



**EL PAPEL DEL LOCUS COERULEUS
EN LA INHIBICIÓN DEL REFLEJO
AUDITIVO DE SOBRESALTO POR UN
ESTÍMULO PREVIO.**

Sebastián Hormigo Muñoz

Directores:

**Dolores E. López García
José de Anchieta de Castro e Horta Júnior**

**TESIS DOCTORAL
Salamanca 2012**



INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Laboratorio de Trastornos audiomotores

EL PAPEL DEL LOCUS COERULEUS EN LA INHIBICIÓN DEL REFLEJO AUDITIVO DE SOBRESALTO POR UN ESTÍMULO PREVIO.

Memoria presentada por Sebastián Hormigo Muñoz para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores:

Dra. M^a Dolores E. López García

Dr. Jose de Anchieta de Castro e Horta Júnior.

Salamanca 2012

Los abajo firmantes, Drs. Dña. M^a Dolores E. López García, del Instituto de Neurociencias de Castilla y León/IBSAL de la Universidad de Salamanca, y D. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, del Instituto de Biociências de Botucatu de la Universidad Estadual Paulista

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado *"El papel del locus coeruleus en la inhibición del reflejo auditivo de sobresalto por un estímulo previo"* ha sido realizado bajo su dirección por el Licenciado Sebastián Hormigo Muñoz, y consideran que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, 14 de Noviembre de 2012.

Fdo:



Dra. M^a Dolores E. López
García

Fdo:



Dr. Jose Anchieta de Castro e Horta Jr.

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto

MICINN #BFU2010-17754

ÍNDICE.

ÍNDICE. *Página 1*

AGRADECIMIENTOS. *Página 7*

ABREVIATURAS. *Página 13*

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS. *Página 15*

1. INTRODUCCIÓN. *Página 19*

1.1 Locus coeruleus. *Página 21*

1.1.1 Generalidades: localización, función y conexiones. *Página 21*

1.1.2 El locus coeruleus como productor de noradrenalina.

Síntesis. *Página 23*

1.1.3 Degeneración del locus coeruleus:
implicaciones funcionales. *Página 24*

1.2 Estado de alerta y reacción de sobresalto. *Página 26*

1.2.1 La inhibición del reflejo de sobresalto por un
estímulo previo. *Página 28*

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS. *Página 31*

DISEÑO EXPERIMENTAL. *Página 35*

2. MATERIAL Y MÉTODOS. *Página 39*

2.1 Animales de Experimentación. Grupos experimentales. *Página 41*

2.2 Técnicas empleadas. *Página 41*

2.2.1 Inyección de trazadores neuronales. *Página 41*

2.2.1.1 Fluoro-Gold. *Página 41*

2.2.1.2 Dextrano amino biotinado. *Página 43*

2.2.2 Lesión Neurotóxica con DSP-4. *Página 43*

2.3 Evaluación del RAS/PPI. *Página 44*

2.3.1 Equipamiento. *Página 44*

2.3.2 Procedimiento. *Página 45*

2.4 Estudios histológicos. *Página 45*

2.4.1 Obtención de muestras para estudios de microscopía. *Página 45*

2.4.2 Visualización de trazadores e inmunohistoquímicas. *Página 46*

2.4.2.1 Dextrano amino biotinado. *Página 46*

2.4.2.2 Técnicas de inmunotinción estándar. *Página 46*

2.4.2.3 Técnicas de inmunotinción específica para visualización
de receptores noradrenérgicos. *Página 47*

2.4.2.4 Experimentos de colocalización. *Página 48*

2.4.3 Tinción con el método Nissl. *Página 49*

2.4.4 Estudio de las secciones histológicas. *Página 49*

2.4.5 Estudios de densidad del inmunomarcaje. *Página 50*

2.4.6	Reconstrucción tridimensional.	<i>Página 51</i>
2.4.7	Morfometría de perfiles neuronales en el LC.	<i>Página 51</i>
2.5	Análisis de expresión génica.	<i>Página 52</i>
2.5.1	Obtención del material biológico.	<i>Página 52</i>
2.5.2	Purificación del RNA.	<i>Página 52</i>
2.5.3	RT-qPCR.	<i>Página 53</i>
2.6	Estudios bioquímicos.	<i>Página 55</i>
2.6.1	Obtención del material biológico.	<i>Página 55</i>
2.6.2	Extracción de catecolaminas.	<i>Página 56</i>
2.6.3	Valoración de los niveles de catecolaminas por HPLC.	<i>Página 56</i>
2.6.4	Determinación de proteínas: método de Bradford.	<i>Página 58</i>
2.7	Análisis Estadísticos.	<i>Página 59</i>
3.	RESULTADOS.	<i>Página 61</i>
3.1	Proyección del locus coeruleus.	<i>Página 63</i>
3.1.1	Inyección de BDA en el locus coeruleus y descripción de la trayectoria de las fibras.	<i>Página 63</i>
3.1.2	Colocalización de fibras noradrenérgicas marcadas con BDA sobre las neuronas de la raíz coclear.	<i>Página 64</i>
3.1.3	Inyección de Fluoro-Gold en la raíz coclear, análisis del marcado retrógrado.	<i>Página 67</i>
3.1.4	Receptores noradrenérgicos en la raíz coclear.	<i>Página 70</i>
3.1.4.1	Inmunohistoquímica.	<i>Página 70</i>
3.1.4.2	Expresión de receptores noradrenérgicos en la región del nervio coclear.	<i>Página 71</i>
3.2	Neuroanatomía del locus coeruleus: dimorfismo sexual.	<i>Página 73</i>
3.2.1	Contaje celular.	<i>Página 74</i>
3.2.2	Reconstrucción tridimensional.	<i>Página 76</i>
3.3	Pérdida de inervación noradrenérgica tras la inyección de DSP-4.	<i>Página 78</i>
3.3.1	Influencia sobre la raíz coclear.	<i>Página 78</i>
3.3.1.1	Inmunohistoquímica de receptores noradrenérgicos: cuantificación densitométrica.	<i>Página 78</i>
3.3.1.2	Expresión de receptores noradrenérgicos.	<i>Página 80</i>
3.3.1.3	Comparación de la expresión de los receptores noradrenérgicos: IHQ vs. RT-qPCR.	<i>Página 83</i>
3.3.2	Influencia noradrenérgica sobre el colículo inferior.	<i>Página 84</i>
3.3.2.1	El locus coeruleus envía proyecciones al colículo inferior.	<i>Página 84</i>
3.3.2.2	Identidad neuroquímica de las fibras terminales del locus coeruleus en el colículo inferior.	<i>Página 86</i>
3.3.2.3	La administración de DSP-4 daña las proyecciones desde el locus coeruleus al colículo inferior.	<i>Página 89</i>
3.4	Estudios de HPLC.	<i>Página 93</i>

3.5 Estudios de modificación de la capacidad sensoriomotora. *Página 95*

4. DISCUSIÓN. *Página 99*

4.1 Consideraciones técnicas. *Página 102*

4.1.1 Trazadores neuronales. *Página 102*

4.1.2 Estimación del número de neuronas del LC. *Página 104*

4.1.3 Técnicas de Biología Molecular. *Página 104*

4.1.4 Técnicas inmunohistoquímicas. *Página 105*

4.2 Organización anatómica del LC. *Página 105*

4.2.1 Inervación noradrenérgica del CI. *Página 106*

4.2.2 Efectos de la pérdida de inervación noradrenérgica provocada por DSP-4. *Página 108*

4.2.3 Papel de los diferentes receptores noradrenérgicos. *Página 110*

4.2.4 Implicaciones funcionales de la proyección del locus coeruleus a los núcleos del reflejo de sobresalto. *Página 112*

CONCLUSIONES. *Página 119*

BIBLIOGRAFÍA. *Página 123*

AGRADECIMIENTOS.

¿Qué se puede decir para agradecer el trabajo y el apoyo de tantas y tantas personas que han hecho posible la culminación de una tesis de doctorado, sin las cuales esta empresa no hubiera sido posible? Quiero empezar dedicando unas palabras de gratitud para mi directora, la Dra. López, Lita para los amigos. Ella ha sido el principal artífice y motor de mi carrera profesional; y no sólo eso, también me ha brindado un apoyo personal impagable. Me siento profundamente en deuda con ella y simplemente decirle que algún día me gustaría corresponderle.

En segundo lugar, también me gustaría agradecer la confianza depositada en mí por parte de mi codirector, Anchieta. No es una exageración cuando digo que gran parte de las metodologías que he aprendido a lo largo de estos cuatro años han sido gracias a él, aún estando físicamente tan lejos.

El laboratorio ha sido una fuente de motivación –y a veces de sinsabores- que sin duda me ha ayudado a crecer profesionalmente y a madurar. Quiero hacer una mención especial hacia Orlando y Richard, cuyos consejos y soporte han sido fundamentales estos años. No me quiero olvidar de Lymarie, Biviana, Kira, Inés, Sonia, David y Alberto, por estar presentes durante la realización de los experimentos compartiendo experiencias.

El INCYL ha sido mi casa durante cuatro años. Agradezco el apoyo técnico o personal que alguna vez he recibido de sus integrantes, especialmente de Miguel Merchán, Raquel Rodríguez, Manolo Malmierca, Enrique Saldaña, Enrique López Poveda, Consuelo Sancho, Javier Herrero, Ana Velasco, Verónica González, Nacho Plaza, Antonio Cardoso, Carlos Moreno, Marco Izquierdo, Marcelo Gómez y Daniel Duque. No me quiero olvidar de César Raposo, de la Facultad de Ciencias Químicas, por ayudarme a poner a punto mis experimentos de bioquímica. Quisiera resaltar el magnífico recibimiento que tuve en mi estancia predoctoral en el Instituto de Biociencias de Botucatu, São Paulo, Brasil. Quiero dar las gracias a todo el personal, principalmente a los del Departamento de Anatomía Humana, pues me acogieron con los brazos abiertos, e hicieron que el estar tan lejos de mi familia y amigos mereciera la pena.

Por último, agradecer a mi familia, pues su aliento no me ha faltado nunca en esta dura travesía. A mis padres, a mis hermanos, a Sofi, a Candi y a Antonio.

Muchas gracias a todos.

A las mujeres de mi vida...

ABREVIATURAS.

ABC: complejo avidina biotina-peroxidasa; **ADRs:** receptores noradrenérgicos; **Amu:** unidad de masa atómica; **Asc7:** fibras ascendentes del nervio facial; **Aq:** Acueducto; **BDA:** dextrano amino biotinado; **BO:** bulbo olfatorio; **CaBP:** calbindina D28K; **Cb:** cerebelo; **CDCI:** corteza dorsal del colículo inferior; **cdNA:** DNA complementario a una hebra de RNA; **CI:** colículo inferior; **CLCI:** corteza lateral del colículo inferior; **COMT:** catecol-O-metil transferasa; **CPF:** corteza prefrontal; **Ct:** ciclo umbral; **DA:** dopamina; **DAB:** 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobenzidina; **DBH:** dopamina beta-hidroxilasa; **DC:** núcleo coclear dorsal; **DHBA:** 3,4-dihidroxibenzilamina; **DNLL:** núcleo dorsal del lemnisco lateral; **DOPA:** 3,4-dihidroxifenilalanina; **DOPAC:** ácido 3,4-dihidroxifenilacético; **DPGi:** núcleo paragigantocelular dorsal; **DSP-4:** N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina; **FG:** Fluoro-Gold®; **Gi:** núcleo reticular gigantocelular; **Gia:** núcleo reticular gigantocelular, parte alfa; **HPAA:** ácido 4-hidroxifenilacético; **HPLC-MS:** cromatografía líquida de alta eficacia – espectrometría de masas; **HVA:** ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético; **I.A.:** nivel interaural; **icp:** pedúnculo cerebelar inferior; **IHQ:** inmunohistoquímica; **ir:** inmunorreactividad; **IS:** sitio de inyección; **ISI:** intervalo inter-estímulo; **LC:** locus coeruleus; **LDTg:** núcleo tegmental laterodorsal; **LPGi:** núcleo paragigantocelular lateral; **LVe:** núcleo vestibular lateral; **MAO:** monoamino-oxidasa; **MHPG:** 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; **ml:** lemnisco medial; **mlf:** fascículo longitudinal medial; **MNTB:** núcleo medial del cuerpo trapezoide; **MVe:** núcleo vestibular medial; **NA:** noradrenalina; **NCCI:** núcleo central del colículo inferior; **NRC:** núcleo de la raíz coclear; **n.s.:** no significativo; **PB:** tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4; **PBS:** tampón fosfato salino; **PCRt:** núcleo reticular parvicelular; **PnC:** núcleo reticular caudal del puente; **PNMT:** feniletanolamina N-metiltransferasa; **PnO:** núcleo reticular del puente, parte oral; **PPI:** inhibición del RAS por un estímulo previo (pre-pulse inhibition); **PPTg:** núcleo tegmental pedúnculo-pontino; **PR:** área prerrubral; **py:** tracto piramidal; **RAS:** reflejo acústico de sobresalto; **RIN:** número de integridad del RNA; **RT-qPCR:** transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; **SNR:** sustancia negra, pars reticulata; **SP5:** núcleo trigeminal spinal; **sp5:** tracto trigeminal espinal; **SuVe:** núcleo vestibular superior; **TE:** tronco del encéfalo; **TH:** tirosina hidroxilasa; **Tx:** Tritón X-100; **tz:** cuerpo trapezoide; **VCP:** núcleo coclear ventral posterior; **VMA:** ácido 4-hidroxi-3-metoximandelico; **VNLL:** núcleo ventral del lemnisco lateral; **VNTB:** núcleo ventral del cuerpo trapezoide.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

- Figura 1. Neuronas noradrenérgicas en el sistema nervioso central.
- Figura 2. Ruta de biosíntesis y degradación de catecolaminas.
- Figura 3. Circuito del reflejo de sobresalto en rata.
- Figura 4. Representación esquemática de la inhibición del RAS por un estímulo previo.
- Figura 5. Diseño experimental.
- Figura 6. Equipo de medición del reflejo auditivo de sobresalto.
- Figura 7. Análisis espectrográfico del RNA para medir su concentración.
- Figura 8. Columnas y detección de los compuestos catecolaminérgicos.
- Figura 9. Dibujos en cámara clara de secciones coronales tras inyección de BDA en el locus coeruleus.
- Figura 10. Input noradrenérgico desde el locus coeruleus hacia las neuronas de la raíz coclear.
- Figura 11. Colocalización de fibras inmunorreactivas para TH y para DBH en la raíz coclear.
- Figura 12. Lugares de inyección de Fluoro-Gold en la raíz.
- Figura 13. Mapeo de las neuronas marcadas retrógradamente tras la inyección de Fluoro-Gold en la raíz coclear.
- Figura 14. Fotomicrografías del locus coeruleus marcado con Fluoro-Gold tras la inyección de trazador en la raíz coclear.
- Figura 15. Fotomicrografías de la inmunotinción para los receptores noradrenérgicos en la raíz coclear.
- Figura 16. Expresión de mRNA para los receptores noradrenérgicos.
- Figura 17. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a las hembras.
- Figura 18. Configuración citoarquitectónica del locus coeruleus.
- Figura 19. Estimación del número de neuronas en el locus coeruleus.
- Figura 20. Reconstrucción tridimensional del locus coeruleus.
- Figura 21. Número de neuronas en la extensión del locus coeruleus.
- Figura 22. Patrón de distribución de inmunoreactividad de los diferentes receptores noradrenérgicos.
- Figura 23. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a los machos controles.
- Figura 24. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a las hembras controles.
- Figura 25. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a las hembras tratadas con DSP-4.
- Figura 26. Áreas objetivo y patrón de proyección de las fibras del locus coeruleus dentro del colículo inferior.
- Figura 27. Colocalización de las fibras del locus coeruleus con la tirosina hidroxilasa en la corteza dorsal del colículo inferior.
- Figura 28. Colocalización de las fibras del locus coeruleus con la dopamina beta-hidroxilasa en la corteza dorsal del colículo inferior.
- Figura 29. Distribución de fibras inmunomarcadas para tiroxina hidroxilasa y dopamina beta-hidroxilasa en el colículo inferior.
- Figura 30. Efectos de la administración de DSP-4 en la inmunohistoquímica del locus coeruleus (tirosina hidroxilasa y dopamina beta-hidroxilasa). Comparativa con los controles negativos del locus coeruleus y del colículo inferior.
- Figura 31. Efectos de la administración de DSP-4 en la inmunoreactividad para TH dentro del colículo inferior.
- Figura 32. Efectos de la administración de DSP-4 en la inmunoreactividad para DBH dentro del colículo inferior.
- Figura 33. Datos obtenidos de la espectrometría de masas.
- Figura 34. Representación de los cambios en la concentración de los compuestos catecolaminérgicos causadas por DSP-4.
- Figura 35. Representación del Reflejo auditivo de sobresalto: amplitud y latencia.
- Figura 36. Inhibición por un estímulo previo: valores según el intervalo entre estímulos.
- Figura 37. Latencia de los estímulos que desencadenan la inhibición prepulso.

Figura 38. Esquema básico del circuito de la PPI.

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones usados en los protocolos de inmunohistoquímica.

Tabla 2. Cebadores de PCR utilizados para la técnica de análisis de expresión génica.

Tabla 3. Programa de HPLC.

Tabla 4. Eficiencias de los cebadores utilizados en las PCR cuantitativas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Locus coeruleus.

1.1.1 Generalidades: localización, función y conexiones.

El locus coeruleus (LC) es un núcleo localizado en la sustancia gris central de la protuberancia (parte dorsal), debajo del epéndimo del IV ventrículo. Fue descrito por primera vez en 1809 por el neuroanatomista alemán Johann C. Reil, pero no fue hasta 1812 cuando los hermanos Wenzel acuñaron el término, derivado del latín, que significa *núcleo celeste*, llamado así por su tono azulado en tejidos humanos frescos (Toshihiro, 2000). El LC está involucrado en muchos de los efectos simpáticos asociados al estrés debido a la producción de una catecolamina, la noradrenalina (NA). La mitad de las neuronas noradrenérgicas del encéfalo están encerradas en este núcleo y es el origen de la mayor parte de las aferencias noradrenérgicas al cerebro (Aston-Jones y George, 2004). Morfológicamente, las neuronas catecolaminérgicas presentan varicosidades a lo largo de sus axones (botones de paso), además de un área de liberación en su extremo (botones terminales). El transmisor se libera por las varicosidades y difunde por el espacio extracelular hasta que encuentra un receptor, consiguiendo de esta manera abarcar una extensa zona de tejido (Cooper y cols., 2002; Siegel y cols., 1998).

Sus proyecciones alcanzan muchas áreas en el prosencéfalo, cerebelo y médula espinal. Esta red le da al LC la capacidad anatómica de integrar la actividad funcional de muchas regiones cerebrales e influir en la función cerebral y su reactividad, en forma muy importante. Uno de los lugares de proyección menos conocido del LC es el núcleo de la raíz coclear (NRC) (Gómez-Nieto y cols., 2008b), en el que se encuentran las neuronas de la raíz coclear, descritas en varias especies de roedores (López y cols., 1993) y que constituyen el primer eslabón del circuito auditivo de sobresalto.

El LC recibe aferencias de muchas o posiblemente todas las modalidades sensoriales de la periferia, únicamente a través de dos núcleos del tronco encéfalo: el núcleo paragigantocelular (PGi) y el núcleo accesorio del hipogloso (PrH) (Aston-Jones y cols., 1991). El LC es influido por dos clases de aferencias con sus respectivos grupos de neuronas: aferencias excitatorias que median actividad evocada sensorialmente y aferencias tónicamente inhibitorias según el estado de alerta y la conducta del momento. Posiblemente, estas aferencias provengan del núcleo PGi y PrH respectivamente (Aston-Jones y cols., 1991).

El LC es activado por el dolor (Singewald y cols., 1995; Couto y cols., 2006; Tsuruoka y cols., 2011), estímulos fisiológicos como la hipotensión, pérdida de sangre, hipoxia o la estimulación visceral (Miao-Kun, 1995; Ma y cols., 2008), y rara vez es excitado por estímulos vegetativos no amenazantes. El LC participa también en la regulación del ritmo circadiano (Aston-Jones y Bloom, 1991), en el mantenimiento del estado de alerta a estímulos ambientales relevantes (Aston-Jones y cols., 1991) y en procesos de atención (Aston-Jones y cols., 1999) y aprendizaje (Sara y Segal, 1991; Sullivan y cols., 1994).

La activación del LC parecer ser un componente integral del estrés, registrándose un aumento de la actividad electrofisiológica de las neuronas de este núcleo ante varios estímulos estresantes (Valentino y cols., 1983; Page y cols., 1992; Valentino y Van Bockstaele, 2008), aumentando también la degradación de la NA en diversas regiones cerebrales para las cuales el LC es la única fuente de NA, e incrementándose los niveles de tirosina hidroxilasa (TH), enzima involucrada en la síntesis de NA (Unemoto y cols., 1994).

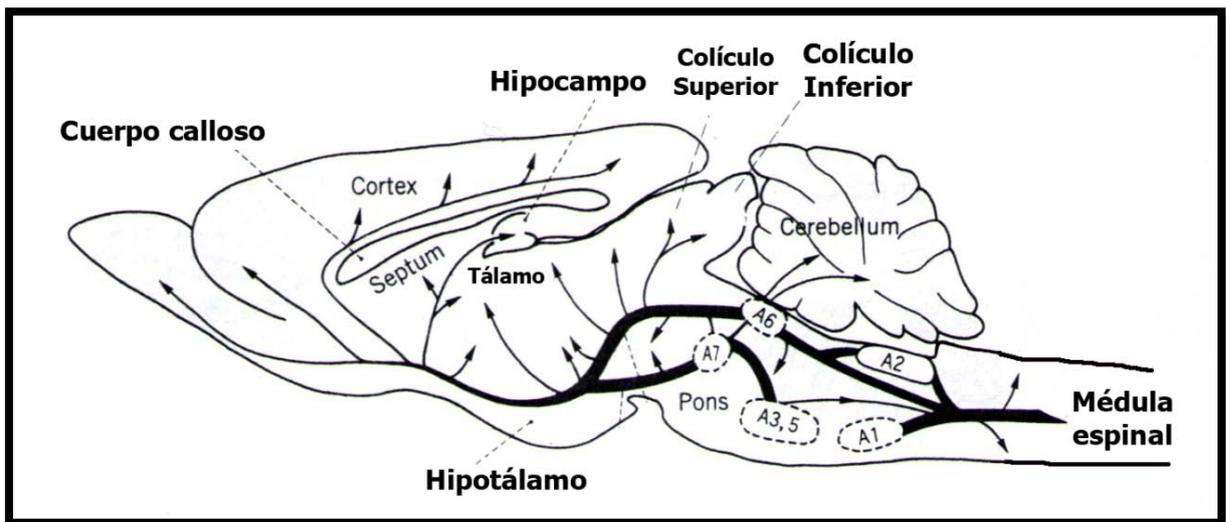


Figura 1. Neuronas noradrenérgicas en el sistema nervioso central de la rata.
 Modificado de Tohyama, M. K. Takatsuji (1998). *Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat*. Oxford, Oxford University Press., página 32.

1.1.2 El locus coeruleus como productor de noradrenalina. Síntesis.

Las rutas de biosíntesis de las catecolaminas (Figura 2) y su regulación en el sistema nervioso son bien conocidas (Osborne, 1994; Cooper, 1997; Koeppen, 2000). Estas vías metabólicas se pueden regular de forma muy fina cuando se da un aumento en la demanda de síntesis de NA por ejemplo en una situación de estrés (Rosario y Abercrombie, 1999; Asakura y cols., 2000) o durante la detección de estímulos novedosos (Foote y cols., 1980; Grant y cols., 1988). El aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) se transforma en dopamina (DA) por la enzima DOPA-descarboxilasa y la catecolamina DA se transforma en NA por la enzima dopamina beta-hidroxilasa (DBH). Dos enzimas más inactivan estos compuestos catecolaminérgicos a través de dos vías metabólicas diferentes, la monoamino-oxidasa (MAO) y la catecol-O-metil-transferasa (COMT). De la DA, por acción de la MAO se obtiene el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y por la COMT se obtiene el ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (HVA). De la NA, por acción de la MAO se obtiene el ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico (VMA) y por la COMT se obtiene el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG). Tanto la MAO como la COMT se expresan en el LC (Jonsson y Sachs, 1976; Cooper y cols., 2003) y en otras áreas que son inervadas por el LC en el tronco del encéfalo y en el resto del cerebro (Robinson y cols., 1977; Hansson, 1984; Hsu, 1984; Buu, 1985; Hu y Robinson, 1988; Huotari y cols., 2002). La presencia de la enzima DBH indica síntesis de NA o adrenalina dentro de las vesículas sinápticas del terminal pre-sináptico, pero sólo la presencia de la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) discrimina la síntesis de adrenalina.

