en consecuencia se utilizaron los softwares para realizar las estimaciones de densidad celular.

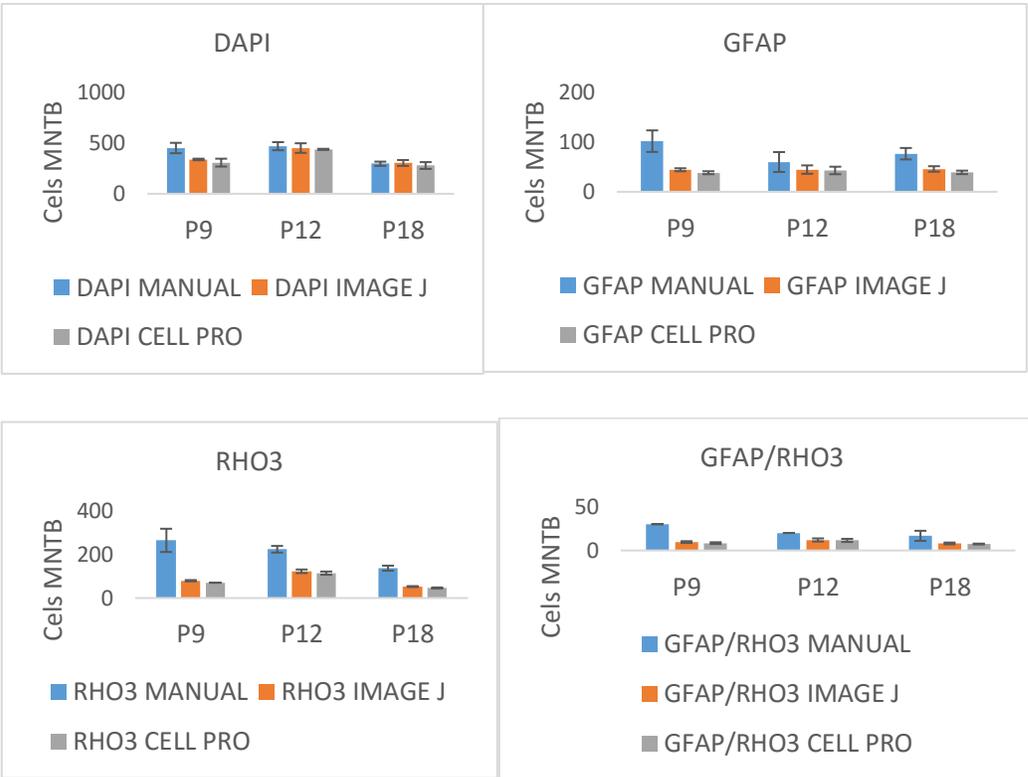


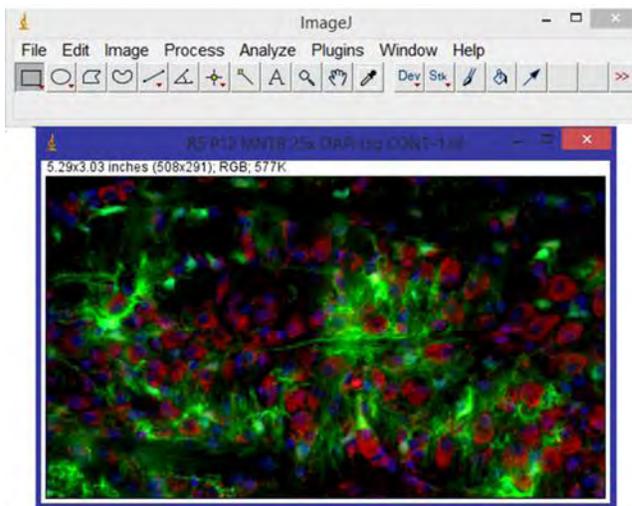
Figura S2.- Resumen gráfico de los comparativos entre los métodos de conteo celular.

HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS

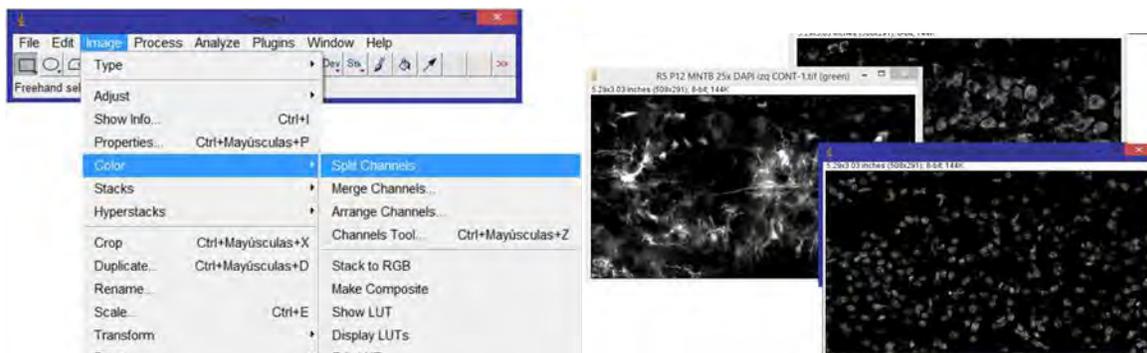
Image J (conteo celular)

El software Image J permite la edición y cuantificación de imágenes tipo RGB (rojo, verde, azul), la cual es transformada a un formato de escala de grises para un análisis más preciso y confiable.

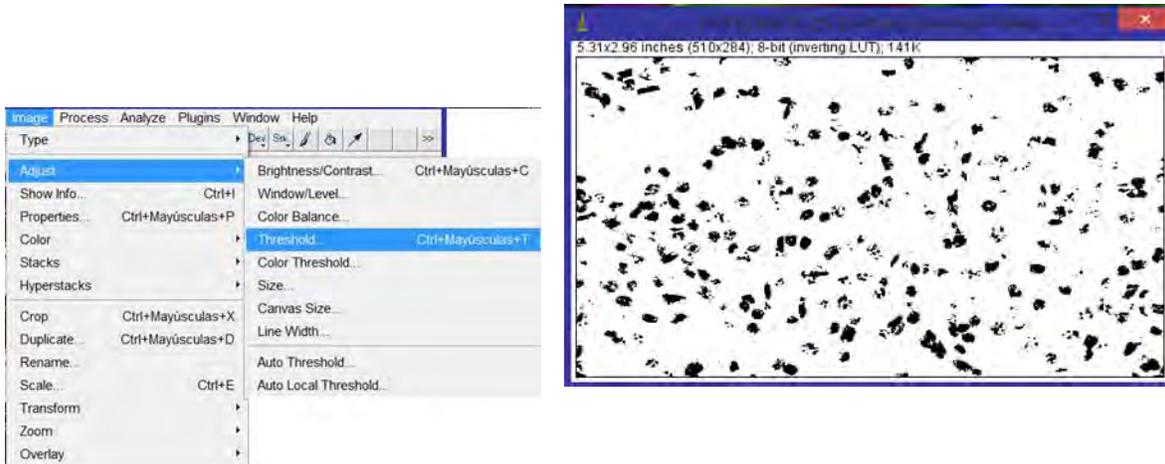
A continuación se presenta un ejemplo del uso de la herramienta de cuantificación (ejemplo con núcleos celulares, DAPI).



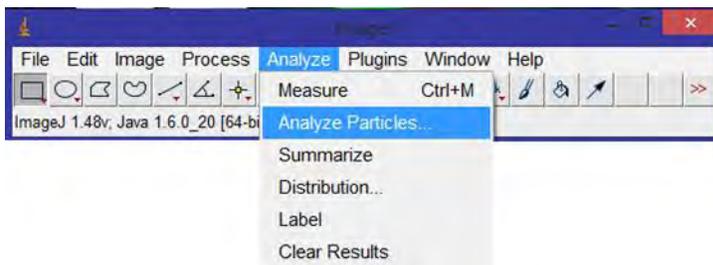
1. Desde el menú File → Open, abrir el archivo que se desea analizar.