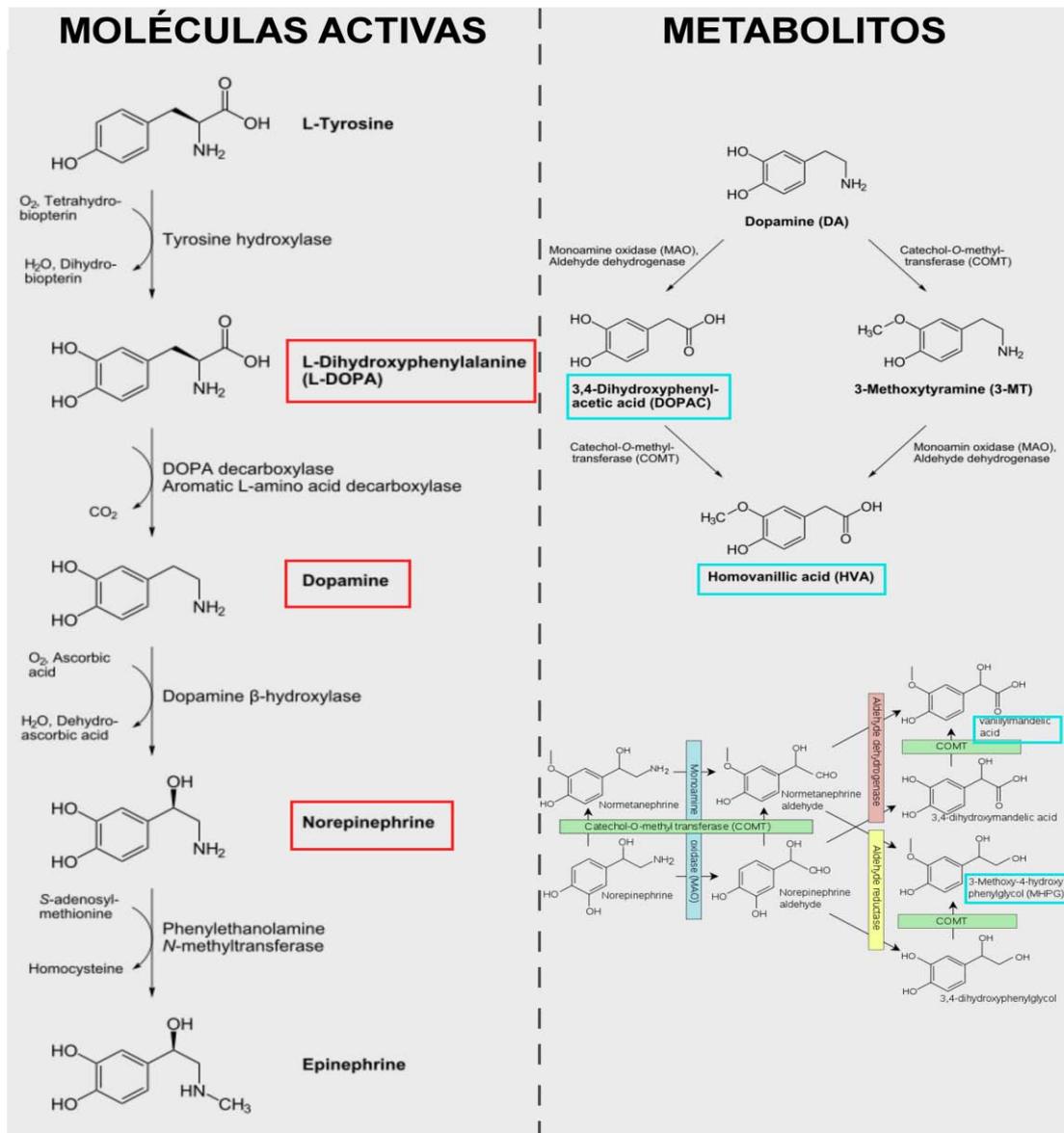


Figura 2. Ruta de biosíntesis y degradación de catecolaminas.

En la parte izquierda de la imagen, la biosíntesis de las aminas biógenas de interés en nuestro estudio (rodeadas en rojo). En la derecha, la ruta de degradación de la dopamina y la noradrenalina (los compuestos de interés han sido rodeados en azul). Modificado de "The biochemical basis of neuropharmacology", de Cooper, Bloom y Roth. Ed. Oxford University Press, New York, 1997.

1.1.3 Degeneración del locus coeruleus: implicaciones funcionales.

Se han relacionado disfunciones del LC o bajos niveles de NA con diversos trastornos neurológicos como epilepsia (Mishra y cols., 1994), enfermedad de Parkinson (Braak y cols., 2003) o enfermedad de Alzheimer; también con trastornos psiquiátricos, como la depresión, y con otras patologías asociadas al alcoholismo (Aston-Jones y cols., 1982) o al síndrome de privación de estupefacientes (Gold, 1993). En ratas, lesiones del

LC producen una menor actividad locomotora y de la actividad exploratoria, lo que indica un rechazo a estímulos nuevos (neofobia) y una disminución de las tendencias de escape, es decir, menor reactividad frente a estímulos estresantes (Velley y cols., 1991).

Experimentalmente, el LC puede bloquearse o inactivarse total o parcialmente con el DSP-4, [N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina], neurotoxina potente y altamente selectiva de neuronas noradrenérgicas centrales y periféricas. En roedores, una simple inyección sistémica de DSP-4 (Ross y cols., 1973) produce una reducción duradera en los niveles de NA, en la capacidad de recepción de NA y en la actividad de la DBH en el cerebro y en la médula espinal. Mediante estudios inmunocitoquímicos, se ha comprobado que el DSP-4 causa la degeneración de los axones noradrenérgicos en el sistema nervioso central (Fritschy y Grzanna, 1989). Los efectos neurotóxicos del DSP-4 no son uniformes en todas las regiones cerebrales, siendo la reducción de los niveles de NA y la pérdida de adrenoceptores más extensas en las regiones inervadas por los axones noradrenérgicos de las neuronas que provienen del LC que en las regiones inervadas por células noradrenérgicas que no provienen de este núcleo. No se conoce la razón para esta aparente vulnerabilidad selectiva de los axones noradrenérgicos del LC, pero proporciona un arma muy eficaz para la destrucción específica de estos axones (Grzanna y cols., 1989; Fritschy y Grzanna, 1989), aunque otros autores (Jonsson y cols., 1982) describen que el DSP4 también destruye axones noradrenérgicos no provenientes del LC, pero a un nivel mucho más bajo, lo que reflejaría dos subsistemas noradrenérgicos (LC y las neuronas NA no-LC), que difieren no sólo en sus proyecciones, sino también en las propiedades farmacológicas de los terminales axónicos.

Los efectos de la administración del DSP-4 en el comportamiento de las ratas se manifiestan en neofobia, emocionalidad incrementada (mayor número de actividades de aseo y deposiciones), comportamiento defensivo o sumiso y una carencia de miedo hacia los factores medioambientales (Spyraki y cols., 1982; Delini-Stula y cols., 1984; Cornwell-Jones y cols., 1992; Harro y cols., 1995; van den Buuse y cols., 2001).

Se ha comprobado la degeneración del LC producida por este neurotóxico realizando registros electrofisiológicos en las neuronas del LC, encontrándose que el promedio de la tasa de disparo neuronal en los animales tratados disminuyó al 50% a los 10 días después de la administración de DSP-4 (Olpe y cols., 1983). Los efectos del DSP-4 se han correlacionado con el descenso en la concentración de NA y su

metabolito MHPG-SO₄ en seis regiones cerebrales de ratas, siendo la dosis umbral más efectiva la de 50 mg/kg (Logue y cols., 1985). Curiosamente, las fibras del LC se regeneran después de ser dañadas (van Dongen, 1981), existiendo fármacos específicos que presentan un efecto neuroprotector sobre los cuerpos celulares noradrenérgicos del LC tras la administración sistémica de DSP-4, como son el *R(-)-deprenil* y el *IV-2-hexil-IV-metilpropargilamina*, que previenen la degeneración retrógrada de los axones noradrenérgicos, haciendo que el 88-90% de la neuronas noradrenérgicas del LC se regeneren a los tres meses después de la exposición a DSP-4 (Zhang y cols., 1995).

1.2 Estado de alerta y reacción de sobresalto.

La atención es un proceso heterogéneo que acompaña las funciones ejecutivas, la atención selectiva, la alerta y la vigilancia (Jennings, 1999). La alerta y la vigilancia son facetas del comportamiento y la cognición que, en sí mismas, no implican ninguna selección previa de priorización de los estímulos (Thiel y Fink, 2007), por lo que constituyen procesos de atención no selectiva, e integran conceptos como estado de alerta y *arousal* (Thiel y Fink, 2007). La reacción de sobresalto por un estímulo auditivo intenso es un ejemplo de fenómeno atencional no-selectivo (Bakker y cols., 2006).

La reacción de sobresalto se desencadena por múltiples estímulos, entre ellos el sonido, dando lugar al reflejo auditivo de sobresalto (RAS), el cual es una corta pero intensa reacción motora que involucra la contracción de un gran número de músculos en todo el cuerpo en respuesta a un estímulo acústico fuerte e inesperado. Además de esto, el RAS conlleva también una respuesta vegetativa mediada por el sistema nervioso autónomo, como es evidente por el incremento en la presión sanguínea y el ritmo cardíaco (Landis y Hunt, 1939; Baudrie y cols., 1997). El RAS es un reflejo de corte defensivo originado desde el tronco del encéfalo contra posibles agresiones o como una señal de alerta contra eventos inesperados (Keay y cols., 1988). Por lo tanto, una vía primaria de sobresalto acústico debe ser un circuito simple y de hecho tan sólo está formado por tres sinapsis en el sistema nervioso central: las neuronas del NRC (1), las neuronas del núcleo reticular caudal del puente (PnC) (2) y las motoneuronas espinales (3) (Figura 3) (Lee y cols., 1996). El PnC es el principal centro de convergencia de estímulos sensoriales y un elemento fundamental del circuito del RAS (Davis y cols.,

1982; Koch y cols., 1992; Lingenhöhl y Friauf, 1994). La conexión entre las neuronas de la raíz coclear y el PnC es la principal responsable del envío de información auditiva al PnC (López y cols., 1999; Nodal, 1999; Nodal y López, 2003) y posee una importancia fundamental para la existencia del reflejo (Lee y cols., 1996).

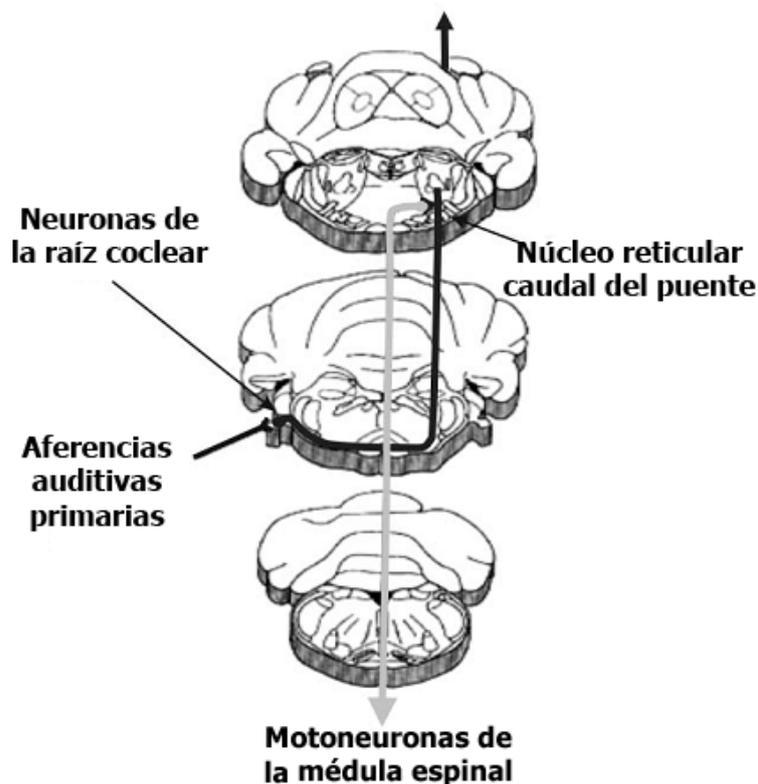


Figura 3. Circuito del reflejo de sobresalto en rata.

Representación esquemática del circuito básico del reflejo auditivo de sobresalto en la rata. La estimulación acústica entra al sistema nervioso central a través de las aferencias auditivas primarias que sinaptan con las neuronas de la raíz coclear; desde aquí, el estímulo viaja hacia el núcleo reticular caudal del puente del lado contralateral y finalmente llega a las motoneuronas de la médula espinal. Modificado de Lee y cols., 1996.

La medición del RAS nos da una idea del estado de normofuncionalidad del sistema nervioso (Swerdlow y cols, 2007), constituyendo una herramienta cada vez más empleada por su fiabilidad, sencillez y economía, no sólo en la investigación básica, sino también en la práctica clínica (Martinez y Geyer, 1997; Kumari y cols., 2000). La medición del reflejo es un fenómeno constante y universal, que no depende del aprendizaje, pero que varía al modificarse las condiciones de la prueba.

1.2.1 La inhibición del reflejo de sobresalto por un estímulo previo.

Una de las modificaciones más interesantes del RAS es la inhibición por un estímulo previo (PPI, de sus siglas en inglés, *pre-pulse inhibition*). Cuando un sonido o un ruido que normalmente desencadena el RAS viene precedido (entre 30 y 500 ms) por otro estímulo sensorial (visual, acústico o táctil), la respuesta de sobresalto es menos pronunciada, o incluso abolida (Figura 4) (Valls-Solé, 1998; Valls-Sole, 2012). La PPI está directamente relacionada con los mecanismos sensoriomotores, procesos automáticos por los cuales el cerebro ajusta su respuesta a diferentes estímulos para evitar la sobrecarga y la pérdida de atención (Valls-Sole, 2012). Este mecanismo adaptativo previene la sobre-estimulación, ayudando al cerebro a centrarse en un estímulo en concreto de entre una multitud de otros distractores indicando indirectamente la capacidad de procesamiento de la información que tiene el sistema nervioso central. Aunque la PPI no es un proceso estrictamente cognitivo, sí hay una relación entre PPI y procesamiento cognitivo, de forma que una alteración de la PPI conlleva o predice alteraciones cognitivas (Geyer., 2006) ya que el proceso inhibitorio que refleja la PPI implica un filtro sensorial de la información irrelevante, que evita la fragmentación cognitiva (Braff y cols., 1978).

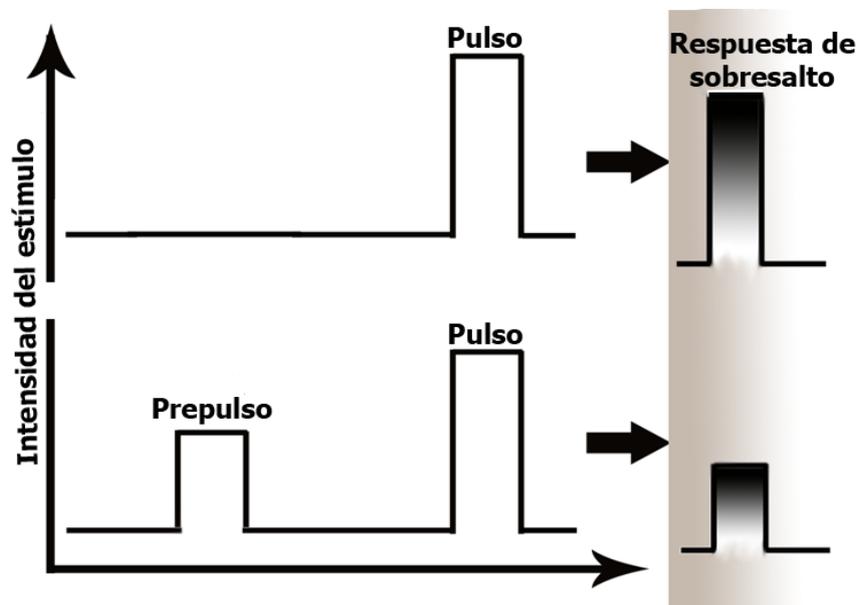


Figura 4. Representación esquemática de la inhibición del RAS por un estímulo previo. Cuando se presenta un sonido fuerte e inesperado, se produce el reflejo de sobresalto. Sin embargo, cuando éste mismo estímulo es precedido por otro de menor intensidad que no desencadena el sobresalto, la respuesta se mitiga, o incluso puede llegar a desaparecer.

Se ha descrito que las distintas intensidades del prepulso y los cambios en los intervalos entre-estímulos (ISI, de sus siglas en inglés, *inter-stimulus interval*) entre prepulso y pulso, originan diferentes grados de inhibición (Swerdlow y cols., 1993; Swerdlow y cols., 2000; Swerdlow y cols., 2001; Valls-Sole, 2004a, b).

Las interacciones neurales que median la PPI aún no han sido totalmente esclarecidas. Existen datos suficientes para creer que los circuitos que subyacen a la PPI radican en el tronco del encéfalo ya que este fenómeno está presente en animales previamente descerebrados por sección a nivel del polo anterior de colículo superior (Davis y Gendelman, 1977; Li y Frost, 2000). Entre las estructuras que intervienen en este proceso se incluyen los colículos inferior y superior, los núcleos tegmentales pedunculopontino y laterodorsal, la porción reticulada de la sustancia negra y el núcleo reticular pontino caudal (Fendt y cols., 2001), además de otros núcleos auditivos, como el núcleo ventral del cuerpo trapezoide en el desencadenamiento de la PPI ante ISIs cortos (Gómez-Nieto y cols., 2010).

Por otro lado, el colículo inferior (CI) (principal núcleo mesencefálico de integración auditiva) participa de manera directa en la modulación del circuito de inhibición del RAS (Fendt y cols., 2001; Gómez-Nieto y cols., 2010). Al estar el LC y el CI conectados recíprocamente (Klepper y Herbert, 1991; Freitas y cols., 2005), nos lleva a cuestionarnos la posible participación del LC en el circuito de la PPI. No obstante, aún se conoce muy poco sobre el patrón de eferencias y sobre las áreas de proyección del LC dentro del CI.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

El locus coeruleus proporciona la mayor fuente de noradrenalina en el cerebro y está relacionado con la detección de estímulos novedosos y del estado de alerta. El reflejo de sobresalto por un estímulo auditivo intenso nos permite evaluar el estado de alerta de un individuo. Al estar el locus coeruleus y el colículo inferior conectados recíprocamente, siendo el colículo inferior un elemento clave en la modulación del reflejo de sobresalto, nos lleva a cuestionarnos la posible participación del locus coeruleus en los circuitos neurales de modulación del reflejo auditivo de sobresalto. De una parte, queremos explorar la posible conexión noradrenérgica entre el locus coeruleus y el núcleo de la raíz coclear para encuadrar al locus coeruleus dentro del circuito del reflejo auditivo de sobresalto y/o de su inhibición por un estímulo previo. Por otro lado, si establecemos una correlación experimental entre la pérdida de neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus y modificaciones en el reflejo auditivo de sobresalto o en sus modulaciones, estableceríamos el papel del locus coeruleus en el proceso. De otra parte, queremos ahondar en la conexión existente entre el locus coeruleus y el colículo inferior, para así poder objetivar si el locus coeruleus participa también en la modulación del reflejo de sobresalto directamente o por su proyección al colículo inferior.

La noradrenalina es un excelente modulador neuronal y, por las peculiaridades de las fibras noradrenérgicas, difunde por el espacio extracelular hasta que encuentra un receptor, consiguiendo de esta manera abarcar una extensa zona de tejido. Existe una gran familia de receptores de membrana sobre los que ésta es capaz de actuar, por lo además de estudiar las conexiones anatómicas del locus coeruleus con los núcleos relacionados con el circuito de sobresalto, es fundamental estudiar también la presencia en estos núcleos de los receptores noradrenérgicos.

Para ello, en el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1-Estudiar la conexión entre el locus coeruleus y el circuito básico del reflejo auditivo de sobresalto en la rata.
- 2-Estudiar los receptores noradrenérgicos presentes en el núcleo de la raíz coclear.
- 3-Establecer el papel de la proyección noradrenérgica del locus coeruleus en el reflejo auditivo de sobresalto y en su inhibición por un estímulo previo.
- 4-Estudiar las modificaciones de las aferencias noradrenérgicas y receptoriales en el circuito de sobresalto tras lesionar el locus coeruleus en la rata.
- 5- Estudiar las características de la proyección del locus coeruleus al colículo inferior.

DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para establecer la posible correlación anatómica entre el locus coeruleus y los núcleos relacionados con el circuito de sobresalto y/o de la inhibición por un estímulo previo en animales de experimentación (objetivo 1), realizaremos inyecciones estereotáxicas de trazadores en el locus coeruleus (anterógrados) y en la raíz coclear (retrógrados).

Para estudiar los receptores noradrenérgicos en la raíz coclear (objetivo 2), realizaremos un estudio del patrón de distribución de inmunorreactividad con respecto a las diferentes subunidades noradrenérgicas dentro de este núcleo. También, evaluaremos la expresión de los genes que codifican los diferentes receptores noradrenérgicos en el núcleo de la raíz coclear mediante estudios de PCR cuantitativa.

Para poder establecer la relación funcional del locus coeruleus con los procesos de sobresalto, procederemos a su destrucción selectiva con un neurotóxico (DSP-4), valorando los posibles cambios en el reflejo auditivo de sobresalto y en la inhibición por un estímulo previo (objetivo 3). Como mecanismo de control del grado de destrucción de locus coeruleus, mediremos los cambios en los niveles de noradrenalina (y su metabolitos) por HPLC y las variaciones inmunohistoquímicas en las regiones que inerva el locus coeruleus. Otra manera de verificar la destrucción del locus coeruleus la obtendremos al estudiar las variaciones en los niveles de expresión génica de los receptores noradrenérgicos en el primer núcleo del circuito del reflejo de sobresalto (objetivo 4) por técnicas de RT-qPCR.

Finalmente, estudiaremos la inervación noradrenérgica del locus coeruleus a lo largo de toda la extensión rostrocaudal del colículo inferior y en sus subdivisiones (objetivo 5). Para ello, emplearemos técnicas de trazado combinadas con inmunohistoquímica, junto con estudios de densitometría y de colocalización inmunohistoquímica de enzimas catecolaminérgicas en ratas controles y tratadas con DSP-4.

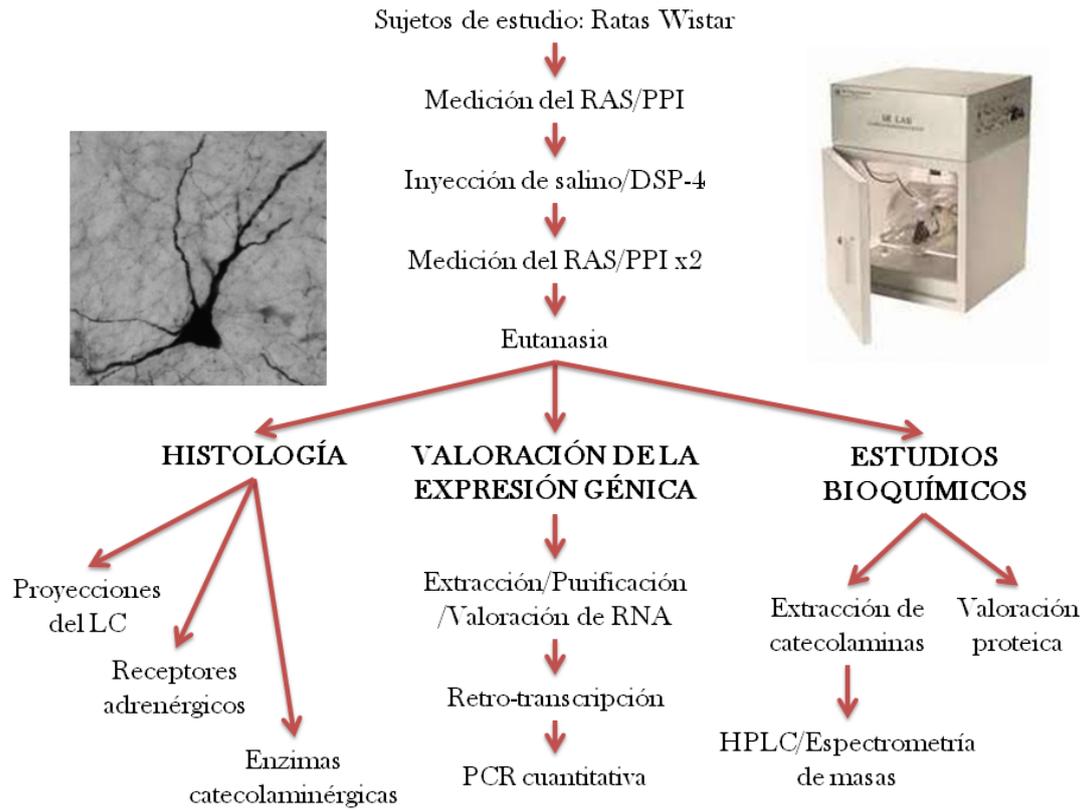


Figura 5. Diseño experimental.

Esquema resumen de los pasos seguidos en este estudio para alcanzar los objetivos planteados.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Animales de Experimentación. Grupos experimentales.

En este estudio, empleamos un total de 199 ratas albinas adultas (*Rattus norvegicus*, de la línea Wistar), con pesos comprendidos entre 230-300 g (Charles River, Barcelona, España). Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las directrices para el uso y cuidado de animales de laboratorio de la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (DOCE L222; 24-08-1999) y también por aquellas establecidas por el Gobierno de España (RD 1201 / 2005). Los animales fueron alojados en grupos de dos o tres para fomentar su conducta social. Los animales sometidos a cirugía fueron alojados individualmente después de ésta, para evitar posibles conflictos. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

Diseñamos un estudio prospectivo para conseguir los diferentes objetivos; en un primer paso, estudiamos los parámetros del RAS en los grupos controles y tratados con DSP-4 de ambos sexos; a continuación, los animales fueron divididos en diferentes subgrupos dependiendo de su propósito: para el estudio de la proyección del LC hacia el NRC o el CI, para la determinación de la morfología del LC y su dimorfismo sexual, para el examen inmunohistoquímico de TH y DBH, para el análisis de la expresión génica de los receptores noradrenérgicos (ADRs, de sus siglas en inglés, *adrenergic receptors*) o para la cuantificación bioquímica de los compuestos catecolaminérgicos.

2.2 Técnicas empleadas.

2.2.1 Inyección de trazadores neuronales.

2.2.1.1 Fluoro-Gold.

Inyectamos a 22 animales el trazador retrógrado Fluoro-Gold® (Fluorochrome, Denver, CO, USA) en la raíz coclear. Los animales se anestesiaron mediante la administración intramuscular de una mezcla de xilacina (7 mg/kg) y ketamina (40 mg/kg), suministrando anestesia adicional durante la cirugía (un quinto de la dosis inicial) cuando fue necesario. Una vez anestesiados, se rasuró la porción parietal de la cabeza y cada animal fue posicionado en el aparato estereotáxico (#963, David Kopf

Instruments). El campo operatorio fue tratado con antiséptico con base de yodo (1% de yodo activo, Dermoiodine®, Lever Industrial Int.) y los ojos mantenidos húmedos con suero fisiológico durante todo el procedimiento. La altura del apoyo incisal del aparato estereotáxico fue ajustada a 3,3 mm debajo de la línea interauricular de forma que los puntos craneométricos Bregma y Lambda estuviesen en el mismo plano horizontal (Paxinos y Watson, 2005). Se realizó una incisión sagital media de aproximadamente 3 cm en la cabeza del animal desde el punto Bregma hasta la región cervical. Los tejidos que recubren el cráneo, incluyendo el periostio, fueron abiertos lateralmente con bastones de algodón exponiendo los parietales y el hueso occipital.

Para la inyección de FG en la raíz coclear, fueron confeccionadas micropipetas de vidrio con punta de diámetro interno variando entre 20 y 40 μm , a partir de tubos capilares de vidrio borosilicato (#1B150F-4, World Precision Instruments), estirados verticalmente con equipamiento específico (estirador de pipetas vertical, #720, David Kopf Instruments). Las coordenadas estereotáxicas fueron ajustadas en relación con la línea interauricular, teniendo la micropipeta de vidrio fijada al manipulador de electrodos y con ayuda de un calibrador de ángulos (#935, David Kopf Instruments). El uso del calibrador de ángulos aseguró la máxima precisión en el posicionamiento de la micropipeta dentro del animal. Las coordenadas empleadas se basaron en la experiencia previa del laboratorio (Nodal y López, 2003; Gómez-Nieto y cols, 2008; Horta-Junior y cols., 2008), de manera que la micropipeta alcanza la raíz coclear situada en el interior del meato acústico interno pasando a través del cerebelo. Con las coordenadas calibradas, se marcó el punto de penetración de la micropipeta en el cráneo y, a continuación, se realizó una trepanación de aproximadamente 3 mm de diámetro, con un micromotor de baja rotación equipado con broca dental esférica. Después de la remoción de la duramadre, la micropipeta fue cargada con una solución de FG al 4% disuelto en solución salina e introducida en el encéfalo de acuerdo con las coordenadas previamente mencionadas. La inyección del trazador fue realizada por iontoforesis, aplicando una corriente de carga positiva de 3 μA , de manera intermitente cada 7 segundos, durante 15 minutos (Pieribone y Aston-Jones, 1988). A continuación, la micropipeta fue mantenida en posición 15 minutos más sin corriente eléctrica a través de ella, antes de iniciar su retirada lenta y cuidadosa. Este paso es fundamental para evitar el reflujo del trazador y, consecuentemente, la contaminación de estructuras vecinas.

Por último, los tejidos blandos separados fueron cuidadosamente reposicionados y la incisión fue cerrada mediante grapas quirúrgicas. El periodo de supervivencia post-quirúrgico fue de 14 días.

2.2.1.2 Dextrano amino biotinado.

Inyectamos a 9 animales dextrano amino biotinado al 10% en agua destilada (BDA, 10.000 MW, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en el LC izquierdo. El trazador neuronal BDA fue depositado estereotáxicamente en el LC, anestesiando y posicionando al animal según se describe en el apartado anterior. Para el depósito del trazador, empleamos las coordenadas de Fritschy y Grzanna (1990). Debido a que el LC es una estructura que está topográficamente organizada, los sitios de inyección fueron localizados preferentemente dentro y alrededor de la mitad ventral del núcleo, lugar donde se originan las fibras de proyección (Guyenet, 1980; Fritschy y Grzanna, 1990). El BDA fue inyectado iontoforéticamente a través de una micropipeta de vidrio (25 μm de diámetro de punta) con pulsos de corriente positiva de 3 μA , de manera intermitente cada 7 segundos, durante 15 minutos, dejando un periodo de supervivencia mínimo de 7 días (Gómez-Nieto y cols., 2008; Horta-Junior y cols., 2008; Hormigo y cols., 2012).

2.2.2 Lesión Neurotóxica con DSP-4.

Para estudiar los efectos de la depleción noradrenérgica en los circuitos neuronales que median el RAS y la PPI, administramos una única dosis intraperitoneal de 50 mg/kg de DSP-4 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) en 37 ratas macho y en 42 ratas hembra, siguiendo el protocolo descrito en la literatura (Ross, 1985; Grzanna y cols., 1989; Fritschy y cols., 1991; Hormigo y cols., 2012). Como controles, se inyectó suero salino en un número similar de animales ($n = 81$). Después de 15 días, todas las ratas fueron eutanizadas.

2.3 Evaluación del RAS/PPI.

2.3.1 Equipo.

La medición del RAS/PPI se realizó usando el sistema SR-LAB (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA) (Figura 6). Dicho sistema está constituido por un cilindro acrílico transparente (de 8,2 cm de diámetro) donde se coloca la rata para realizar el estudio. Este cilindro descansa sobre una plataforma de metacrilato, debajo de la cual se encuentra acoplado un acelerómetro piezoeléctrico que se encarga de detectar cualquier movimiento que se produzca en el cilindro. Situado a 24 cm de altura sobre el cilindro se localiza un altavoz, por medio del cual se hacen llegar al animal los estímulos sonoros. Todo ello se encuentra colocado dentro de una cámara de aislamiento acústico (38 x 40,5 x 58,5 cm) que posee ventilación e iluminación propia.

Tanto el altavoz como el detector de movimiento están acoplados a un ordenador personal, que posee una tarjeta de adquisición de datos para transformar la información analógica a digital; también, mediante el ordenador y empleando el sistema informático SR-LAB, se definen las características de los estímulos acústicos, el número de veces, el orden en que éstos se aplican y el período que media entre un estímulo y otro. El sistema informático almacena las respuestas del animal y, además, permite su visualización durante toda la ejecución de la sesión de estudio.



Figura 6. Equipo de medición del reflejo auditivo de sobresalto.

El equipo consta de varias cámaras para realizar múltiples mediciones a la vez y está localizado en la sala de Fisiología 1 del Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

2.3.2 Procedimiento.

Se somete cada animal a una sesión en la cual se realizan pruebas para valorar el RAS y su PPI. Tras un periodo de aclimatación de 5 minutos, se presentan los estímulos sonoros de forma pseudo-aleatoria según un cuadro latino, con una media de 30 segundos de intervalo entre los estímulos. De éstos, 16 ensayos consistían en un único estímulo de sonido que provoca el sobresalto (115 dB SPL, 20 ms de ruido blanco). Los 64 ensayos restantes consistieron en ensayos que consistían en un prepulso (80 dB SPL, 20 ms de ruido blanco) seguido por el estímulo sonoro que provoca el sobresalto, con cuatro intervalos diferentes entre los dos estímulos (ISI): 25, 50, 100, ó 150 ms, realizando en total 16 ensayos para cada ISI. Durante toda la sesión, se mantiene un ruido de fondo de 60 dB con el fin de evitar interferencias de ruidos externos y asegurarnos una igualdad de condiciones experimentales.

En cada sesión se evalúa el valor máximo del movimiento detectado por el acelerómetro (expresado en unidades arbitrarias) y la latencia al valor máximo (expresada en milisegundos). La magnitud porcentual de la PPI se calcula para cada ISI del prepulso según la fórmula:

$$PPI = \frac{(\text{amplitud del RAS}) - (\text{amplitud del RAS en ensayos con estímulo previo})}{(\text{amplitud del RAS en ensayos sin estímulo previo})} \times 100$$

Todos los animales fueron evaluados en 3 momentos diferentes en el tiempo: el día previo a la lesión neurotóxica, en el día 7 post-inyección (de DSP-4 ó salino) y en el día 14 post-inyección.

2.4 Estudios histológicos.

2.4.1 Obtención de muestras para estudios de microscopía.

Al final del periodo de supervivencia, los animales fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico y luego perfundidos transcárdialmente con 100 ml de una variante del suero Ringer libre de calcio preparado en el momento de ser usado (NaCl, 145,45 mM; KCl, 3,35 mM; NaHCO₃, 2,38 mM), pH 6,9, a 37 °C, seguido de 1000 ml de paraformaldehído despolimerizado al 4 % en tampón fosfato (PB) 0,1 M,

pH 7,4, a temperatura ambiente. A continuación, los cerebros fueron extraídos y crioprottegidos durante 48 horas a 4 °C en sacarosa al 30% disuelta en PB. Se cortaron las secciones coronalmente (40 µm de grosor) en un micrótopo deslizante de congelación (#HM430, Microm, Heidelberg, Germany). Las secciones fueron recogidas en PB en series de 10 pocillos.

2.4.2 Visualización de trazadores e inmunohistoquímicas.

2.4.2.1 Dextrano amino biotinado.

Para microscopía óptica, el trazador fue marcado usando el protocolo basado en la visualización del producto de reacción de la enzima peroxidasa (Gómez-Nieto y cols., 2008; Horta-Junior y cols., 2008). Brevemente, las secciones en flotación fueron incubadas en el complejo avidina biotina-peroxidasa (ABC, Standard-kit #PK 4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 2 horas, seguido de una solución de Tris-HCl 0,05 M con 0,016% de 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB, #D-9015, Sigma), 0,006% de H₂O₂ y níquel amonio sulfato al 0,4% (Hancock, 1982; Hsu y Soban, 1982).

2.4.2.2 Técnicas de inmunotinción estándar.

Para estudiar el patrón de inmunorreactividad del FG, la TH, la DBH y la CaBP, hemos empleado 31 animales. Después de los protocolos de perfusión y de corte seriado, se siguió el procedimiento de inmunohistoquímica (IHQ) estándar para las respectivas secciones, que implicaban la incubación de las secciones durante 72 horas a 4 °C en solución de anticuerpo primario, lavado del tejido para eliminar el anticuerpo e incubación en su correspondiente anticuerpo secundario biotinado durante 2 horas a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos usados y sus diluciones se muestran en la Tabla 1.

El anticuerpo anti-TH reconoce un epítipo presente en la región N-terminal (entre los aminoácidos 40-152) de la tiroxina hidroxilasa de roedores y humanos. Detecta tanto las subunidades intactas del doblete de 59/57 kDa como una serie de formas de TH con disminución de los pesos moleculares resultante de proteólisis severa.

El anticuerpo anti-DBH reconoce el epítipo proteico precursor de la dopamina beta-hidroxilasa recombinante, con etiqueta de firma (PrEST). La secuencia del inmunogen es:

VQRTPEGLTLLFKRPFGTCDPKDYLIEDGTVHLVYGILEEPFRSLEAINGSQLQM
GLQRVQLLKPNIPPELPSDACTMEVQAPNIQIPSQETTYWCYIKELPKGFSRHHI
IKYEPIVTKGN

Después del lavado de los anticuerpos secundarios, las secciones reaccionaron con ABC como se ha descrito anteriormente, usando DAB como cromógeno. Todas las secciones fueron montadas en portaobjetos, deshidratadas y cubiertas con Entellan® Neu (Merck, Darmstadt, Germany). Además, varias series fueron contrateñidas con violeta de cresilo (#5235, Merck) al 0,1% para obtener una referencia citoarquitectónica del tronco del encéfalo, siguiendo la nomenclatura descrita en trabajos previos (Paxinos y Watson, 2005).

2.4.2.3 Técnicas de inmunotinción específica para visualización de receptores noradrenérgicos.

Para estudiar el patrón de inmunorreactividad de los ADRs, hemos modificado el protocolo estándar descrito anteriormente, siguiendo la referencia descrita en otro trabajo para estos anticuerpos (Salgado y cols., 2011). Hemos empleado 12 animales, 6 ratas macho (3 controles y 3 tratados con DSP-4) y 6 ratas hembra (3 controles y 3 tratadas con DSP-4).

De los receptores noradrenérgicos hemos elegido el ADR α 1, ADR α 2A y el ADR β 2. El anticuerpo anti-ADR α 1 es un péptido sintético correspondiente a los residuos K(339)FSREKKA AKT(349) del tercer bucle intracelular del receptor adrenérgico humano α 1; esta secuencia está conservada al 100% en todos los subtipos de ADRs α 1 examinados, incluyendo a la rata. El anticuerpo anti-ADR α 2A es un péptido sintético correspondiente a los residuos R(218)IYQIAKRRTRVPPSRRG(235) del tercer bucle intracelular del receptor adrenérgico humano α 2A; esta secuencia está completamente conservada entre los ADRs α 2A de humano, ratón, rata y porcino. El anticuerpo anti- β 2 es un péptido sintético derivado de la secuencia amino-terminal del receptor adrenérgico β 2 del ratón; esta secuencia está completamente conservada entre los ADRs β 2 de humano, ratón y rata.

El protocolo de inmunotinción consistió en un lavado en tampón salino fosfato (PBS) 0,1 M, e incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de bloqueo (PBS 0,1 M, suero normal de cabra al 3% -#S-1000, Vector Labs- y Triton X-100 al 0,3%). Los diferentes anticuerpos primarios (Tabla 1) fueron diluidos en tampón de dilución (PBS 0,1 M, suero normal de cabra al 3% y Tween-20 al 0,3%) y se incubaron las secciones a 4 °C en un agitador.

Después de la incubación con los anticuerpos primarios, las secciones fueron lavadas (5 x 10 minutos) en PBS e incubadas posteriormente con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente (Tabla 1). A partir de aquí, el protocolo es el mismo que el descrito anteriormente.

2.4.2.4 Experimentos de colocalización.

Para demostrar la naturaleza noradrenérgica de las fibras marcadas con BDA que provienen del LC, hemos realizado experimentos para resaltar la colocalización entre la inmunorreactividad para TH y para DBH usando microscopía confocal (MC). Las secciones fueron pretratadas con PBS y Triton-X100 al 0,3 % y bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con suero normal de cabra al 6% en PBS.

Después de la incubación durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios, las secciones fueron lavadas en PBS e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Tabla 1). El BDA fue visualizado por incubación en estreptavidina conjugada a Cy2 (1/650; #016-220-084; Jackson ImmunoResearch). Más tarde, las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con ProLong® Antifade kit (#P7481; Molecular Probes).

En todos los experimentos de inmunohistoquímica, la omisión de anticuerpo primario (control negativo) originó la no tinción de las secciones.

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones usados en los protocolos de inmunohistoquímica.

Antígeno	Anticuerpo Primario	Referencia	Dilución	Anticuerpo Secundario	Referencia	Dilución	Método
FG	Conejo anti-FG pAb	#AB 153-Chemicon	1/10.000	Cabra anti-conejo biotinado	#BA-1000-Vector	1/200	MO
BDA	Estreptavidina +Cy2 *	#016-220-084-JI	1/650	-	-	-	MC
TH	Ratón anti-TH mAb	#22941-Diasorin	1/10.000	Cabra anti-ratón biotinado	#BA-2000-Vector	1/200	MO
				Cabra anti-ratón Cy5	#115-175-003-JI	1/250	MC
				Cabra anti-ratón Cy2	#115-225-003-JI	1/250	MC
DBH	Conejo anti-DBH pAb	DZ1020-Affiniti	1/500	Cabra anti-conejo biotinado	#BA-1000-Vector	1/200	MO
				Cabra anti-conejo Cy5	#111-175-003-JI	1/250	MC
CaBP D28K	Conejo anti-CaBP pAb	#CB-38a-Sw	1/5.000	Cabra anti-conejo biotinado	#BA-1000-Vector	1/200	MO
				Cabra anti-ratón Cy2	#115-225-003-JI	1/250	MC
ADR α 1	Conejo anti-ADR α 1 pAb	PA1-047- Affiniti	1/150	Cabra anti-conejo biotinado	#BA-1000-Vector	1/200	MO
ADR α 2A	Conejo anti-ADR α 2A	PA1-048- Affiniti	1/150	Cabra anti-conejo biotinado	#BA-1000-Vector	1/200	MO
ADR β 2	Conejo anti-ADR β 2 pAb	905-742-100- AD-P	1/150	Cabra anti-conejo biotinado	#BA-1000-Vector	1/200	MO

Abreviaturas:

AD-P: Assay Designs Proteimax, 5777 Himes Drive, Ann Arbor, MI 48108, USA; **Aff:** Affinity bioreagents, 4620 Technology Drive, Suite 600. Golden, CO 80403 USA; **JI:** Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA; **mAb:** anticuerpo monoclonal; **MC:** microscopía confocal; **MO:** microscopía óptica; **pAb:** anticuerpo policlonal; **Vector:** Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA.

*NOTA: La estreptavidina, aunque no es un anticuerpo primario, la incluimos en la tabla para dar una visión global del procesado de las secciones.

2.4.3 Tinción con el método Nissl.

Después del protocolo de inmunohistoquímica, dos series de cada caso experimental fueron contra-teñidas por el método de Nissl. Este protocolo consistió en realizar la coloración con violeta de cresilo o tionina (Fisher #T-409), deshidratación con alcoholes etílicos de concentración creciente, inmersión en tres baños de xilol y sellado del portaobjetos con Entellan®Neu.

2.4.4 Estudio de las secciones histológicas.

Las secciones procesadas para microscopía óptica fueron estudiadas con un microscopio (#BX5, Olympus, Center Valley, PA, USA) equipado con una cámara digital (Spot Rt®, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA). Las imágenes de bajo aumento fueron tomadas con una lente de objetivo de 5x y las imágenes de gran aumento fueron tomadas con una lente de objetivo de 20x y 40x.

Las secciones procesadas para microscopía confocal primero fueron examinadas usando un microscopio (#BX5, Olympus) equipado con epifluorescencia y cámara digital (Spot Rt®, Olympus). A continuación, las secciones fueron analizadas usando un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) acoplado a un microscopio invertido Leica DM IRE2 y equipado con láseres de argón y de helio-neón con longitudes de onda para excitación de 458, 476, 488, 543, 568 y 633 nm. Los fluorocromos Cy2 y Cy5 fueron detectados secuencialmente, stack-by-stack, con el sistema de filtros acústico-óptico sintonizables y triple espejo dichroico TD488/543/633 utilizando líneas de láser de 488-495, 546 y 633 nm. El fondo estaba controlado en todo momento y el fotomultiplicador de voltaje (800 V) fue seleccionado para alcanzar la mayor sensibilidad en el rango lineal. Los objetivos usados fueron Planapochromat 20x, inmersión en aceite 40x y 63x/apertura numérica 1,30, dando una resolución de ~150 nm en el plano-xy y de ~300 nm a lo largo del plano-z (*pinhole* de 1 unidad *Airy*) y también hemos usado varios factores de zoom electrónico de hasta 1,58x.

Todas las fotomicrografías mostradas en las figuras fueron procesadas con la menor modificación en brillo, contraste y eliminación del fondo libre de tejido, usando Adobe Photoshop® (versión 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA). Para el dibujo de las fibras inmunomarcadas, primero se hizo el ensamblaje de las imágenes digitalizadas obtenidas con el objetivo de 20x del microscopio, usando Adobe Photoshop®. A continuación, las fibras nerviosas inmunoteñidas fueron dibujadas usando el programa Canvas® (version X Build 885, ACD Systems Inc, USA). Este programa también ha sido utilizado para la composición de todas las figuras.

2.4.5 Estudios de densidad del inmunomarcaje.

La densitometría de TH y de DBH se realizó analizando los dibujos de las fibras marcadas para el estudio de la proyección del LC al CI. Las fibras inmunorreactivas fueron dibujadas con líneas sólidas de 0,176 mm de espesor, frente a un fondo blanco. La cuantificación de la densidad de las fibras fue realizada con el software ImageJ (version 1,43, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011).

Para la cuantificación de los receptores noradrenérgicos en la región de la raíz coclear, los análisis densitométricos se realizaron a partir de las fotomicrografías

originales convertidas a 8-bits y normalizadas en brillo y contraste empleando un algoritmo de normalización de la intensidad (Sintorn y cols., 2010), con el programa ImageJ.

2.4.6 Reconstrucción tridimensional.

Las imágenes histológicas, visualizadas con un microscopio Leitz DMRB (Leica) con platina motorizada, se dibujan secuencialmente y mediante el programa informático Neurolúcida (versión 10, MicroBrightField, Williston, VT, USA) se obtienen las reconstrucciones 3D. Cada sección fue alineada individualmente con respecto a su antecesora inmediata. Como referencia espacial, se dibujó el contorno externo del tronco del encéfalo, la marca de lateralidad (paso de aguja) y los límites citoarquitectónicos del LC. Para las neuronas dentro del LC se asignó un tipo de marcador proporcionado por el software para su posterior contaje y análisis. Los dibujos de cada sección fueron exportados como figuras aisladas para el estudio también en dos dimensiones.