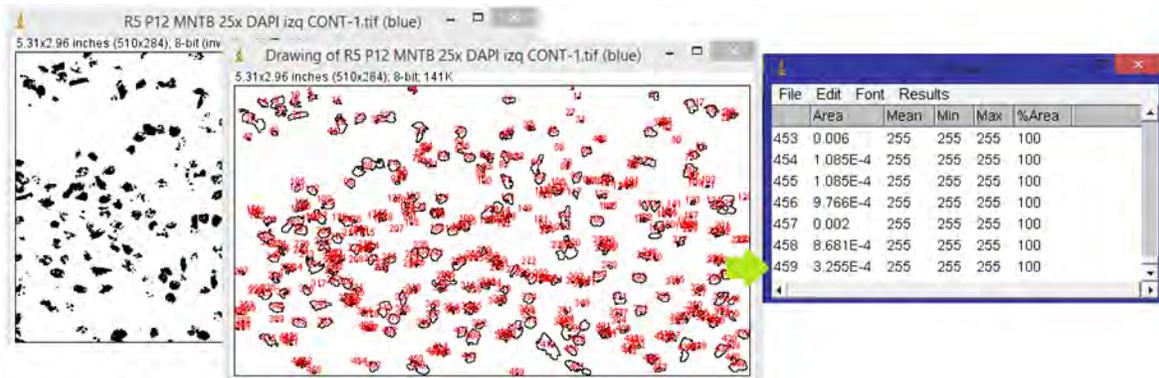
2. Desde el menú **Image** → **Color** → **Split Channels**, separar la imagen en sus diferentes canales (se obtienen secciones en 8bits).



3. Desde el menú **Image** → **Adjust** → **Threshold**, ajustar los parámetros de los objetos principales con respecto al fondo, al mismo tiempo que la imagen pasa a la escala de grises deseada.



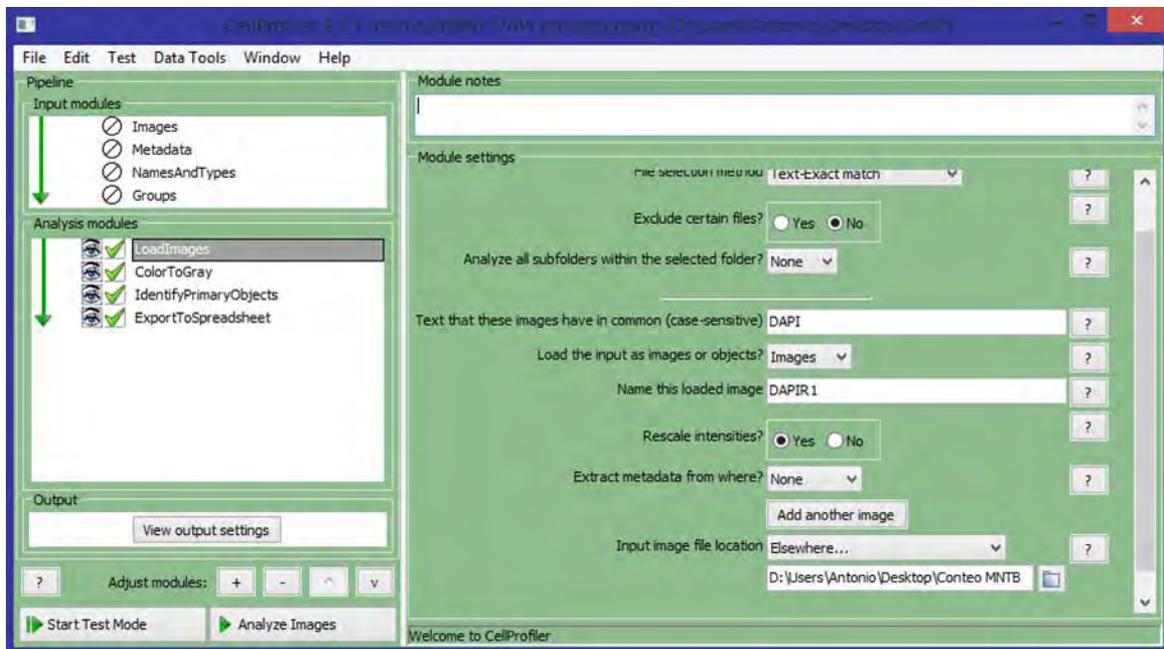
4. Desde el menú **Analyze** → **Analyze Particles**, iniciar el conteo de elementos una vez establecidos los parámetros de la imagen (escala de grises-fondo).