2.4.7 Morfometría de perfiles neuronales en el LC.

Hemos estimado el número de perfiles neuronales teñidos por el método de Nissl en el LC aplicando la fórmula de corrección de Abercrombie, mejorada con la ecuación del método empírico (Hedreen, 1998). La estimación fue realizada mediante el programa Neurolúcida, colocando un marcador en cada uno de los nucleolos observados utilizando el objetivo de 20x ó 40x. Además hemos medido el mayor y el menor eje de 79 perfiles neuronales así como del núcleo y nucléolo con el software ImageJ.

2.5 *Análisis de expresión génica.*

2.5.1 *Obtención del material biológico.*

Para el estudio de la expresión de los genes que codifican los receptores noradrenérgicos en los núcleos de la raíz coclear, se emplearon 88 animales, 39 ratas machos (19 controles y 20 tratados con DSP-4) y 49 ratas hembras (24 controles y 25 tratadas con DSP-4). Tras decapitar al animal, y manteniendo siempre el tejido sobre una plataforma helada para evitar la degradación del RNA, se recogieron las regiones de interés en TRIZOL® (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), homogeneizándose a continuación (Polytron T10 basic Ultra-Turrax, Ika, Alemania) y extrayendo el RNA total siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5.2 *Purificación del RNA.*

Para eliminar la posible contaminación de DNA genómico, cada muestra fue purificada usando un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones de fabricante. La cuantificación del RNA fue llevada a cabo mediante un nanofotómetro (Implen GmbH) (Figura 7).

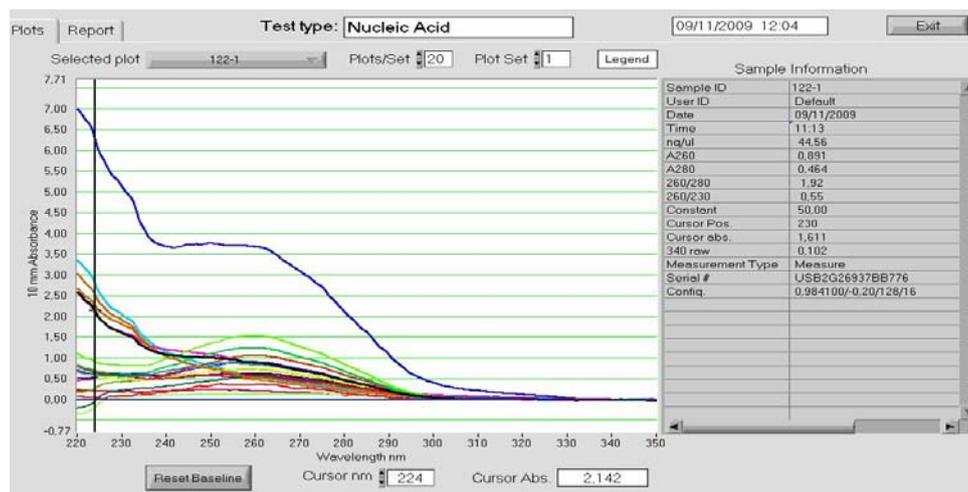


Figura 7. Análisis espectrográfico del RNA para medir su concentración.
Valoración de la concentración de una muestra de RNA obtenida mediante el nanodrop.

La calidad del RNA recogido y purificado se evaluó colocando 1 μ l de cada muestra en un nanochip (#RNA 6000 NanoLabChip, Agilent Technologies, Palo Alto,

CA, USA) y analizando la absorbancia de las bandas 18S y 28S del rRNA a través de un bioanalizador Agilent 2100, que extrae un algoritmo que describe la integridad del RNA.

2.5.3 RT-qPCR.

Para obtener cDNA por retrotranscripción de RNA, se añadieron al RNA total (2 µg), los cebadores (oligo-dT), la enzima transcriptasa inversa y los desoxirribonucleótidos (dNTPs) en un volumen de 20 µl a 37 °C durante 2 horas, empleando el ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos, se usó un control negativo para la transcriptasa inversa para verificar la posible contaminación de DNA genómico residual. Adicionalmente, se llevó a cabo un tratamiento con DNAsas (Turbo DNA-free Kit, Applied Biosystems) a 37 °C durante 2 horas para eliminar la contaminación de la muestra con DNA, seguido por una inactivación de las DNAsas a 75 °C durante 15 minutos.

Con el objetivo de evaluar los cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican los ADRs, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR), que permite cuantificar el nivel de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia (a través de su nivel sobre un umbral). Los valores logarítmicos de fluorescencia, representados frente al número de ciclo, permiten valorar la cantidad de cDNA inicial. Estos valores, inversamente proporcionales a la cantidad de cDNA inicial, se expresan como Ct (del inglés, *cycle threshold*) o ciclo umbral (Schmittgen y Livak, 2008).

La qPCR fue realizada con 1 ng de cDNA de cada una de las muestras usando el método de SYBR-Green, que se une a la doble hebra de DNA, lo que permite identificar fragmentos amplificados de DNA concretos a partir de la temperatura de fusión, que es específica para el fragmento amplificado que se está buscando y cuyos resultados son obtenidos a partir de la observación de la curva de disociación de las muestras de DNA analizadas. El volumen final para cada reacción fue de 20 µl: 10 µl de *Master Mix* (4367659 PCR Master Mix Power SYBR-Green, Applied Biosystems), 0,8 µl de cada oligonucleótido (Tabla 2), 7,4 µl de agua ultrapura de Tipo I (MilliQ) y 1 µl de cDNA en una concentración de 1 ng/µl. La curva estándar se construyó para cada experimento

mediante diluciones seriadas de cDNA. La reacción de amplificación tuvo lugar en un termociclador acoplado a un fluorímetro (ABI Prism 7000, Applied Biosystems), con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C, y los resultados fueron analizados usando la curva de disociación del programa (Applied Biosystems). Las curvas del punto de fusión se analizaron para confirmar que solamente se había formado un único producto. El número de moléculas de cDNA se calculó por comparación con la curva estándar obtenida a partir de concentraciones conocidas de los productos de PCR correspondientes. Se realizaron 3 reacciones de PCR para cada muestra por placa y cada experimento se repitió 3 veces. Como gen de referencia o control endógeno, se empleó el gen de rata que codifica la β -actina (Tabla 2), colocándose, además, una muestra libre de RNA como control negativo. Todos los cebadores tenían al menos un cruce en el límite exón-exón. Los cebadores fueron diseñados para que tuvieran una temperatura de fusión similar y que dieran similares tamaños de amplicón (Tabla 2).

La eficiencia de la PCR para cada par de cebadores, junto con los valores del Ct obtenidos, fueron usados para calcular la expresión relativa de cada gen para cada transcrito, de acuerdo a la ecuación $E^{-(\Delta Ct \text{ "condición 1"} - \Delta Ct \text{ "condición 2"})}$, donde la E se refiere a la eficiencia de la PCR, ΔCt de cada "condición" ("condición 1" es la muestra tratada y "condición 2" es el control no tratado) es igual a la Ct del "gen de interés" - Ct del "control interno" (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008). Se calculó el error estándar para cada valor de expresión génica relativa como una medida de variación en los datos.

Tabla 2. Cebadores de PCR utilizados para la técnica de análisis de expresión génica.
 Se indica la localización del cebador correspondiente a las secuencias origen del GenBank*
 [obtenido del National Center for Biotechnology Information (NCBI)] para la rata.

Proteína "Objetivo"	Número GenBank*	Cebador Directo	cDNA Directo*	Cebador Inverso	cDNA Inverso*	Tamaño del producto
β -actina	NM_031144	AGCCATGTA CGTAGCCAT	471-490	ACCCTCAT AGATGGGC	566-585	115
ADR α 1A	NM_017191	ATCTCCATC GGACCCCTG	484-503	GGCCAGTG GCACGTAG	590-609	126
ADR α 1B	NM_016991	AGAATCTGG AGGCGGGAG	1093-1112	CCTTGGCC TTGGTACT	1184-1203	111
ADR α 1C	NM_024483	TGCCTCTGG GCTCTCTGT	1564-1583	TGAGCGGG TTCACACA	1653-1662	99
ADR α 2A	NM_012739	GATGCGCTG GACCTAGAG	865-884	AGACTGTC CCCCGGTT	976-995	131
ADR α 2B	NM_138505	TTTGCTCCC TGCCTCATC	924-943	GGGGCTTC TTGGACTC	1025-1044	121
ADR α 2C	NM_007418	GCTGCCAGA ACCGCTCTT	2547-2566	TGAAAGAG CGCCTGAA	2634-2653	107
ADR β 1	NM_012701	CTTTCTACG TGCCCTGG	819-838	GCTGAGGT TTTGGGCA	918-937	119
ADR β 2	NM_012492	TTCATGCCC AAAACCTC	918-937	TGCCCATG ATGATGCC	1021-1040	123
ADR β 3	NM_013108	CTCCATCCC CTGCCACAG	980-999	GCCATAA TGAGACCC	1087-1109	128

2.6 Estudios bioquímicos.

2.6.1 Obtención del material biológico.

Hemos recogido 6 regiones cerebrales diferentes en 48 animales: 25 ratas macho (14 controles y 11 tratados con DSP-4) y 23 ratas hembra (12 controles y 11 tratadas con DSP-4). Las regiones recogidas fueron el NRC, el CI, el tronco del encéfalo* (TE) *(la parte que queda en posición ventral al cerebelo, aproximadamente desde el tracto trigeminal hasta los núcleos del lemnisco lateral), el cerebelo (Cb), la corteza prefrontal (CPF) y el bulbo olfatorio (BO), pues todos son lugares conocidos de proyección noradrenérgica.

2.6.2 Extracción de catecolaminas.

Cada región cerebral fue sonicada en 1 ml de ácido perclórico 0,1 M, guardándose una alícuota de 100 µl del material sonicado a -80 °C para su determinación proteica posterior. El material sonicado se sometió a centrifugación de 13.000 g (#5430, Eppendorf) durante 15 minutos, recogiendo el sobrenadante. A continuación, se añadió el estándar interno en concentración conocida (10^{-4} M), 25 mg de alúmina, 50 µl de metabisulfito de sodio 5 mM y 400 µl de Tris 10 mM – EDTA 1 mM a pH 8,0 ajustado con HCl, mezclando todo en agitación durante 10 minutos. Tras centrifugar 5 minutos a 11.000 g, los ácidos carboxílicos se eluyeron y se llevaron al último paso directamente. Por otra parte, las aminas permanecieron en el sobrenadante, que fue colocado en un tubo nuevo, se lavó y centrifugó la alúmina 2 veces con 1,5 ml de agua MilliQ, añadiéndose finalmente al sobrenadante 100 µl de ácido perclórico 0,1 M más metabisulfito de sodio 0,1 mM (en proporción 7:3) con el objetivo de eluir las aminas. Todos los reactivos usados para la HPLC se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.6.3 Valoración de los niveles de catecolaminas por HPLC.

Realizamos la valoración de los niveles de catecolaminas por cromatografía líquida / tándem espectrometría de masas, en el equipo LC MS/MS (Waters Associates, Milford, MA). Se cuantificaron 2 tipos diferentes de compuestos bioquímicos: las aminas (DOPA, DA y NA) y los ácidos carboxílicos (HVA, DOPAC, MHPG y VMA). Como estándares internos hemos usado el 3,4-dihidroxibencilamina (DHBA) para las aminas y el ácido 4-hidroxifenilacético (HPAA) para los ácidos carboxílicos (Figura 8).

Del extracto reconstruido, se inyectaron 100 µl en una columna de fase reversa de acero inoxidable (Atlantis® T3 C18, Water Associates; 100 x 2,1 mm, 3 µm). La fase móvil fue bombeada con una velocidad de flujo de 1 ml/min por un sistema solvente de entrega programable (#2795 Waters Associates). El programa de HPLC usado se encuentra resumido en la Tabla 3A. Para cuantificar los compuestos catecolaminérgicos tal como eran eluidos por la columna, hemos usado un espectrómetro de masas ZQ4000 (Waters Associates), calibrándolo previamente a partir de soluciones de concentración conocida (en el rango que esperábamos encontrar

nuestras muestras experimentales, desde 10^{-6} hasta 10^{-10} M). Se siguieron las señales positivas para detectar las aminas y las negativas para detectar los ácidos carboxílicos, tomando en cuenta la recuperación analítica de los estándares internos (DHBA o HPA, respectivamente).

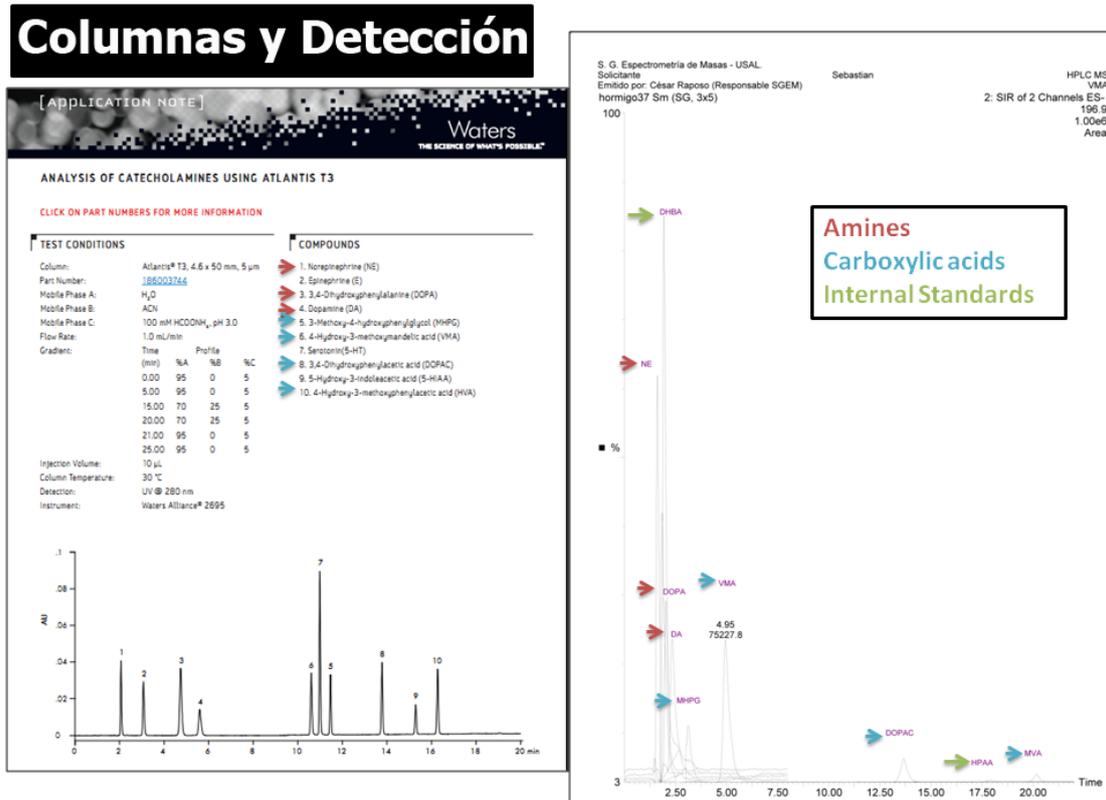


Figura 8. Columnas y detección de los compuestos catecolaminérgicos. En la parte izquierda de la figura tenemos la columna usada en la espectrometría de masas. En la parte derecha tenemos los picos obtenidos en una muestra-ejemplo utilizada para calibrar los parámetros del HPLC. Las flechas rojas indican las aminas, las azules los ácidos carboxílicos y las verdes los estándares internos utilizados.

Tabla 3. Programa de HPLC.

A: la columna "tiempo" muestra el porcentaje en el que las soluciones iban siendo añadidas a la columna de la espectrometría de masas. B: configuración del espectrómetro de masas para seguir los diferentes compuestos. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

A	1: Formiato de amonio 20 mM pH 3		
	2: Acetonitrilo		
	Tiempo (min)	1 (%)	2 (%)
	0	95	5
	5	95	5
15	75	25	
20	75	25	

B	Compuesto	Ion usado (Amu)	Cono de Voltaje (V)
	NA	152	30
	DHBA	123	30
	DOPA	152	30
	DA	137	30
	MHPG	151	30
	VMA	197	30
	DOPAC	123	30
	HPAA	151	30
	HVA	181	30

2.6.4 Determinación de proteínas: método de Bradford.

La concentración de proteínas se evaluó por el método Bradford (Bradford, 1976). Una pequeña alícuota de la muestra de proteínas se diluyó 1000 veces en agua MilliQ. De esa dilución, se tomó un volumen de 800 μ l y se añadieron 200 μ l de reactivo Bradford (BioRad). Se agitó la mezcla en el vórtex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se midió la absorbancia a la longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Appliskan, Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca). La concentración de proteínas se determinó extrapolando de una recta patrón, realizada simultáneamente con diluciones de 0, 1, 5, 10 y 20 μ g/ml de albúmina sérica bovina.

2.7 Análisis Estadísticos.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa PASW Statistics 18.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La descripción de los datos se efectuó mediante media \pm error estándar de la media (SEM, de sus siglas en inglés) tanto para variables continuas como para frecuencias absolutas y relativas de variables categóricas.

Los resultados de los parámetros estudiados en las diferentes condiciones experimentales se compararon entre los diferentes grupos haciendo uso del módulo ANOVA y, en los casos apropiados, se realizaron comparaciones múltiples post-hoc y el test *t de Student* para variables independientes. En los estudios longitudinales, los resultados se compararon entre los diferentes grupos, haciendo uso del test de ANOVA mixto split-plot, con comparaciones por pares Sheffe (análisis inter-sujetos) y Bonferoni (análisis intra-sujetos). Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0,05$. Referencias: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = no significativo.

3. RESULTADOS

3.1 Proyección del locus coeruleus.

3.1.1 Inyección de BDA en locus coeruleus y descripción de la trayectoria de las fibras.

Desde el LC, los axones marcados anterógradamente hacia regiones caudales transcurren a través de dos vías principales: una ipsilateral y otra contralateral, con predominancia hacia el lado ipsilateral (Figura 9). La proyección ipsilateral está compuesta por fibras que cruzan la región parabraquial (ventralmente y dorsalmente al pedúnculo cerebelar superior), cruzan dorsalmente el núcleo trigeminal sensorial principal y el tracto trigeminal espinal y se dirigen hacia el núcleo coclear ventral y a las neuronas de la raíz coclear (Figura 9). Las fibras de la vía contralateral cruzan ventralmente y caudalmente en dirección al núcleo reticular caudal del puente (PnC). Las fibras marcadas en el PnC dan origen a colaterales axónicas que cruzan la línea media y se dirigen hacia el núcleo coclear ventral y la raíz coclear, donde se observaron ocasionalmente fibras marcadas (Figura 9).

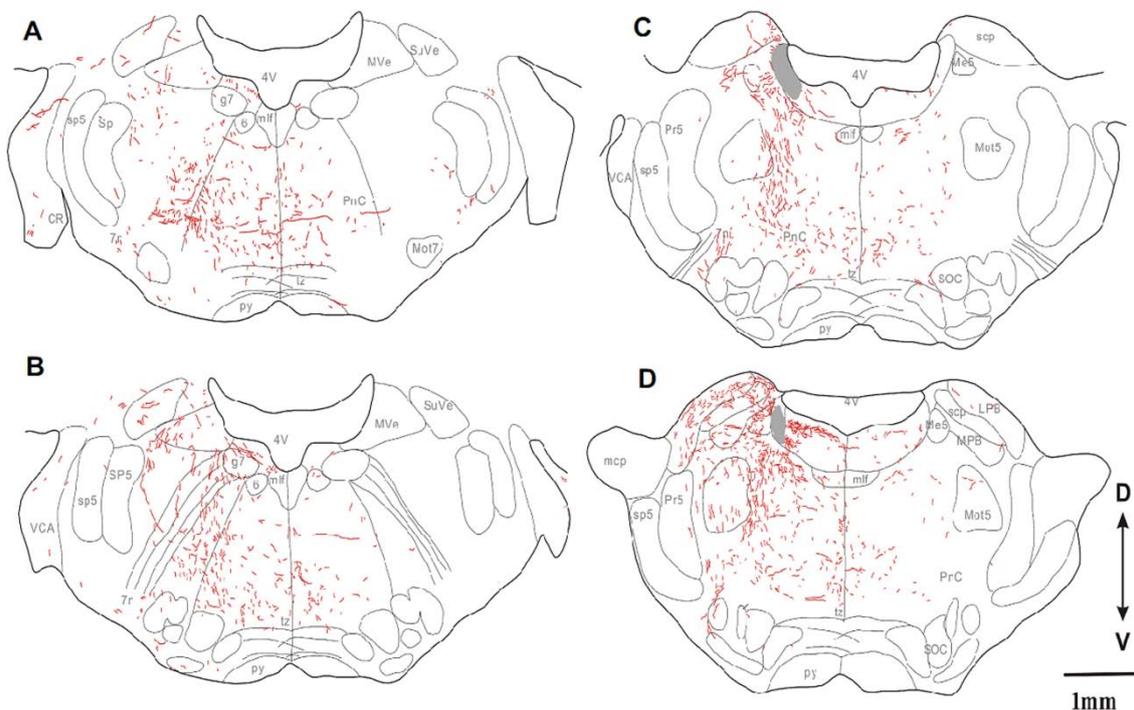


Figura 9. Dibujos en cámara clara de secciones coronales tras inyección de BDA en el locus coeruleus.

La figura muestra la distribución de los axones marcados anterógradamente y los colaterales (BDA, rojo) tras las inyecciones de BDA dentro del LC (gris). Los esquemas están ordenados de caudal a rostral (A-D) y están regularmente espaciados con un intervalo de 400 μ m. Ver lista adjunta para las abreviaturas.

3.1.2 Colocalización de fibras noradrenérgicas marcadas con BDA sobre las neuronas de la raíz coclear.

La inmunohistoquímica para TH y DBH en las secciones coronales exhibieron su mayor reactividad en el LC (Figura 10). También se encontraron fibras inmunorreactivas cortas y delgadas, con muchas varicosidades yuxtapuestas en las neuronas de la raíz coclear, siendo estas fibras inmunopositivas para ambas enzimas (Figuras 10 y 11). Las inyecciones de BDA en el LC confirmaron la proyección desde este núcleo hacia la raíz coclear (Figura 10). Las fibras inmunorreactivas para TH y DBH colocalizan con las fibras marcadas con BDA provenientes del LC en la raíz coclear (Figura 10). Estas fibras se distribuyen a lo largo de la mitad lateral de la raíz coclear en la misma región ocupada por las neuronas de la raíz coclear, observándose varios campos terminales alrededor de las neuronas de la raíz (Figura 10 C, D, H, I, M y N).

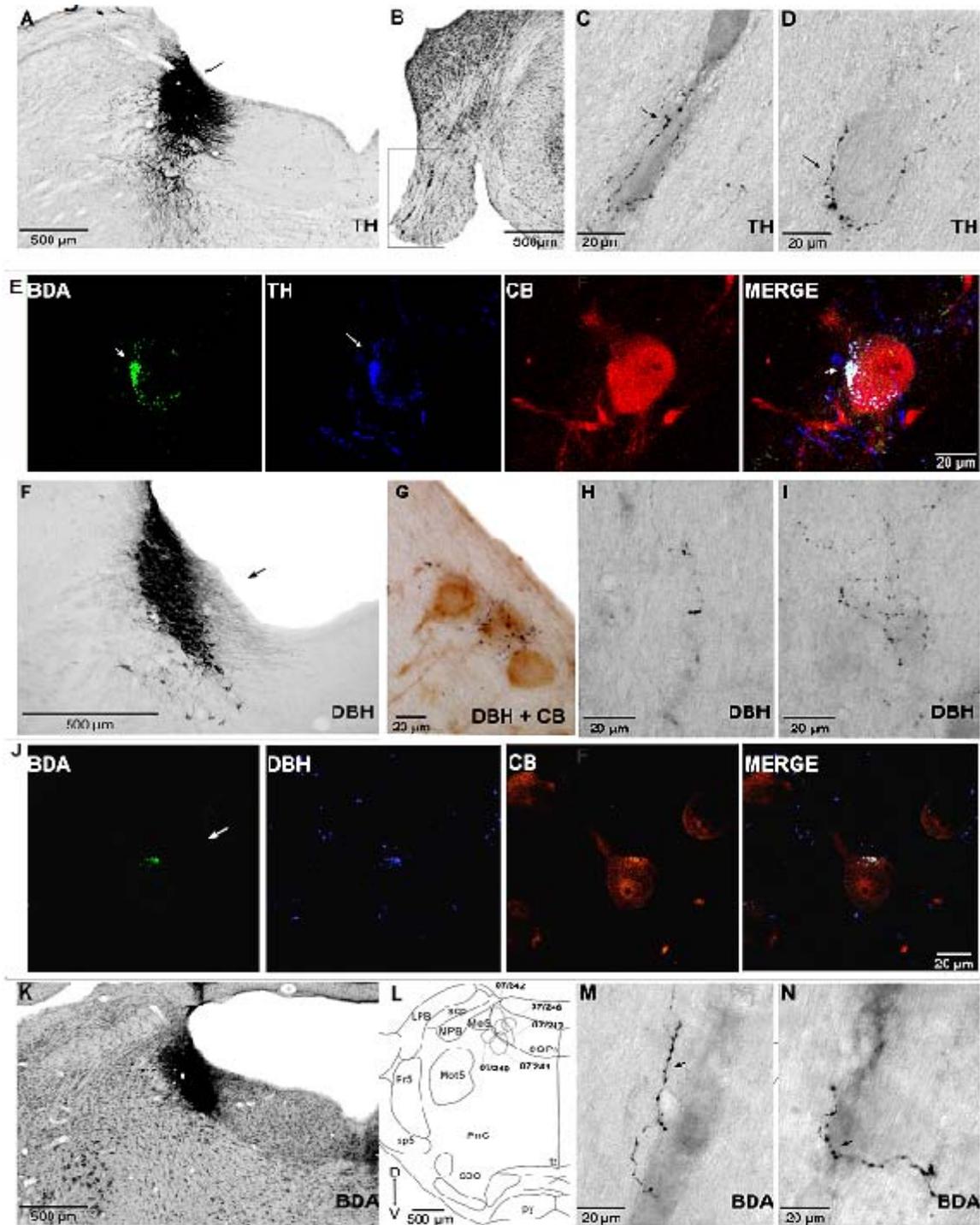


Figura 10. Input noradrenérgico desde el locus coeruleus hacia las neuronas de la raíz coclear.

A: inmunorreactividad para TH (flecha) en el LC. B: sección coronal de la raíz coclear, contra-teñida con Nissl, para mostrar la localización del NRC en el área enmarcada. C y D: fibras inmunorreactivas para TH alrededor de las neuronas de la raíz no-marcadas (flecha). E: colocalización del marcaje con BDA (punta de flecha) con fibras inmunorreactivas para TH. Desde F hasta I: fibras marcadas con DBH alrededor de las neuronas de la raíz coclear (flecha). J: colocalización de marcaje con BDA (flecha) con fibras inmunorreactivas para DBH. K: sitio de inyección de BDA típico (punta de flecha) en el LC. L: dibujos en cámara clara indicando los sitios de inyección de BDA en casa caso experimental. M y N: aposición de marcaje con BDA en el cuerpo celular (soma) de las neuronas de la raíz. Ver lista adjunta para las abreviaturas. De la A a la E, modificado de Gómez-Nieto y cols., (2008).

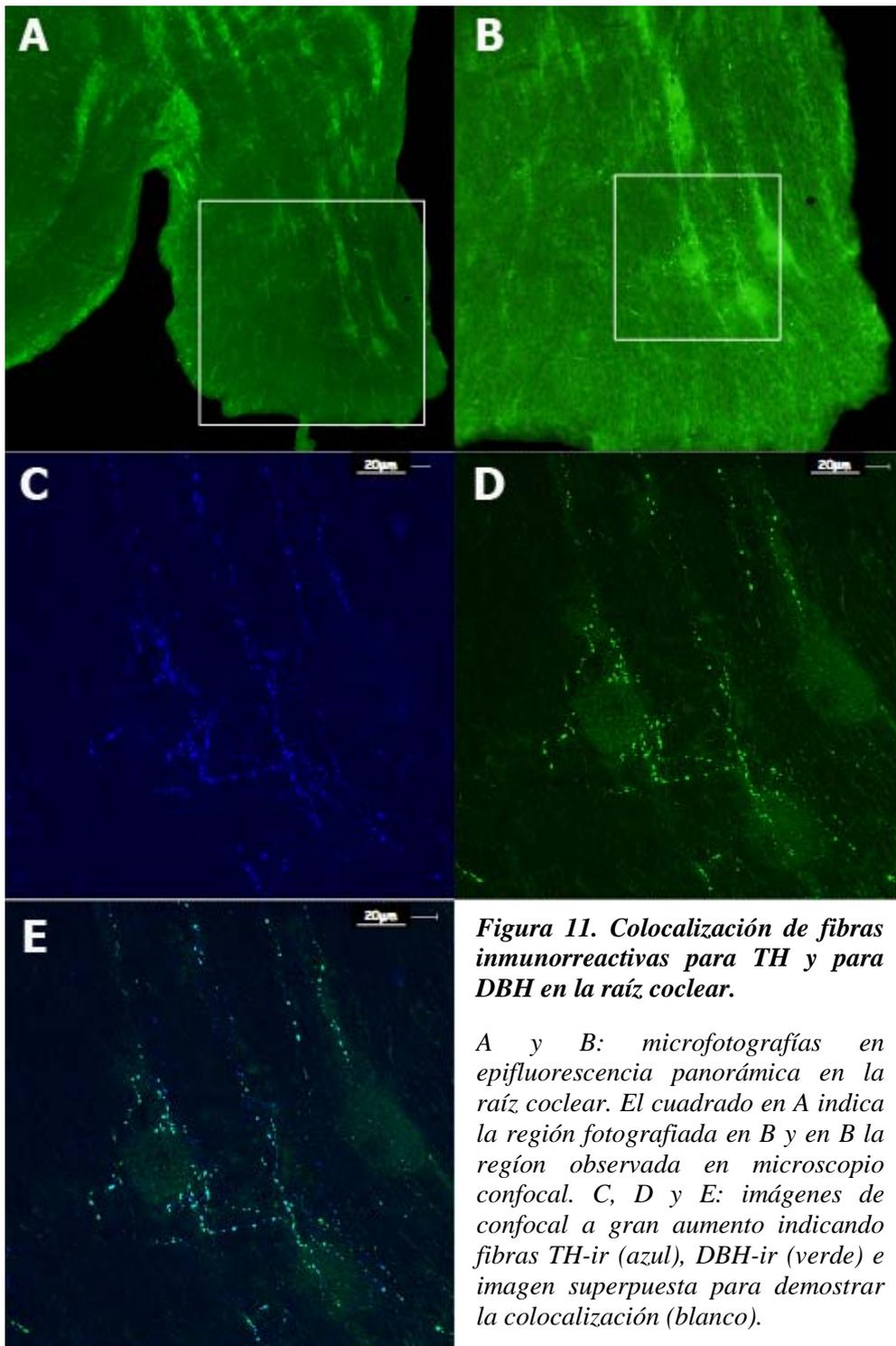


Figura 11. Colocalización de fibras inmunorreactivas para TH y para DBH en la raíz coclear.

A y B: microfotografías en epifluorescencia panorámica en la raíz coclear. El cuadrado en A indica la región fotografiada en B y en B la región observada en microscopio confocal. C, D y E: imágenes de confocal a gran aumento indicando fibras TH-ir (azul), DBH-ir (verde) e imagen superpuesta para demostrar la colocalización (blanco).

3.1.3 Inyección de Fluoro-Gold en la raíz coclear, análisis del marcado retrógrado.

Tras el análisis de los 22 experimentos de inyección de FG en la raíz coclear, fueron seleccionados 7 casos experimentales en los que los lugares de inyección estaban restringidos a la raíz coclear, sin indicios de contaminación en estructuras vecinas (Figura 12). En todos los casos, los núcleos marcados bilateralmente fueron: núcleo ventral del cuerpo trapezoide (VNTB), las neuronas eferentes vestibulares (Eve) y el LC. Ipsilateralmente, se observó marcaje en las neuronas de la oliva superior lateral (LSO), en el núcleo coclear ventral (VCN) y en la región del grupo de células noradrenérgicas del A5 (Figura 14).

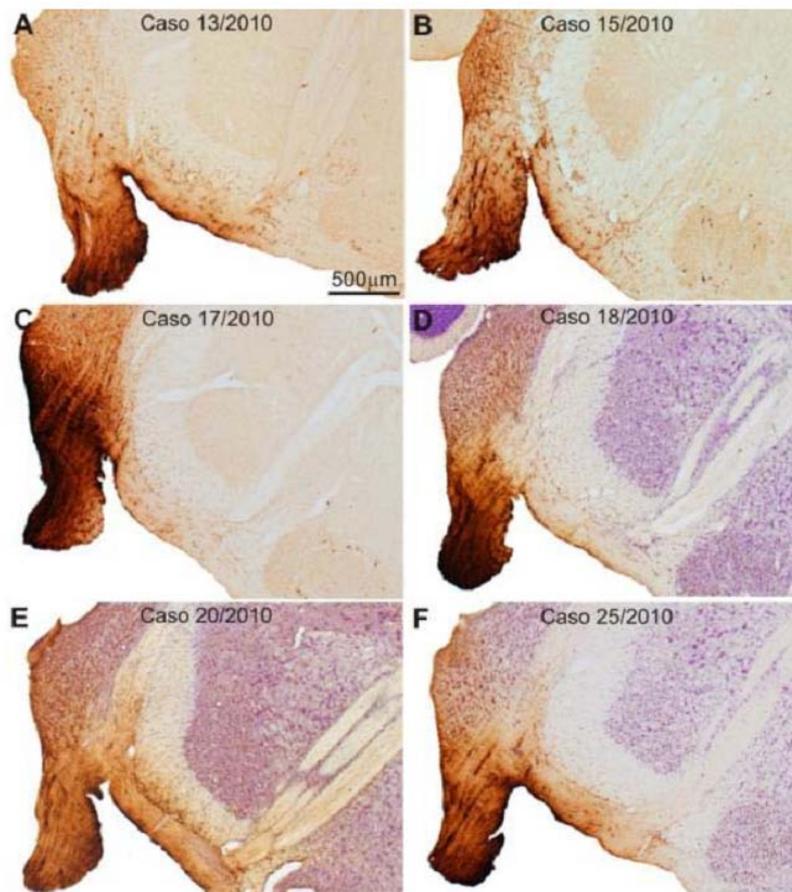


Figura 12. Lugares de inyección de Fluoro-Gold en la raíz.

Fotomicrografías de corte coronal del tronco del encéfalo evidenciando el depósito del trazador FG (marrón) en la raíz coclear en diversos casos experimentales. D, E y F: cortes contrateñidos con la técnica de Nissl. La barra de calibración es válida desde A hasta F.

Cabe destacar que hemos localizado marcaje bilateral del retrógrado FG en ambos LC en todos los casos seleccionados (Figura 13 y 14), lo que indica la presencia de proyecciones desde el LC hacia el NRC, lo que confirma los resultados obtenidos con trazador anterógrado.

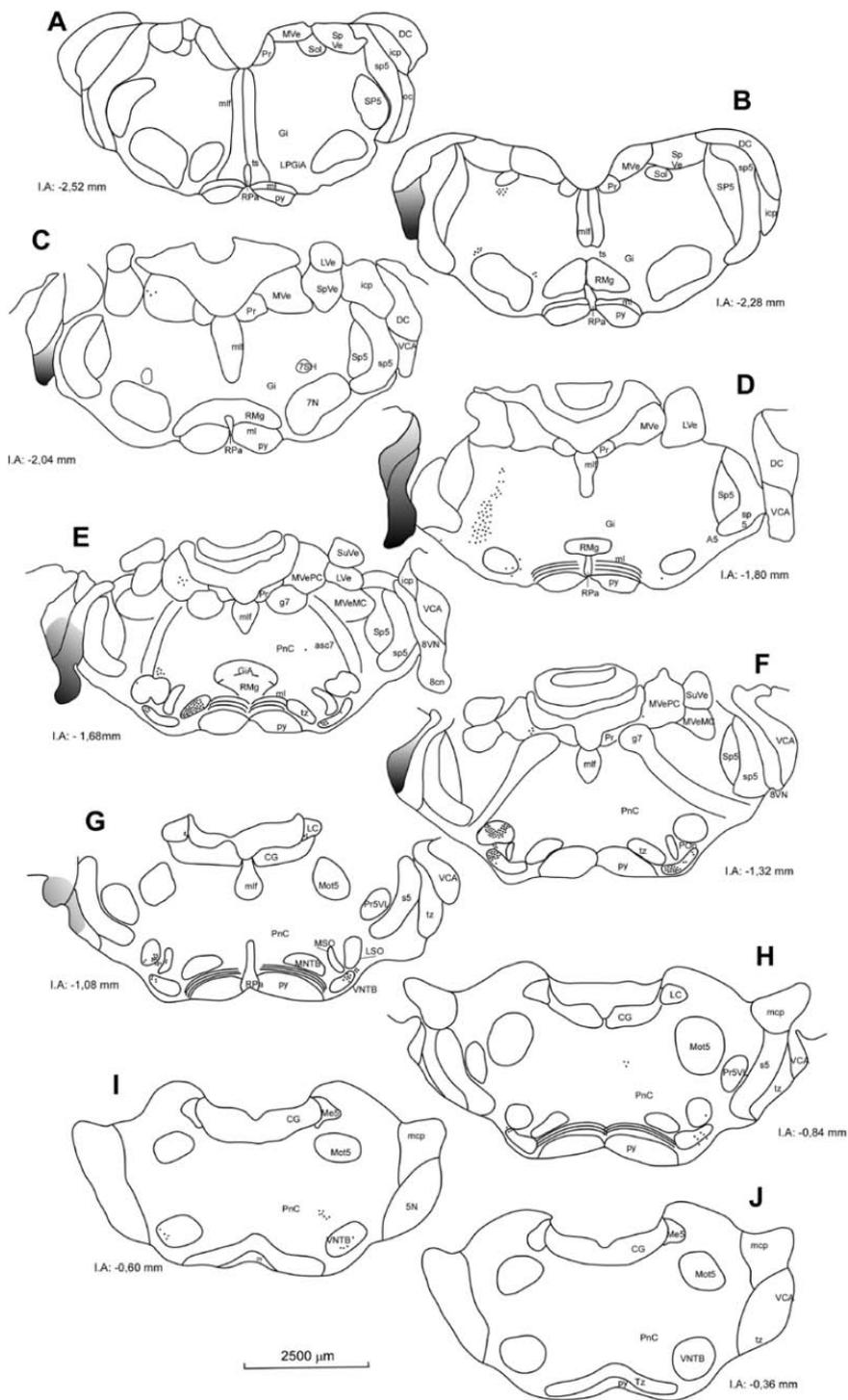


Figura 13. Mapeo de las neuronas marcadas retrógradamente tras la inyección de Fluoro-Gold en la raíz coclear.

Los esquemas representan cortes coronales del tronco del encéfalo elaboradas con ayuda de la cámara clara, ordenados desde el polo más caudal (A) hasta el más rostral (J). Las neuronas marcadas están representadas por los puntos negros. Las flechas de orientación y la barra de calibración son válidas para todos los esquemas. Ver lista adjunta para las abreviaturas.

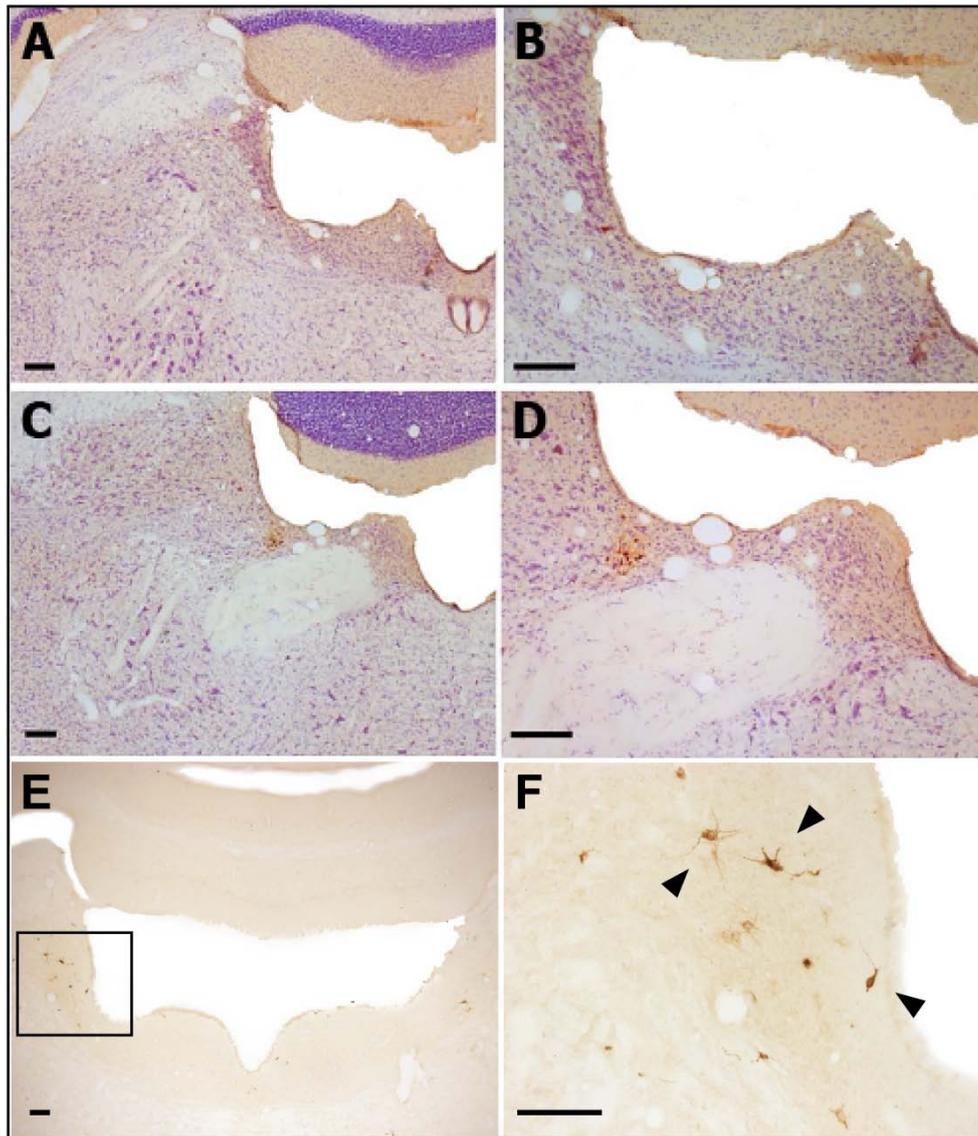


Figura 14. Fotomicrografías del locus coeruleus marcado con Fluoro-Gold tras la inyección de trazador en la raíz coclear.

A: se puede observar el LC marcado con FG. B: el mismo núcleo en un aumento mayor. C y D: otro caso experimental. Los cortes desde A hasta D fueron mediante la técnica de Nissl. E y F: otro caso experimental, el recuadro en E es la zona magnificada en F; las flechas indican neuronas típicas retrógradamente marcadas. Todas las barras equivalen a 200 μm . Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

3.1.4 Receptores noradrenérgicos en la raíz coclear.

3.1.4.1 Inmunohistoquímica.

Hemos confirmado inmunohistoquímicamente la presencia de los ADR α 1, α 2A y β 2 en las neuronas de la raíz coclear (Figura 15). Como control, en cada experimento la no adición del anticuerpo primario implicó la no tinción de las secciones, ni en el NRC, ni en el LC. En la raíz coclear, los anticuerpos contra los ADRs α 1, α 2A y β 2 (Figura 15) inmunotñieron cuerpos celulares de gran tamaño (~ 32-38 μ m de diámetro), los procesos axonales –dendritas- de estas neuronas (~ 2 μ m) y también se marcaron fibras rectas y delgadas (~ 1,5 μ m) *en passage* distribuidas por toda la longitud del núcleo.

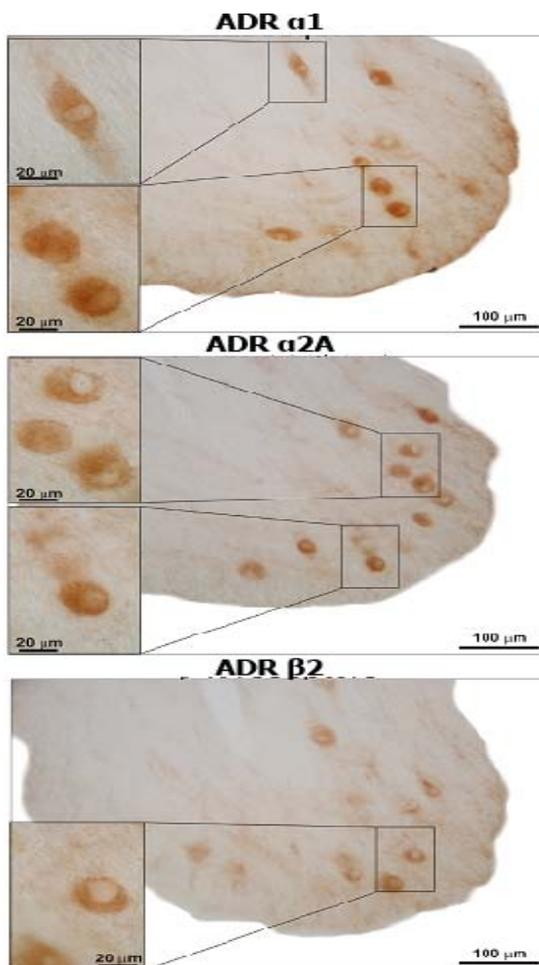


Figura 15. Fotomicrografías de la inmunotinción para los receptores noradrenérgicos en la raíz coclear.

Las imágenes insertadas corresponden a neuronas de la raíz coclear que se disponen en el cuadrado negro a gran aumento.

3.1.4.2 Expresión de receptores noradrenérgicos en la región del nervio coclear.

Observamos que en la raíz del nervio coclear se expresan los mRNAs de todos los ADRs ($\text{ADR}\alpha$ 1A-C, $\text{ADR}\alpha$ 2A-B y $\text{ADR}\beta$ 1-2) en ratas controles (Figura 16). De ellos, los subtipos α 1B, α 2A α 2B y β 1 son los que se encuentran en mayor cantidad (Figura 16). La mayor parte de estos mRNA presentan una marcada expresión en las células de la corteza prefrontal y el hipocampo, por lo que se usan como controles positivos (Figura 16).

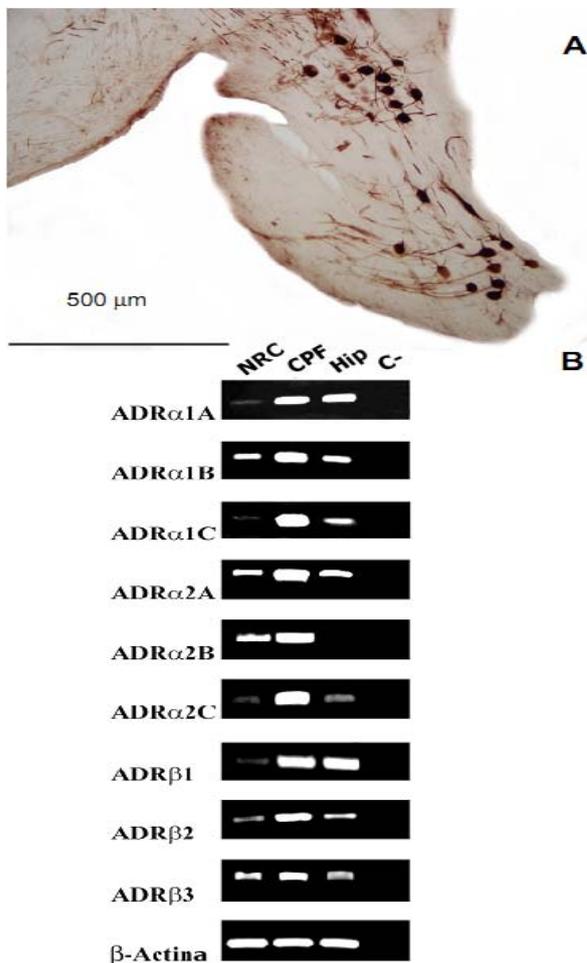


Figura 16. Expresión de mRNA para los receptores noradrenérgicos.