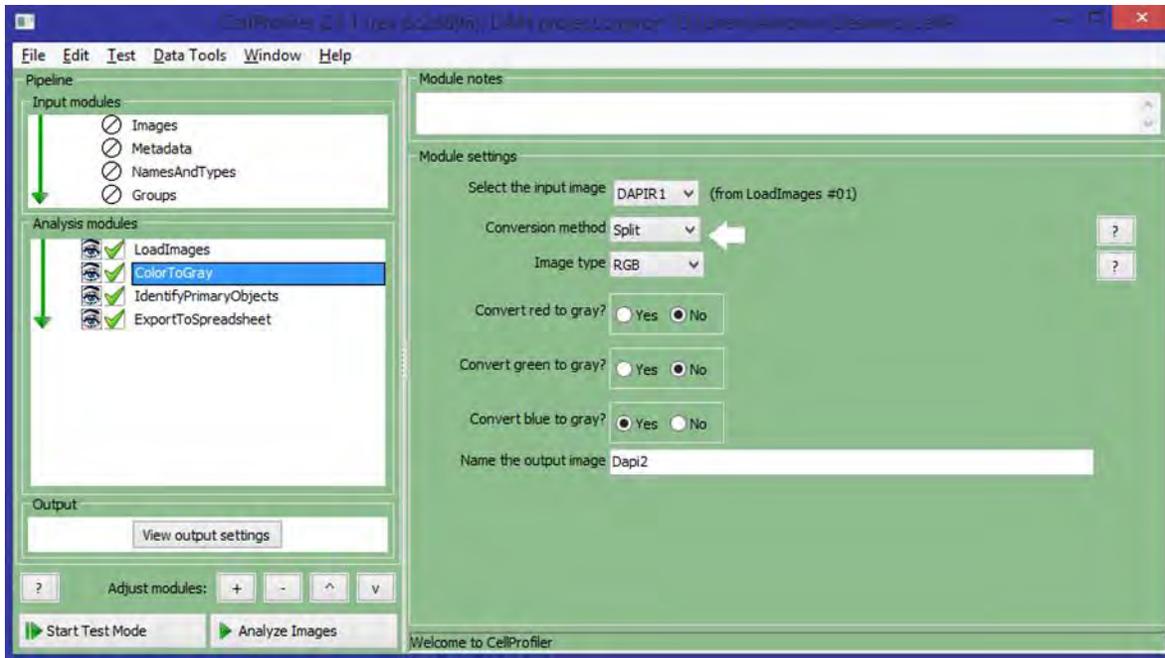
5. El análisis arroja todos los elementos identificados desde la imagen en escala de grises, obteniendo una tabla con diferentes parámetros de área e intensidad. El número crudo de elementos es el último en la lista de la tabla (flecha verde).

Cell Profiler (Conteo celular)

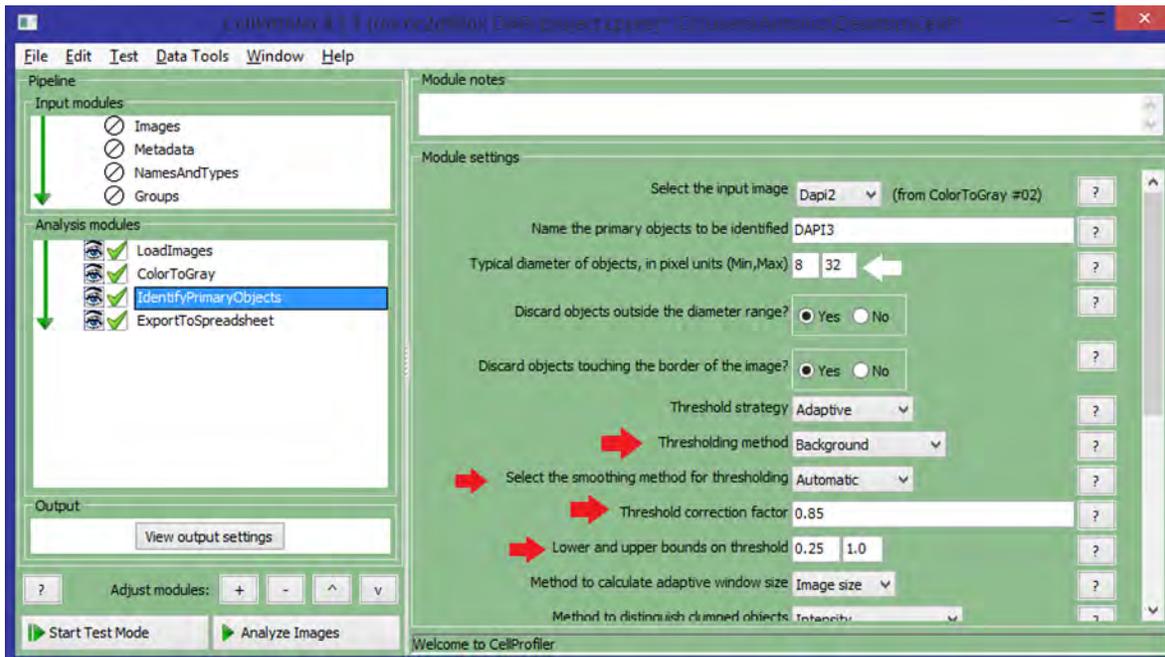
El software de Cell Profiler permite delimitar, ya sea por forma o BIEN POR EL tamaño, los objetos que son el objetivo a cuantificar. Al igual que con Image J, el formato de análisis de imágenes también permite realizarlo con archivos RGB y desde una carpeta predeterminada para el análisis.