A: neuronas típicas de la raíz coclear teñidas para la proteína calbindina D28K. B: diferentes niveles de expresión de los ADRs en las células del nervio de la raíz coclear, la corteza prefrontal, el hipocampo y el control negativo durante la fase exponencial de las diferentes PCRs. Ver lista adjunta para las abreviaturas.

Analizando la expresión de todos los diferentes ADRs comparando ratas machos controles con respecto a hembras controles observamos que en la raíz coclear existe una gran diferencia de expresión de los genes que codifican los ADRs entre ambos sexos, en cantidad y en subtipos de receptores. Las ratas macho expresan una mayor cantidad de mRNA de los receptores α 1A, α 2C, β 1 y β 3 (Figura 17), mientras que las hembras,

tienen una mayor expresión de mRNA de los tipos $\alpha 1C$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ y $\beta 3$ (Figura 17). Sólo hemos encontrado un subtipo de ADR cuya expresión no difirió significativamente entre machos y hembras, el $\alpha 1B$ (Figura 17 A). Los datos de las eficiencias para los distintos cebadores utilizados vienen recogidos en la tabla 4.

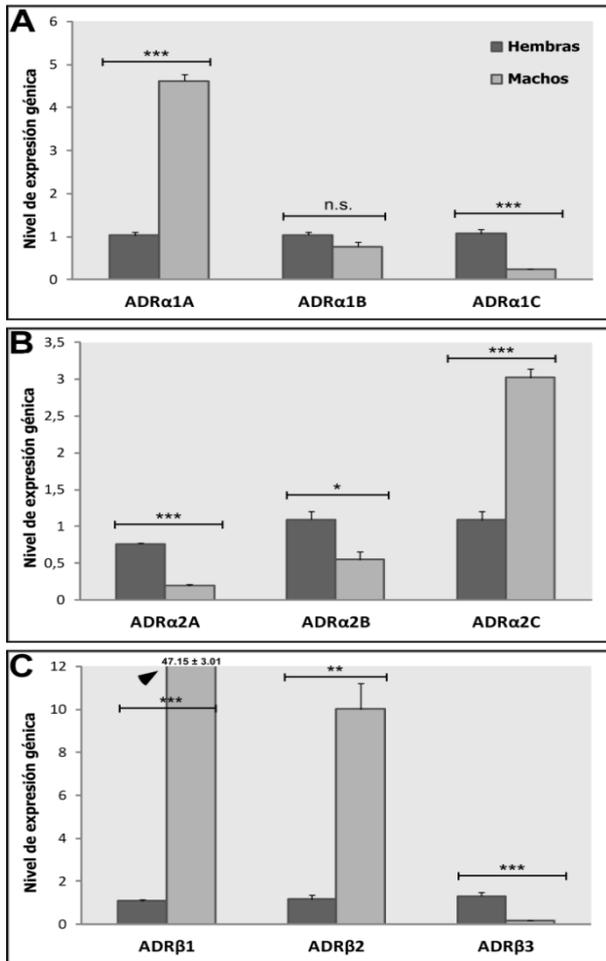


Figura 17. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a las hembras.

A: los receptores del subtipo $\alpha 1$.
 B: los receptores del subtipo $\alpha 2$.
 C: los receptores del subtipo β .
 Nótese la gran diferencia existente intersexual en la expresión de los mRNA para los 9 subtipos.

	CONTROL	DSP-4
ADR $\alpha 1A$	100,99	107,79
ADR $\alpha 1B$	108,3	105,98
ADR $\alpha 1C$	107,03	101,01
ADR $\alpha 2A$	124,35	116,67
ADR $\alpha 2B$	98,43	107,01
ADR $\alpha 2C$	110,39	104,27
ADR $\beta 1$	94,45	105,9
ADR $\beta 2$	101,24	106,8
ADR $\beta 3$	102,1	96,46
β -actina	102,8	101,32

Tabla 4. Eficiencias de los cebadores utilizados en las PCR cuantitativas.

La diferencia en la eficiencia entre animales controles y tratados con DSP-4 es menor del 10% en todos los casos, por lo que se utilizó el método comparativo de las Ct para analizar los datos de expresión génica. Los datos se expresan en porcentaje.

3.2 Neuroanatomía del locus coeruleus: dimorfismo sexual.

La inmunohistoquímica contra la enzima DBH en el LC, que muestra gran cantidad de células que sintetizan NA, junto con la tinción Nissl, proporcionan una visión anatómica global del LC. Con estas tinciones, observamos dos tipos de neuronas de tamaño medio en el LC: células multipolares y células fusiformes. Además, el LC está dividido citoarquitectónicamente en dos partes: ventral y dorsal. Las células multipolares (Figura 18) se localizan predominantemente en la parte ventral del LC y están menos densamente empaquetadas, mientras que las células fusiformes (Figura 18) se encuentran principalmente en la parte dorsal del LC y más densamente empaquetadas.

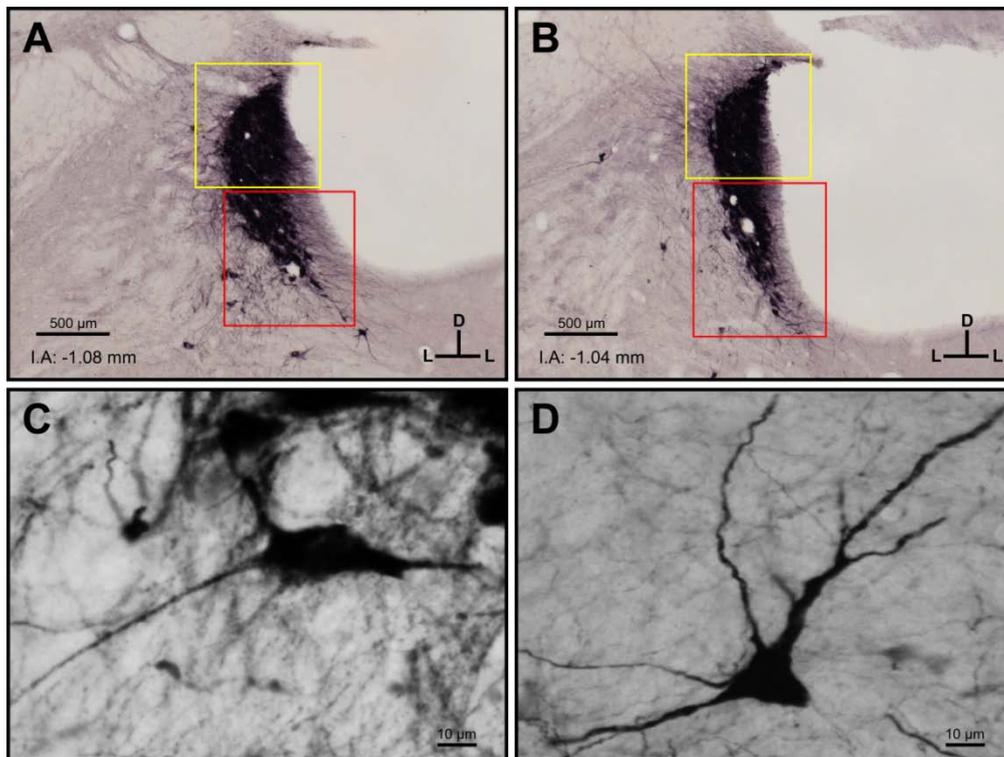


Figura 18. Configuración citoarquitectónica del locus coeruleus.

Imágenes representativas del LC en secciones coronales, desde un punto más caudal (A) hasta otro más rostral (B). El recuadro amarillo representa la parte dorsal del núcleo, donde se encuentran las células fusiformes densamente empaquetadas. El recuadro rojo representa la parte ventral del núcleo, donde se encuentran las células multipolares menos densamente empaquetadas. C: detalle de una neurona fusiforme típica de la región dorsal del LC, inmunoteñida contra DBH. D: detalle de una neurona multipolar típica de la región ventral del LC, inmunoteñida contra DBH.

Las neuronas fusiformes tienen un tamaño medio de $31,8 (\pm 8,1) \mu\text{m}$ y $23,5 (\pm 6,9) \mu\text{m}$ en los ejes mayor y menor respectivamente, presentando un núcleo oval de

tamaño medio $11,5 (\pm 4,2) \mu\text{m}$ y $8,2 (\pm 3,3) \mu\text{m}$ en los ejes mayor y menor ($n = 35$). En estas células, hay un único nucleolo en posición central, de $3,2 (\pm 0,8) \mu\text{m}$ de diámetro. Por otra parte, las neuronas multipolares tienen un diámetro medio de $28,7 (\pm 8,7) \mu\text{m}$, con núcleos redondeados de tamaño ligeramente mayores que los del otro tipo celular ($12 \pm 2,6 \mu\text{m}$ en ambos ejes; $n = 39$); el nucleolo de estas células es similar al de las células fusiformes.

3.2.1 Contaje celular.

La extensión rostrocaudal del LC no difiere sustancialmente entre sexos, con valores medios que oscilan desde $1520 - 1680 \mu\text{m}$ ($n = 12$). Sin embargo, existe una diferencia considerable en el número de neuronas entre los dos géneros (hembras ~ 1900 células; machos ~ 1400 células) (Figura 19 G). No hay diferencias en el recuento neuronal cuando se comparan el LC izquierdo y el derecho, dentro del mismo animal. Por otro lado, si observamos las células inmunoteñidas para visualizar la enzima DBH, también vemos una diferencia en el número de neuronas inmunopositivas en la división rostral del LC: los machos presentan un menor número de células en esta región comparado con las hembras (Figura 19 A, B, C y D). En los animales tratados con DSP-4, la inmunorreactividad típica del LC desaparece casi totalmente, quedando sólo algunas neuronas DBH-ir esparcidas en el núcleo (Figura 19 E y F).

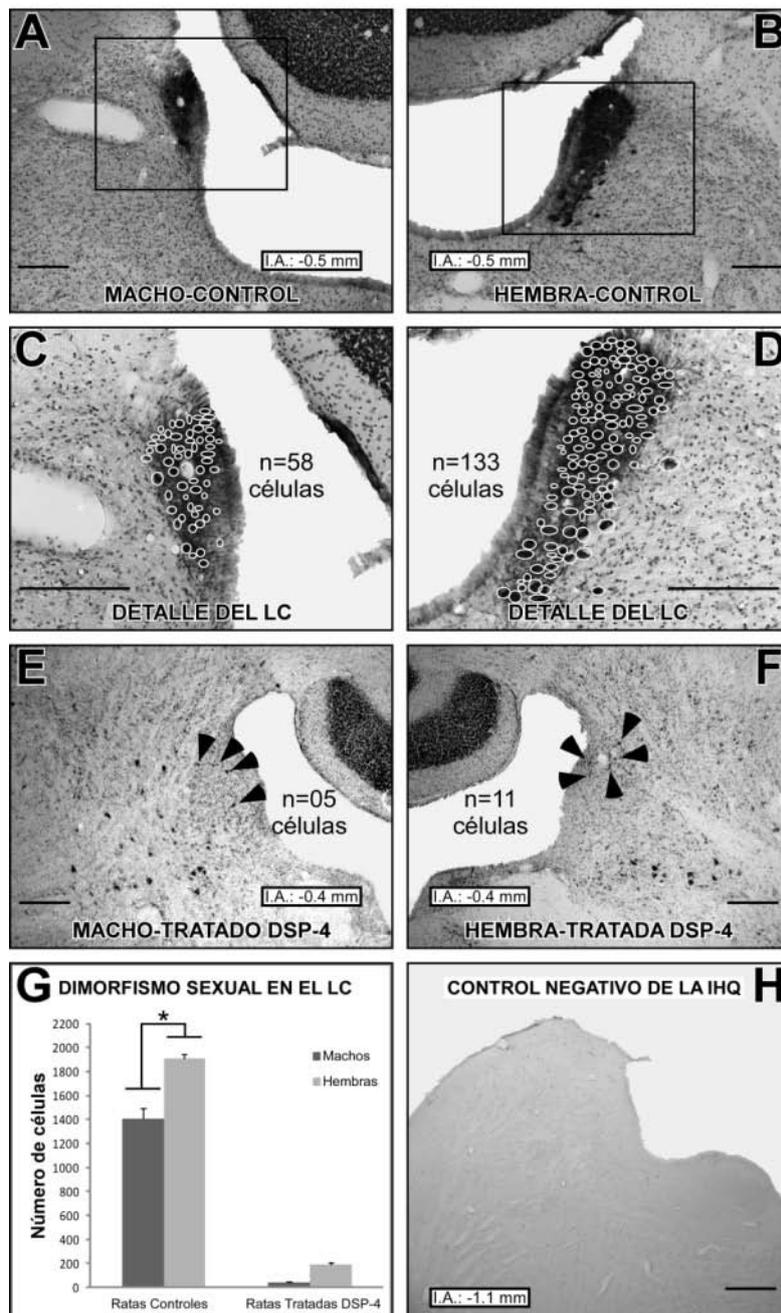


Figura 19. Estimación del número de neuronas en el locus coeruleus.

A: sección coronal de rata macho control que contiene el LC, inmunoteñido para visualizar la enzima DBH y contrateñida con violeta de cresilo. B: imagen similar a la A, en una rata hembra de control. C y D: detalle a gran aumento del área del cuadrado negro marcado en A y B respectivamente. Cada círculo blanco representa una neurona teñida. E y F: fotomicrografías de una sección coronal en la que se aprecia el LC inmunoteñido con anticuerpos contra DBH y contrastada con violeta de cresilo de un macho (E) y de una hembra (F) tratados con DSP-4. Cada punta de flecha negra representa una neurona. G: representación gráfica comparativa del número de células en el LC evidenciando el dimorfismo sexual (* $p = 0,014$) y la depleción provocada por DSP-4. H: fotomicrografía de una sección correspondiente a un control negativo (sin adición de anticuerpo primario). Barra de calibración = 500 μm en todas las fotomicrografías. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

En las preparaciones de tejido contrastado con el método de Nissl observamos que las ratas hembras controles presentan un mayor número de neuronas que las ratas machos controles ($t = -2,498$; $df = 10$; $p = 0,022$) (Figura 19 G). En la misma línea, las ratas hembras tratadas con DSP-4 presentan también un mayor número de neuronas inmunoteñidas que los machos tratados ($t = -2,268$; $df = 10$; $p = 0,014$) (Figura 19 G). Ambas variables, sexo (machos vs. hembras) y condición (controles vs. tratados con DSP-4) determinan el número de células inmunomarcadas del LC [$F_{(3, 11)} = 9,198$; $p = 0,021$], siendo las hembras las que tienen un mayor número de células. Por lo tanto, los conceptos de “dimorfismo sexual” y “deterioro neuronal causado por DSP-4” pueden ser acuñados para hablar sobre el número de células del LC atendiendo al sexo y sobre el efecto neurotóxico en el sistema noradrenérgico, respectivamente. Las secciones a las que no se le añadieron anticuerpos primarios no resultaron teñidas (Figura 19 H).

3.2.2 Reconstrucción tridimensional.

A través del programa informático Neurolúcida, hemos reconstruido la zona del tronco del encéfalo donde se encuentra el LC de varios casos controles de ambos sexos (Figura 20), pudiendo observar la disposición espacial de las neuronas del locus coeruleus a lo largo del eje rostro-caudal. Los resultados indican que el volumen del núcleo no varía entre sexos (Figura 21 A), aunque la distribución de las células sí que tiene una configuración diferente: en los machos se aprecia un mayor número de neuronas en las secciones más caudales (Figura 21 B), mientras que en las hembras se da un aumento celular en las porciones más rostrales del núcleo (Figura 21 B).

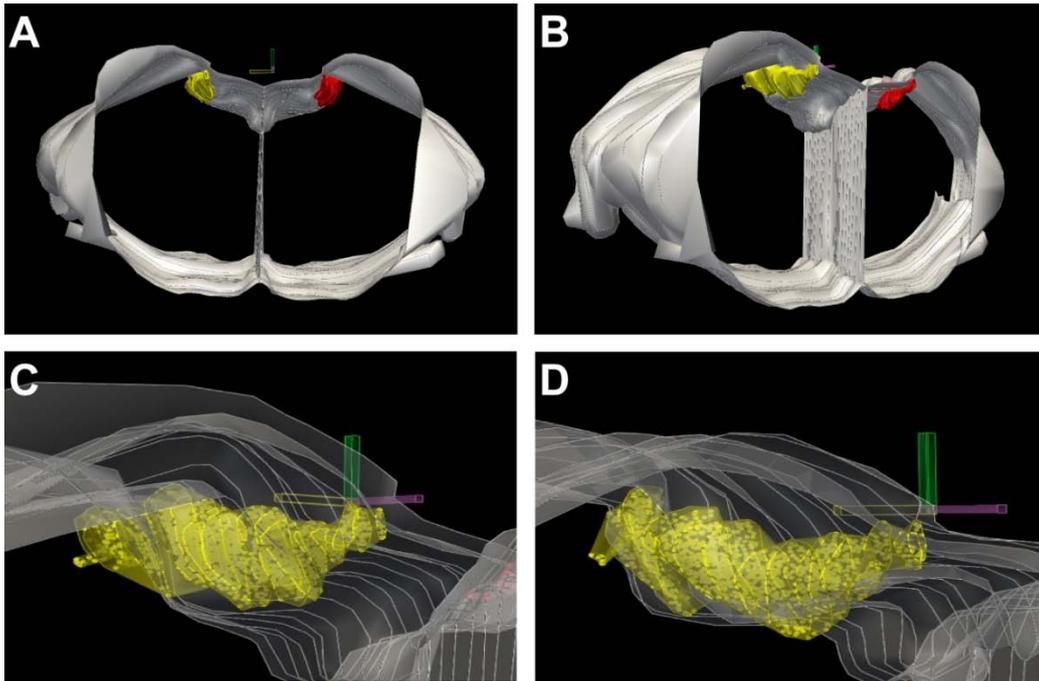


Figura 20. Reconstrucción tridimensional del locus coeruleus.

A y B: visión frontal y lateral (respectivamente) de la región del tronco del encéfalo donde se localiza el LC. C: reconstrucción del LC en una hembra control. D: reconstrucción del LC de un macho control. Nótese la diferencia en el número y densidad neuronal entre hembras y machos en la zona central del núcleo. Las barras de calibración en las tres dimensiones representan 500 μm .

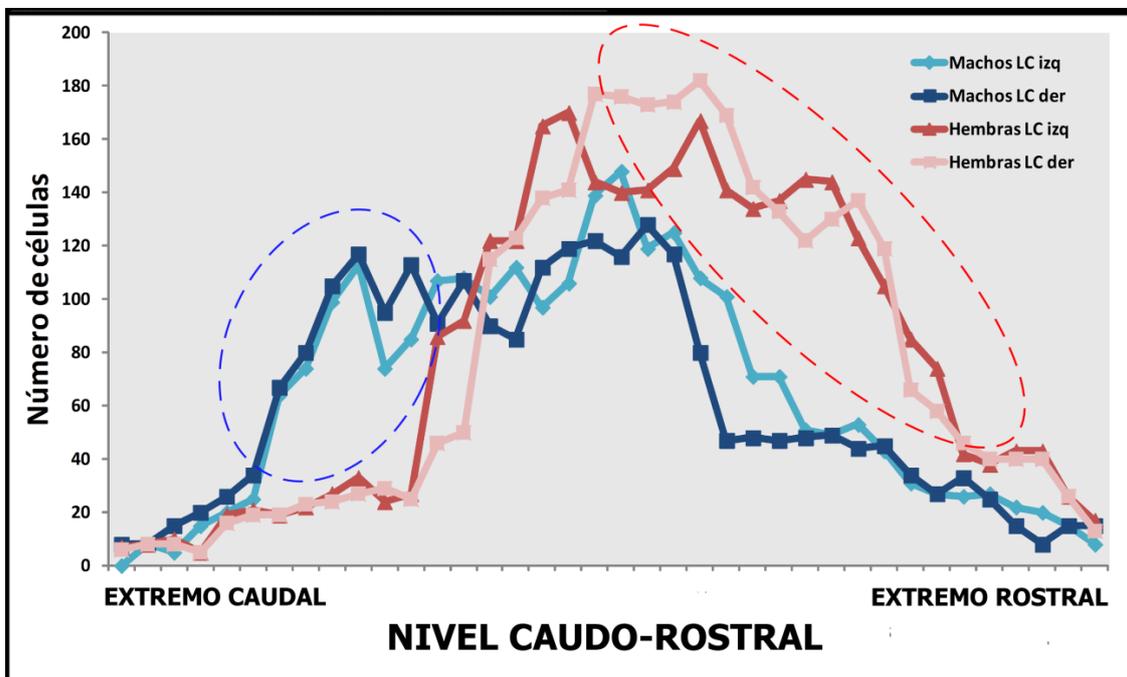


Figura 21. Número de neuronas en la extensión del locus coeruleus.

Número de células por corte (40 μm de grosor) desde el punto más caudal del LC (sección 1) hasta el más rostral (sección 38). Las elipses señalan las zonas donde existe una mayor diferencia inter-sexo.

3.3 Pérdida de inervación noradrenérgica tras la inyección de DSP-4.

La administración del neurotóxico provocó, entre otros efectos, una disminución ponderal del animal, pesando los animales tratados un 12% menos que los controles a la semana de la inyección y un 9% menos después de dos semanas del tratamiento. La administración de DSP-4 en ratas también causó cambios en la micción (concretamente, una pérdida del patrón de ritmo de micción diurno) y un gran incremento en el volumen de vaciado y en la ingesta de agua. También detectamos trastornos del sueño durante los primeros 5 días post-tratamiento, aunque luego retornaban a los valores controles.

3.3.1 Influencia sobre la raíz coclear.

3.3.1.1 Inmunohistoquímica de receptores noradrenérgicos: cuantificación densitométrica.

En el NRC, la inmunotinción para los diferentes ADRs dio resultados diferentes según el sexo y en relación al tratamiento con DSP-4. Las ratas hembras controles mostraron la inmunorreactividad más alta al ADR $\alpha 1$ [$F_{(3, 11)} = 1,963$; $p = 0,033$] (Figura 22 A). Con el tratamiento, la presencia de este receptor disminuye, mostrando las hembras tratadas un decremento de un 15% en relación a las controles ($t = -6,584$; $df = 5$; $p = 0,034$). Sin embargo, las ratas macho tratadas con DSP-4 tuvieron un incremento en la densidad óptica de la inmunotinción para este subtipo de receptor cercano al 100% (medida por el valor medio de grises en este receptor con respecto a los machos controles) ($t = -10,052$; $df = 5$; $p = 0,007$) (Figura 22 A).

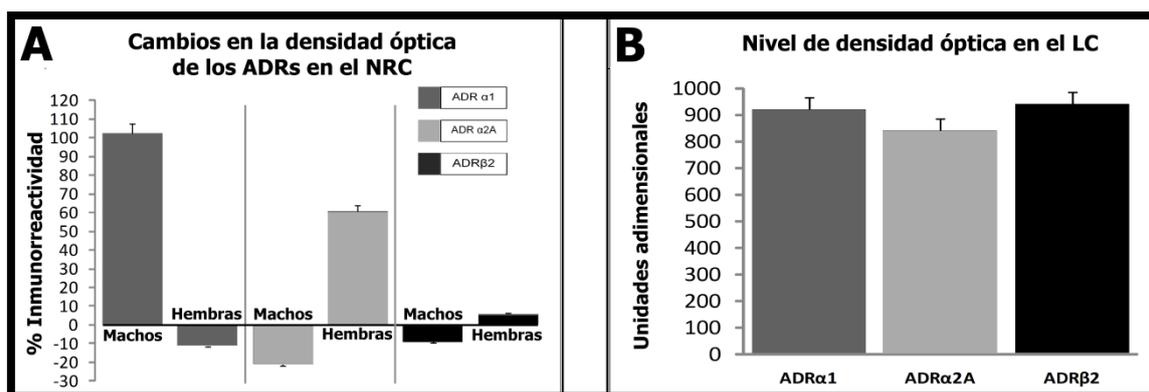


Figura 22. Patrón de distribución de inmunorreactividad de los diferentes receptores noradrenérgicos.

A: cambio de la inmunorreactividad en el NRC (animales tratados con DSP-4 vs. controles), ordenados por el subtipo de receptor y el sexo. El porcentaje negativo significa que hubo un decremento y el positivo que hubo un aumento. B: comparación del nivel de densidad óptica obtenido a través del valor medio de grises de la inmunotinción de los diferentes ADRs en el LC. Dato de control positivo de los anticuerpos. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

Para el receptor $\alpha 1$, también se encuentra una variación significativa ($p = 0,021$) en la inmunotinción en relación al género: por una parte, el grupo de ratas controles mostró diferencias significativas entre machos y hembras ($p = 0,001$), lo cual no ocurre en el grupo de ratas tratadas con DSP-4 ($p = 0,854$). Por lo tanto, el efecto del incremento en la densidad óptica de la inmunotinción para el ADR $\alpha 1$ tras el tratamiento se observa en las ratas macho principalmente, aunque menos en las hembras (Figura 22 A).

Para el receptor $\alpha 2A$, las ratas hembras exhibieron mayores niveles de inmunorreactividad en relación a los machos [$F_{(3, 11)} = 1,821$; $p = 0,041$] (Figura 22 A). Sin embargo, son las ratas tratadas las que mostraron un mayor incremento comparadas con las hembras controles, en torno al 60% ($t = -8,552$; $df = 5$; $p = 0,016$). Por otro lado, los machos tratados sufrieron un decremento de un 25% en la densidad óptica de la inmunotinción para este receptor, comparados con los controles ($t = -8,864$; $df = 5$; $p = 0,028$) (Figura 22 A).

En la inmunotinción para el ADR $\beta 2$, medida densitométricamente, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el sexo o la condición [$F_{(3, 11)} = 2,107$; $p = 0,425$] (Figura 22 A), aunque los machos tratados disminuyeron un 10% su inmunorreactividad para este subtipo de receptor y las hembras la incrementaron un 8% en relación a sus respectivos controles (Figura 22 A).

Como control positivo, hemos estudiado también la inmunorreactividad para los tres ADRs en el LC (Figura 22 B), encontrando una densidad óptica de la

inmunotinción ligeramente mayor para la subunidad $\beta 2$, seguido de la subunidad $\alpha 1$ y en último lugar para la subunidad $\alpha 2A$ (Figura 22 B).

3.3.1.2 Expresión de receptores noradrenérgicos.

Comparando los animales tratados con DSP-4 con los controles, hemos observado que las neuronas del NRC modifican la mayoría de los diferentes ADRs, manifestado por los cambios observados en la cantidad de sus mRNA.

En los machos tratados, hay un incremento en la expresión génica: de todos los subtipos de receptores noradrenérgicos, $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1C$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. Los aumentos más significativos fueron para el subtipo $\alpha 1C$ (más de 20 veces con respecto al control), el $\alpha 2A$ (casi 50 veces más que el control) y el $\beta 3$ (casi 10 veces con respecto a los animales controles) (Figura 23 A, B y C, respectivamente). También, las hembras tratadas con DSP-4 expresaron mayor cantidad de mRNA que las controles de los subtipos de receptor $\alpha 2A$ y $\beta 1$ (este último tuvo un incremento de más de 130 veces) (Figura 24).

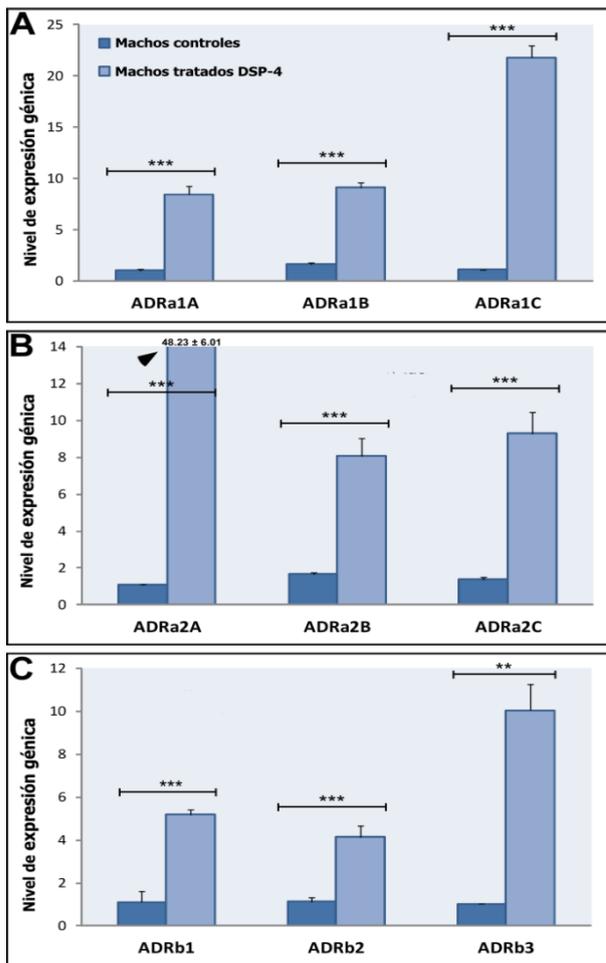


Figura 23. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a los machos controles.

A: receptores del subtipo $\alpha 1$. B: receptores del subtipo $\alpha 2$. C: receptores del subtipo β . Nótese la gran diferencia existente entre tratados y controles en la expresión de los mRNA para los 9 subtipos.

Por otro lado, en las ratas hembras tratadas hemos hallado menor expresión génica de los receptores noradrenérgicos en los subtipos de receptor $\alpha 1A$, $\alpha 1C$, $\alpha 2B$ y $\beta 3$ que las hembras controles (Figura 24 A, B; y C respectivamente). Finalmente, sólo tres subtipos de ADR, $\alpha 1B$, $\alpha 2C$ y $\beta 2$, no sufrieron ningún cambio en su expresión génica en las hembras con o sin tratamiento con DSP-4 (Figura 24).

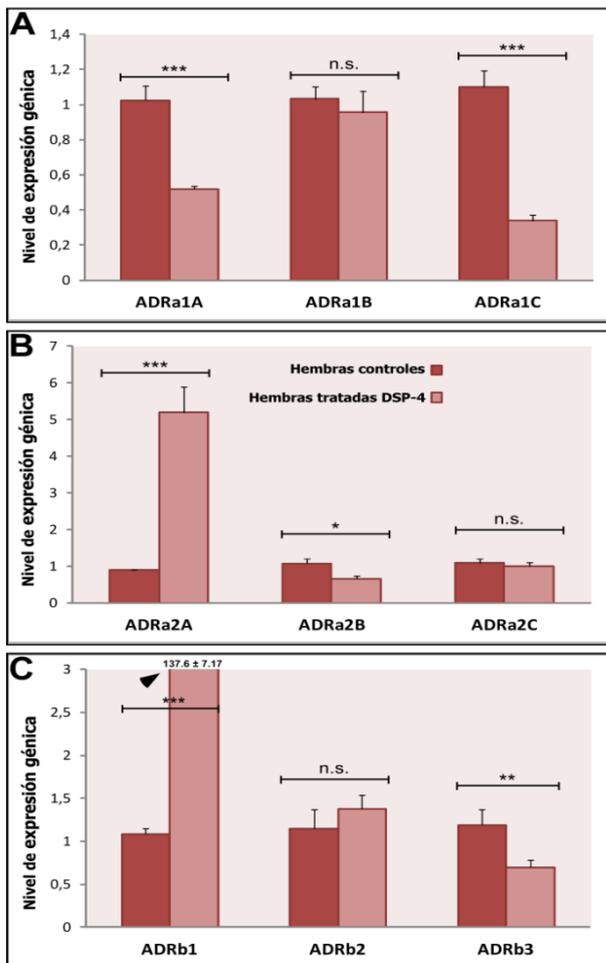


Figura 24. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a las hembras controles.

A: receptores del subtipo $\alpha 1$. B: receptores del subtipo $\alpha 2$. C: receptores del subtipo β . Nótese la gran diferencia existente entre tratadas y controles en la expresión de los mRNA para los 9 subtipos.

A la luz de estos datos, nos planteamos realizar la comparación de la expresión de los ADRs entre machos y hembras tratados con DSP-4, para ver si se mantenían los patrones de expresión de los controles o si se daba la posibilidad de algún cambio en la producción de los mRNAs debida a la acción del DSP-4 dependiendo del sexo. Los resultados indican que los patrones de expresión se mantienen para los subtipos $\alpha 1A$, $\alpha 2C$, $\beta 1$ y $\beta 2$, curiosamente son los subtipos de receptor cuya producción era mayor en machos que en hembras (Figura 25 A, B y C) y se da una inversión en los subtipos $\alpha 1B$, $\alpha 1C$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ y $\beta 3$, ahora los machos los expresan más, mientras que antes no había diferencia significativa por sexo, o eran las hembras las que tenían una mayor producción (Figura 17 y 25).

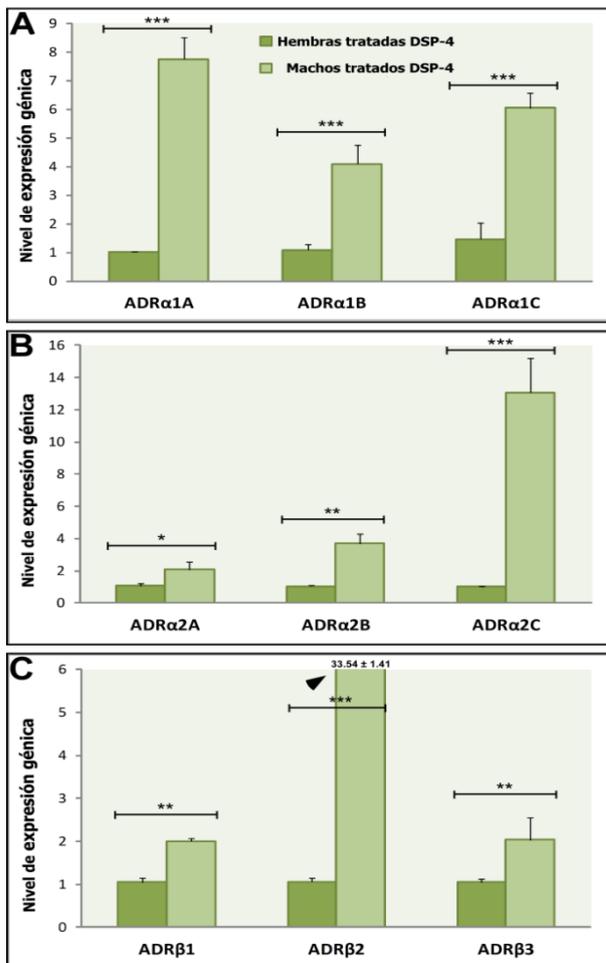


Figura 25. Expresión génica de los receptores noradrenérgicos normalizada con respecto a las hembras tratadas con DSP-4.

A: receptores del subtipo α 1. B: receptores del subtipo α 2. C: receptores del subtipo β . Nótese la gran diferencia existente intersexual en la expresión de los mRNA para los 9 subtipos.

Las ratas machos tratadas con DSP-4 experimentaron aumentos en la expresión de todos los subtipos de receptores noradrenérgicos, mientras que este fenómeno no es consistente en las hembras, en las que se dan procesos de sobre-expresión, de sub-expresión o de mantenimiento en la expresión de los mRNAs de los distintos ADRs.

3.3.1.3 Comparación de la expresión de los receptores noradrenérgicos: IHQ versus RT-qPCR.

Todos estos datos son consistentes con los obtenidos en las IHQ para los ADRs, como hemos visto anteriormente. Concretamente, la inmunotinción contra el ADR α 1 mostró un incremento en los machos tratados comparados con los controles y también un descenso en este valor en las hembras tratadas comparadas con las controles. De forma similar, la cantidad de mRNA del subtipo de ADR α 1A mostó casi los mismos resultados (Figuras 22 A, 23 A y 24 A).

La variación encontrada para el receptor ADR α 2A es similar en ambos acercamientos metodológicos, la ICH y la RT-qPCR: en los machos tratados hubo una reducción en este subtipo comparado con los machos controles, mientras que en las hembras tratadas se da un incremento en este mismo receptor comparadas con las hembras controles (Figuras 22 A, 23 B y 24 B).

Finalmente, el mismo patrón es exhibido para la producción del ADR β 2: ambas técnicas metodológicas mostraron un decremento en los machos tratados comparados con los controles y un incremento en las hembras tratadas comparadas con las controles (Figuras 22 A, 23 C y 24 C).

3.3.2 Influencia noradrenérgica sobre el colículo inferior.

3.3.2.1 El locus coeruleus envía proyecciones al colículo inferior.

Los experimentos de trazado anterógrado consistieron en una inyección de BDA en el LC izquierdo (Figura 26 A). La zona de inyección resultante fue elíptica, con un tamaño típico de $\sim 600 \times 600 \mu\text{m}$ en los ejes rostrocaudal y lateromedial. Usamos solamente aquellas inyecciones que no difundieron hacia los núcleos adyacentes, como por ejemplo el núcleo tegmental laterodorsal (LDTg). Las inyecciones estaban restringidas al centro del LC. Detectamos marcaje anterógrado en objetivos conocidos del LC, como el núcleo dorsal del rafe (Kim y cols., 2004) y también en estructuras cerebrales de las vías somatosensoriales, como la corteza somatosensorial, el núcleo ventrobasal del tálamo y los principales núcleos relacionados con el trigémino (Simpson y cols., 1997). En todos los casos, observamos fibras marcadas con BDA rectas, delgadas ($1,04 \pm 0,78 \mu\text{m}$), con varicosidades y también fibras marcadas con BDA ramificadas, delgadas ($0,8 \pm 0,15 \mu\text{m}$) con botones terminales (plexo terminal) en ambos lados del CI (Figura 26 B, C D y E). Estas fibras terminales se localizan predominantemente en las cortezas lateral y dorsal y en la comisura intercolicular.

La proyección LC-CI es principalmente ipsilateral ($\sim 90\%$), aunque cada LC envía algunas fibras a su lado contralateral ($\sim 10\%$) (Figura 26 F). También encontramos algunas fibras marcadas en el núcleo central del colículo inferior (NCCI).

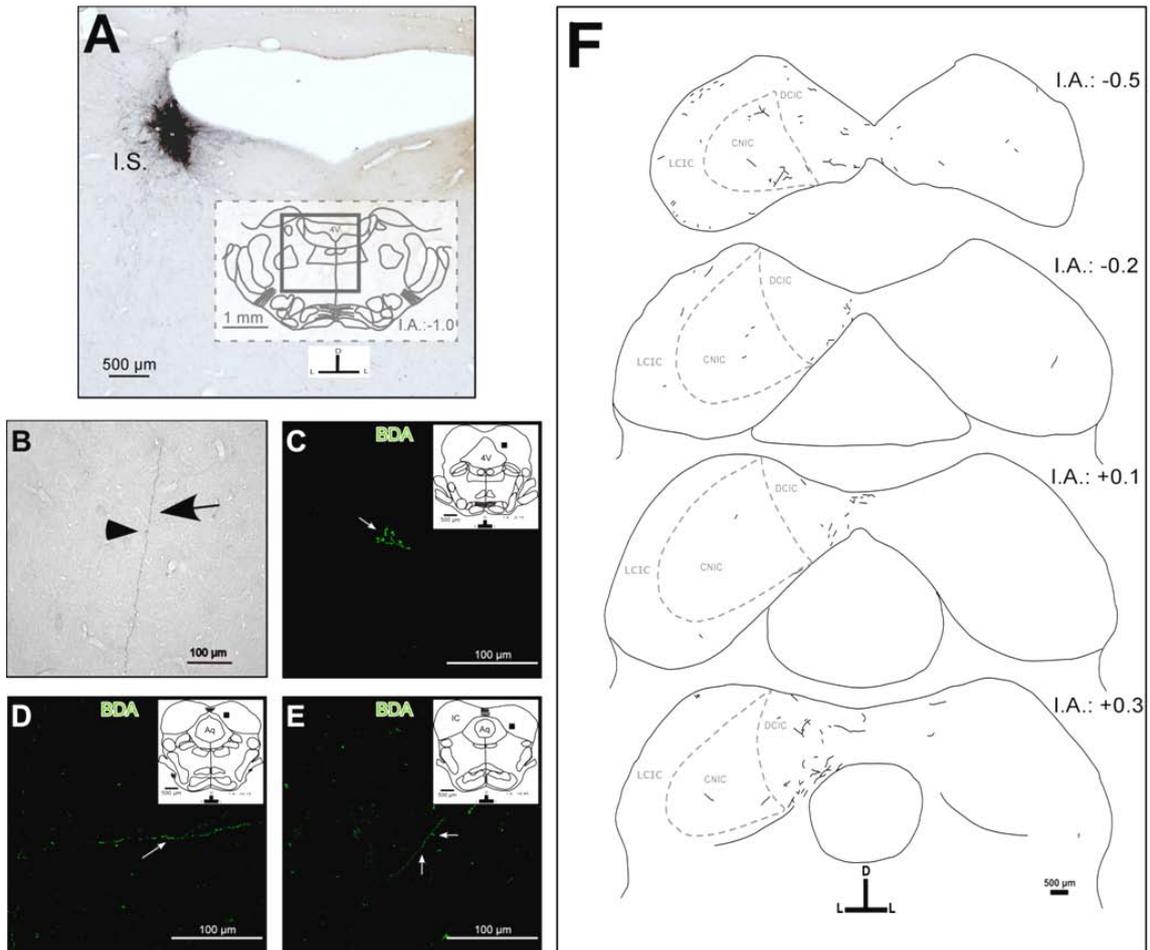


Figura 26. Áreas objetivo y patrón de proyección de las fibras del locus coeruleus dentro del colículo inferior.

Los esquemas insertados representan a las secciones coronales en los diferentes niveles rostrocaudales a modo de referencia anatómica y el recuadro negro representa el área fotografiada a gran aumento. A: fotomicrografía representativa de un típico sitio de inyección estereotáxica de BDA en el LC izquierdo (en negro). B: fotomicrografía de una fibra típicamente marcada en el CO originada en el LC. La flecha indica una fibra y la punta de flecha indica una varicosidad. Desde C a E: fotomicrografías confocales de fibras marcadas con BDA dentro del CI. C: la flecha indica botones sinápticos. D: la flecha indica fibras únicas. E: la flecha indica una fibra y la punta de flecha indica botones sinápticos. F: representación esquemática de las fibras marcadas con BDA desde el LC encontradas en el CI y las subdivisiones anatómicas internas del CI. Nótese que existen fibras marcadas tanto en el lado ipsi- como en el contralateral. El nivel interaural para colocación coronal se muestra en milímetros. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

3.3.2.2 Identidad neuroquímica de las fibras terminales del locus coeruleus en el colículo inferior.

Las fibras inmunorreactivas para TH (TH-ir) y DBH (DBH-ir) encontradas en el CI son similares en cuanto a su distribución y tamaño, a las fibras descritas como las fibras marcadas con BDA provenientes del LC. Observamos fibras arrosariadas TH-ir y DBH-ir que se ramifican en fibras más delgadas con botones terminales (Figura 27 B y 28 B).

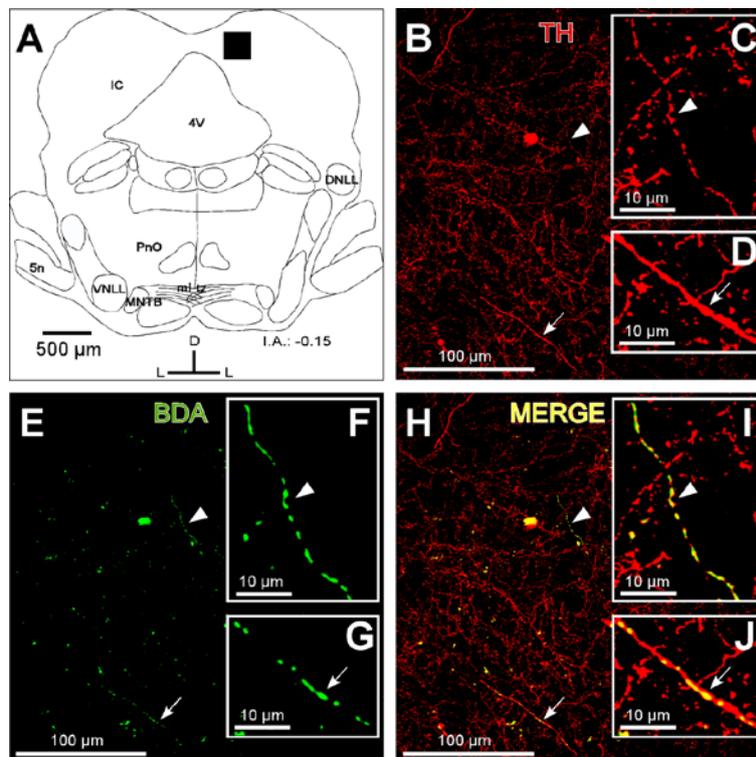


Figura 27. Colocalización de las fibras del locus coeruleus con la tirosina hidroxilasa en la corteza dorsal del colículo inferior.

A: representación esquemática de la sección coronal en la que fueron tomadas las siguientes fotomicrografías confocales. El recuadro negro describe el área exacta de las imágenes. B: imagen confocal que muestra la inmunoreactividad para TH en la CDCI (rojo). La flecha y la punta de flecha indican fibras marcadas con BDA, ampliadas en C y D, respectivamente. E: imagen confocal que muestra fibras marcadas (verde) tras la inyección de BDA en el LC. La flecha y la punta de flecha indican fibras marcadas con BDA representativas en la CDCI. Las imágenes a gran aumento de aquellas fibras se muestran en las inserciones F y G. H: composición superpuesta de las fotomicrografías en B y E (amarillo). La flecha y la punta de flecha indican la colocalización de BDA y TH en las fibras representativas magnificadas en I y J, respectivamente. El nivel interaural para colocación coronal se muestra en milímetros. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

Para mostrar que los terminales marcados con BDA que provienen del LC contienen enzimas precursoras de la síntesis de catecolaminas, combinamos la inyección de BDA en el LC con la inmunohistoquímica para TH o DBH. Nuestros resultados muestran que las fibras marcadas con BDA desde el LC colocalizan con las fibras y terminales inmunopositivos para TH, indicando la naturaleza catecolaminérgica de la proyección LC-CI (Figura 27). Además, algunas fibras marcadas dentro del CI fueron identificadas como noradrenérgicas debido a la colocación del BDA y la inmunorreactividad positiva de fibras DBH (Figura 28).