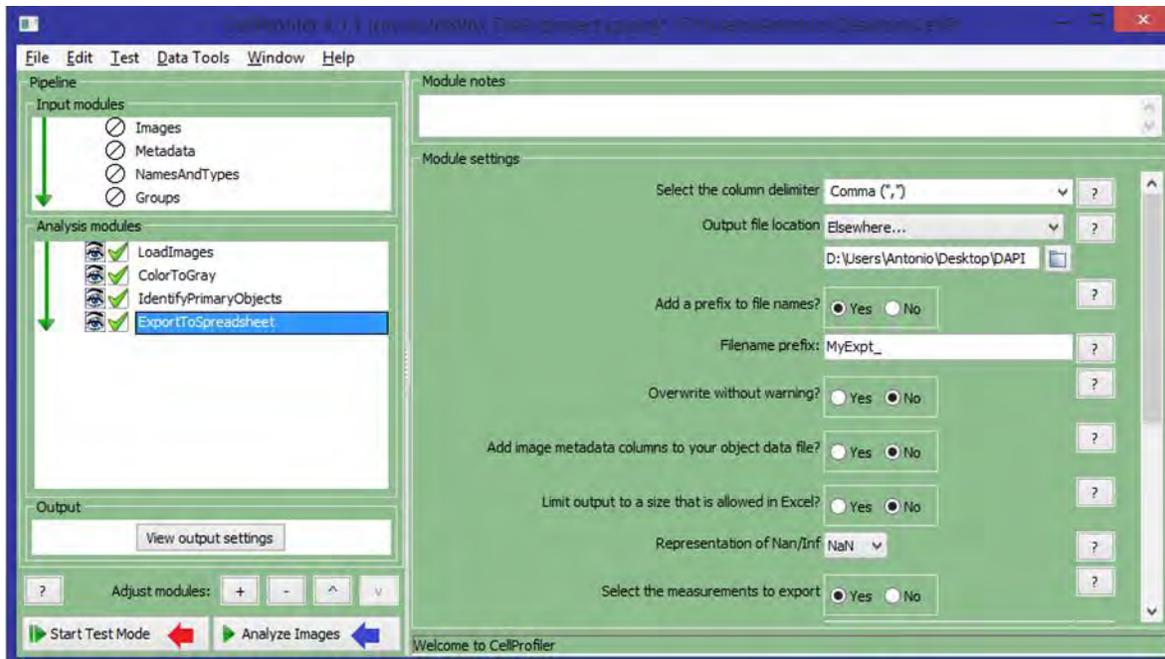
Una primera pantalla permite seleccionar los módulos necesarios según el objetivo del análisis. En este ejemplo, se seleccionó un módulo para recopilar en una sola carpeta directamente los archivos a analizar, especificando una ruta de extracción y los parámetros de identificación de cada imagen (por ejemplo, que el nombre de los archivos deban de contener la leyenda “DAPI” para considerarlos).



El siguiente módulo permite convertir las imágenes a escala de grises (desde RGB) mediante varios métodos que dependerán de la calidad de la captura de la foto (opción señalada en flecha), pudiendo convertir o los tres colores a escala de grises.



El siguiente módulo requiere siempre de una amplia configuración, en la cual se determina el tamaño del objeto a identificar (flecha blanca) y los métodos en los cuales el programa permite la identificación clara de los objetos, dependiendo de la calidad de la imagen y el tamaño o forma del objeto (flechas rojas).



Una vez realizados los ajustes necesarios (de acuerdo a las características particulares de la imagen → identificación de objeto, tamaño, forma, cantidad y tipo de fondo), se procede a especificar una ruta en donde el programa podrá exportar los datos obtenidos del análisis (generados en una hoja de cálculo). Posteriormente, se puede realizar una prueba rápida (flecha roja) para volver a ajustar los parámetros previos o realizar el análisis completo (flecha azul).