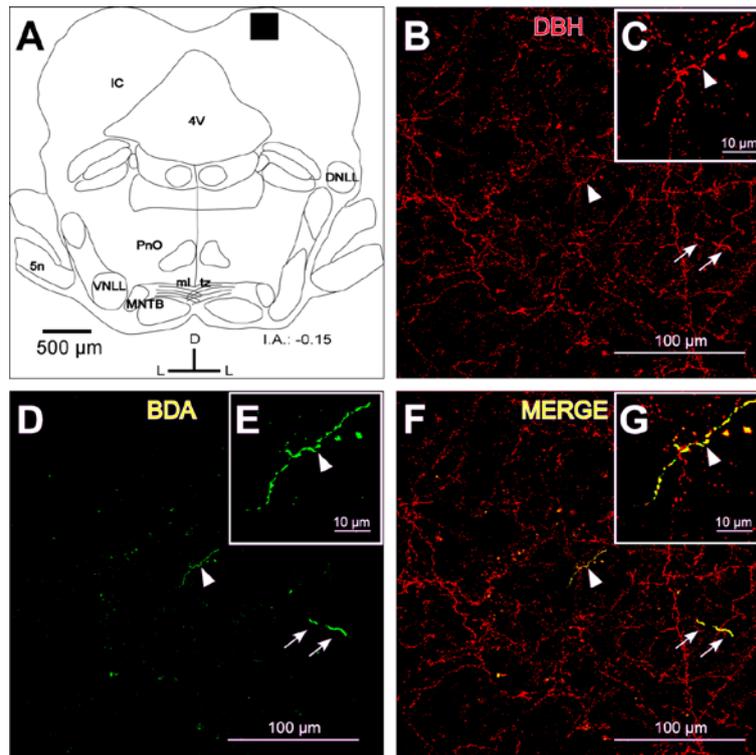


Figura 28. Colocalización de las fibras del locus coeruleus con la dopamina beta-hidroxilasa en la corteza dorsal del colículo inferior.

A: representación esquemática de la sección coronal en las que fueron tomadas las siguientes fotomicrografías confocales. El recuadro negro describe el área exacta de las imágenes confocales. B: imagen confocal de la inmunorreactividad para DBH (rojo). Las flechas indican una fibra representativa en dos partes, posiblemente debido al cuadro del eje Z y la punta de flecha muestra otra fibra representativa, magnificada en C. D: imagen confocal con fibras marcadas (verde) tras la inyección de BDA en el LC. Las flechas indican una fibra representativa y la punta de flecha muestra otra fibra representativa ampliada en E. F: composición superpuesta entre B y D (amarillo). La punta de flecha indica la colocación de una fibra, ampliada en G. Las flechas muestran colocación en otra fibra (amarillo). Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

A pesar del alto grado de colocación dentro del CI de las fibras TH-ir con las DBH-ir (Figura 29), no todas las fibras catecolaminérgicas eran noradrenérgicas. La inmunorreactividad para TH tenía una superposición espacial incompleta con la DBH-ir

(Figura 29), descubriendo las proyecciones dopaminérgicas en el CI en las zonas donde no existe colocalización para ambas enzimas.

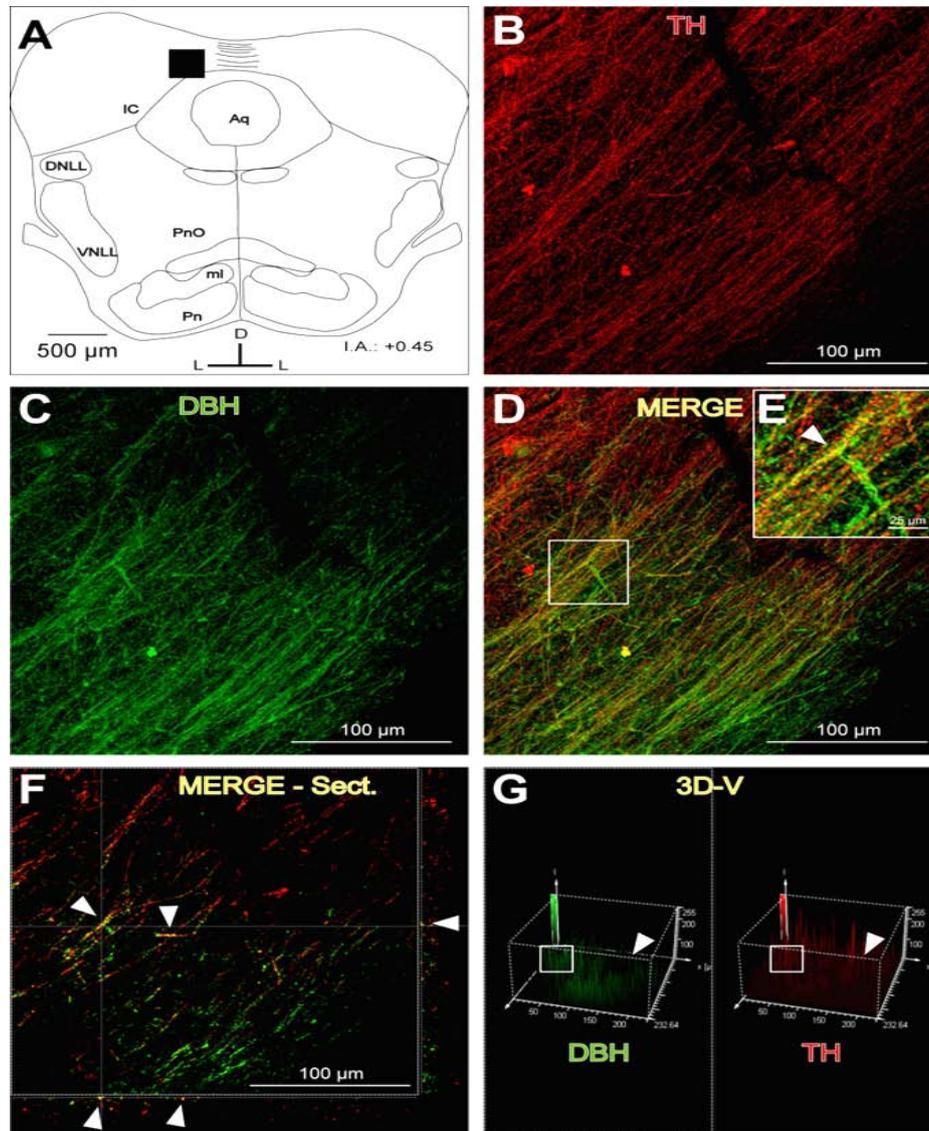


Figura 29. Distribución de fibras inmunomarcadas para tiroxina hidroxilasa y dopamina beta-hidroxilasa en el colículo inferior.

A: representación esquemática de la sección coronal en la que fueron tomadas las siguientes imágenes de confocal. El recuadro negro describe el área exacta de las imágenes confocales. B: inmunorreactividad para TH (rojo). C: inmunorreactividad para DBH (verde). D: composición fusionada de B y C (amarillo). E: ampliación del recuadro blanco de D. La punta de flecha indica colocalización de fibras (amarillo). F: vista ortogonal de una sección concreta de fibras colocalizadas. Las puntas de flecha indican fibras fusionadas y su posición en el eje Z. G: visión tridimensional de los dos canales. Las puntas de flecha muestran la diferencia entre las señales de la parte superior derecha donde hay fibras TH-ir (rojo), pero no fibras DBH-ir, lo que nos lleva a la conclusión de que las fibras dopaminérgicas (pero no noradrenérgicas) existen en el CI. El recuadro blanco indica la zona donde se encontraron las áreas de colocalización. Existe un patrón similar de distribución de señal. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

3.3.2.3 La administración de DSP-4 daña las proyecciones desde el locus coeruleus al colículo inferior.

Para determinar el campo total de la proyección del LC en toda la extensión rostrocaudal del CI y en sus subdivisiones, empleamos el método inmunohistoquímico para detectar las enzimas TH y DBH. En los animales controles, encontramos una intensa inmunorreactividad en el LC (Figura 30 A y B), con fibras y cuerpos celulares marcados para ambas enzimas. También observamos este patrón de inmunomarcaje de fibras y cuerpos celulares en toda la extensión rostral-caudal del LC. A los 14 días post-tratamiento con DSP-4, la inmunorreactividad para estas enzimas disminuyó considerablemente, por lo que las grandes neuronas de proyección y las fibras del LC ya no eran visualizadas con la inmunohistoquímica contra TH o DBH (Figura 30 C y D). Este hecho indica que los eferentes desde el LC se afectan por la acción del DSP-4, incluyendo a las fibras noradrenérgicas dentro del CI. Los controles negativos para las distintas inmunohistoquímicas (sin adición del anticuerpo primario) no muestran ninguna tinción para TH o DBH (Figura 30 E, F, G y H).

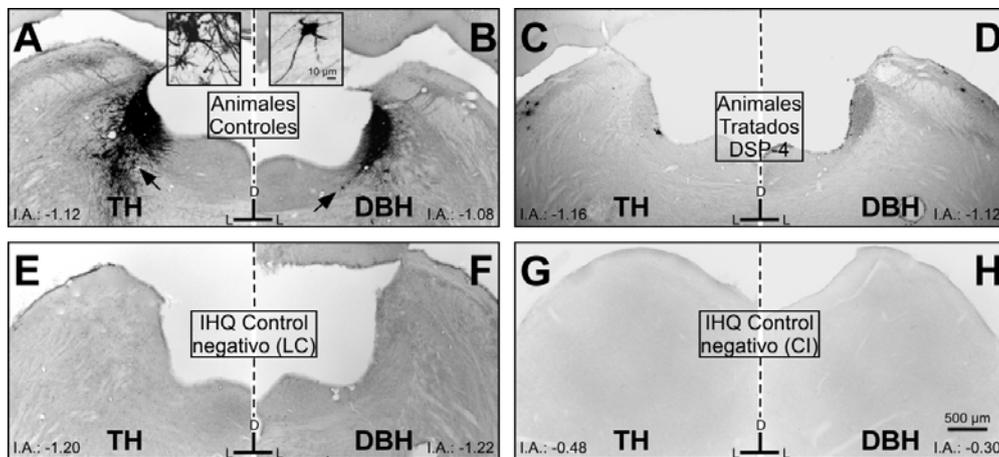


Figura 30. Efectos de la administración de DSP-4 en la inmunohistoquímica del locus coeruleus (tirosina hidroxilasa y dopamina beta-hidroxilasa). Comparativa con los controles negativos del locus coeruleus y del colículo inferior.

A: fotomicrografía del LC inmunoteñido para TH en un animal control. La flecha negra representa una neurona inmunorreactiva típica, que está ampliada en la imagen incrustada. B: fotomicrografía del LC inmunoteñido para DBH en una animal control. La flecha negra representa una neurona inmunorreactiva típica, que está ampliada en la imagen incrustada. C y D: fotomicrografías del LC inmunoteñido para TH (C) o DBH (D) en una animal tratado con DSP-4. Nótese en este conjunto de imágenes cómo la inmunorreactividad para las enzimas catecolaminérgicas ha disminuido considerablemente, comparado con los controles. E, F, G y H: imágenes tomadas de los controles negativos (no se añadió el anticuerpo primario). Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

Para una mejor descripción de los resultados, dividimos la extensión rostrocaudal del CI en tres partes diferentes: caudal, media y rostral. Hemos encontrado una densa TH-ir en la totalidad del CI en los animales controles, con los mayores niveles de inmunomarcado a nivel caudal, principalmente en la CDCI y en el NCCI (Figura 31 A). Las fibras estaban dispersas homogéneamente en el CI y no existen diferencias significativas en la distribución a lo largo de las subdivisiones ($p > 0,05$). Sin embargo, sí hubo una gran reducción en el número de fibras TH-ir en todas las subdivisiones del CI en los animales tratados con DSP-4 (Figura 31 B). Las disminuciones más importantes fueron encontradas en las porciones caudal (72,9%, $p < 0,01$) y media (68,8%, $p < 0,01$) del NCCI y en toda la longitud de la CLCI (caudal 73%, media 72,3% y rostral 50,9%, para todos los casos $p < 0,01$) (Figura 31 C, D y E). La parte rostral de la CDCI y la comisura intercolicular permanecieron casi inalteradas, observándose una reducción de la TH-ir del 10% aproximadamente ($p < 0,05$) (Figura 31 E).

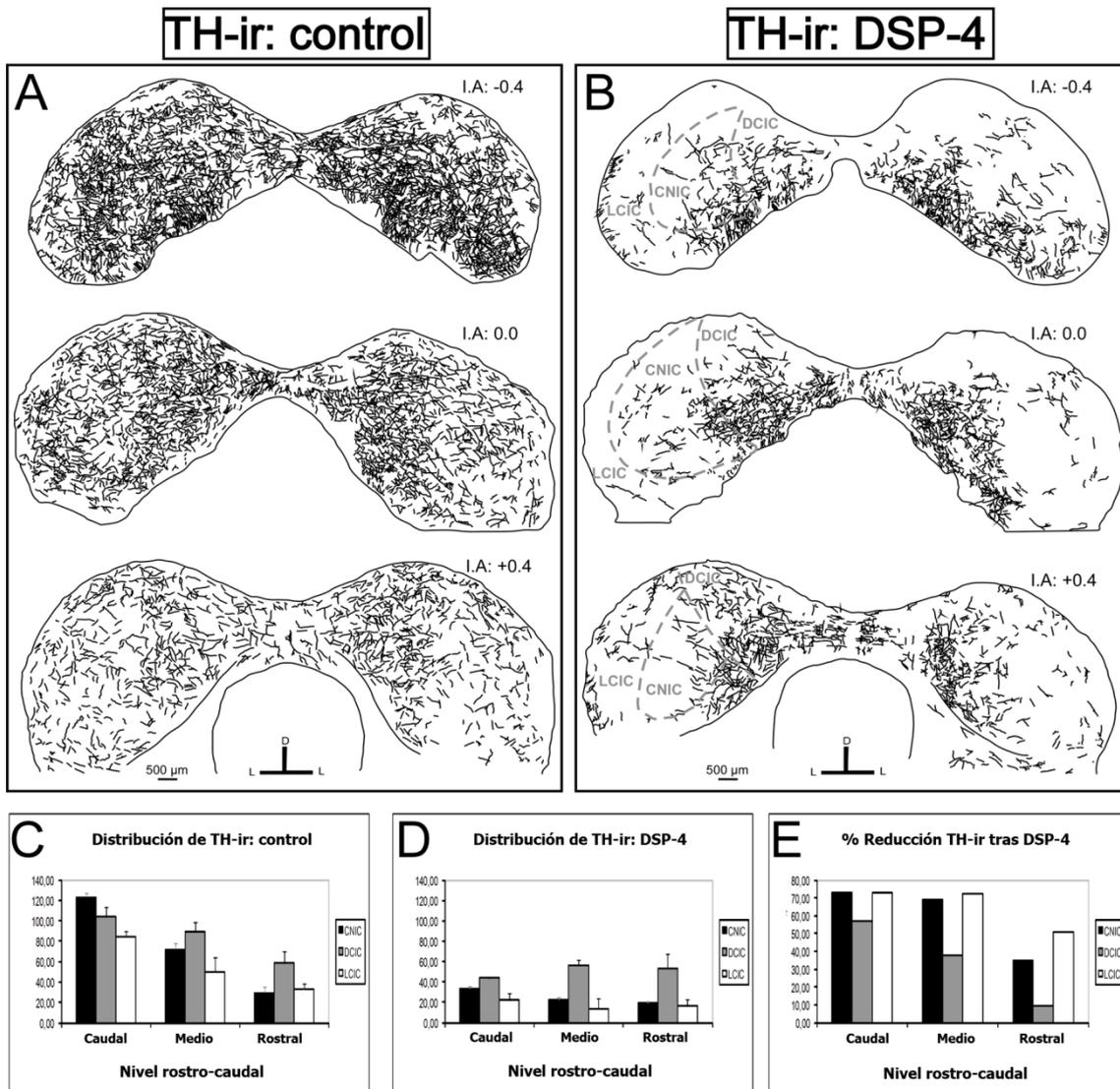


Figura 31. Efectos de la administración de DSP-4 en la inmunorreactividad para TH dentro del colículo inferior.

Representación esquemática de la TH-ir en el CI desde la parte caudal hasta la rostral. A: dibujos de la TH-ir en animales controles. B: dibujos de la TH-ir en animales tratados con DSP-4. Nótese cómo la inmunorreactividad ha descendido marcadamente en los animales tratados comparados con los controles. C: cuantificación de la distribución de la TH-ir en animales controles a diferentes niveles rostrocaudales y subdivisiones. D: cuantificación de la distribución de la TH-ir en animales tratados con DSP-4 a diferentes niveles rostrocaudales y subdivisiones. E: reducción porcentual en la TH-ir tras el tratamiento con DSP-4. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de 24 secciones teñidas. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

De manera similar, hemos encontrado una densa DBH-ir en todo el CI en los animales controles (Figura 32 A). La parte caudal presentó los mayores niveles de inmunomarcaje, principalmente la DCIC y el NCCI. Las fibras estaban dispuestas uniformemente en el CI y no había tampoco diferencia significativa en la distribución de éstas a lo largo de las distintas subdivisiones ($p < 0,05$). Sin embargo, la reducción en las fibras marcadas con DBH que mostraron los animales tratados con DSP-4 fue

extremadamente severa (Figura 32 B). El descenso de la DBH-ir tuvo lugar en toda la extensión caudo-rostral del CI y sus subdivisiones, con pérdidas de inmunotinción del 89% al 97% (para todos los casos, $p < 0,01$) (Figura 32 C, D y E).

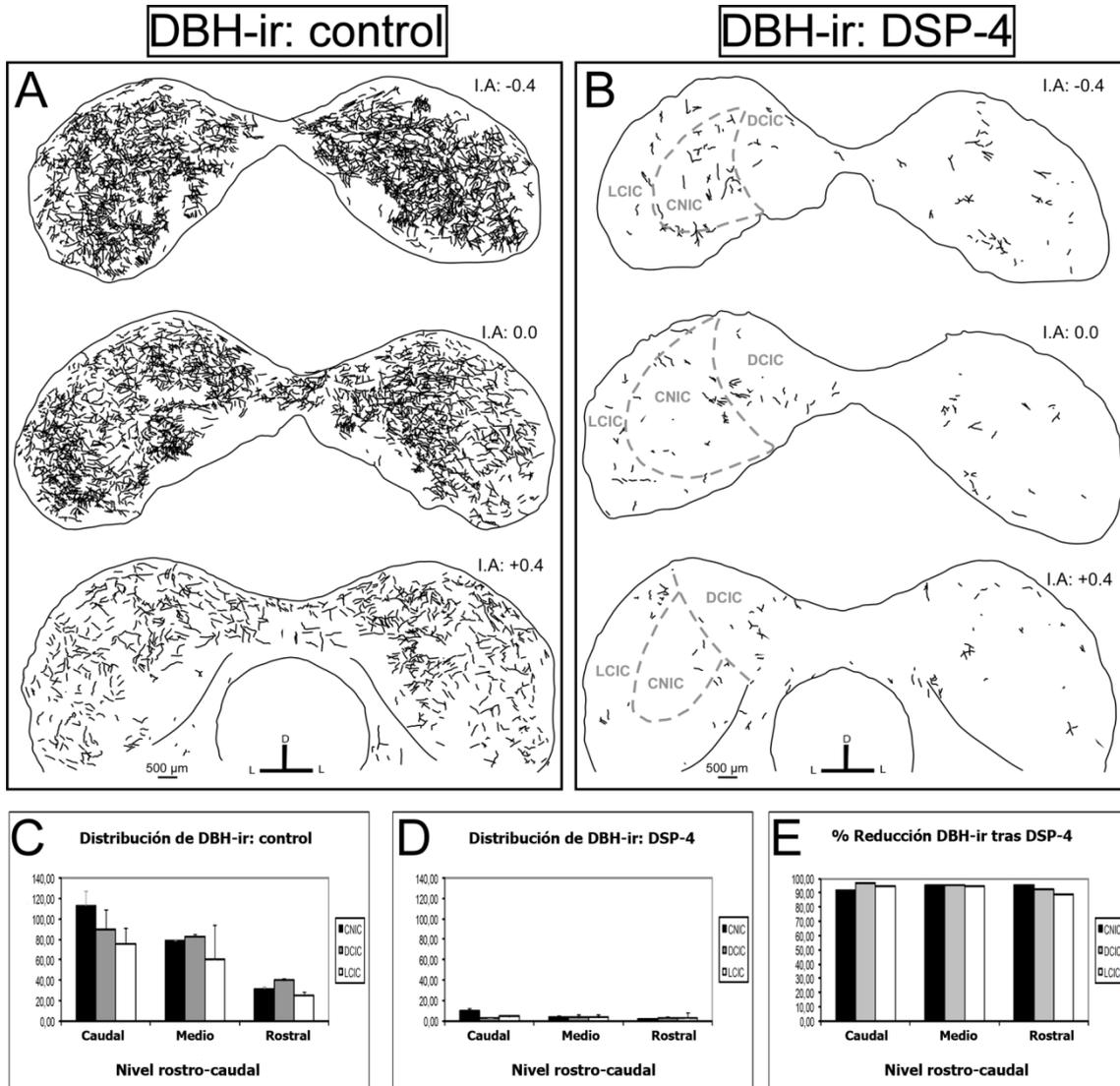


Figura 32. Efectos de la administración de DSP-4 en la inmunorreactividad para DBH dentro del colículo inferior.

Representación de la DBH-ir en el CI desde la parte caudal hasta la rostral. A: dibujos de la DBH-ir en animales controles. B: dibujos de la DBH-ir en animales tratados con DSP-4. Nótese cómo la inmunorreactividad casi ha desaparecido en los animales tratados comparados con los controles. C: cuantificación de la distribución de la DBH-ir en animales controles a diferentes niveles rostrocaudales y subdivisiones. D: cuantificación de la distribución de la DBH-ir en animales tratados con DSP-4 a diferentes niveles rostrocaudales y subdivisiones. E: reducción porcentual en la DBH-ir tras el tratamiento con DSP-4. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de 24 secciones teñidas. Ver la lista adjunta para las abreviaturas.

Basados en estos datos, concluimos que el DSP-4 suprime la mayoría de las fibras noradrenérgicas en el CI, dejando sólo unas pocas fibras esparcidas por las diferentes subdivisiones del CI y en la comisura intercolicular.

3.4 Estudios de HPLC.

De los metabolitos catecolaminérgicos, ni el compuesto HVA, ni el compuesto VMA fueron encontrados en las ratas machos o hembras en ninguna de las condiciones (controles o tratados con DSP-4) (Figura 33), mientras que las aminas DOPA, DA y NA y los ácidos carboxílicos DOPAC y MHPG, fueron encontrados en todas o en algunas de las seis regiones cerebrales estudiadas (Figura 33). En relación a los controles, en las ratas machos tratados encontramos un descenso en la cantidad de NA en la raíz coclear, además de un aumento de su metabolito, MHPG.

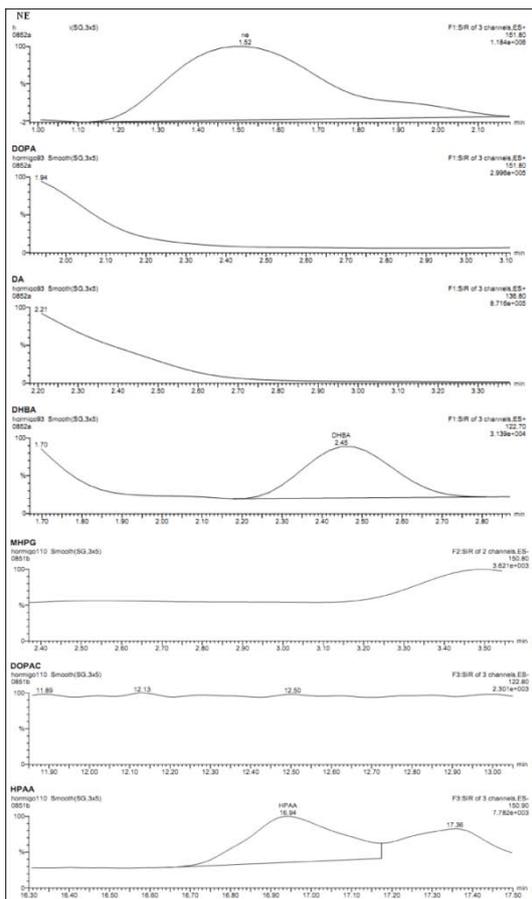


Figura 33. Datos obtenidos en la espectrometría de masas.

Datos de una de las muestras analizadas por HPLC-MS. Vemos que los compuestos detectados han sido las aminas NA, DA y DOPA; y los ácidos carboxílicos MHPG y DOPAC; además de los estándares internos DHBA y HPA. Ver lista adjunta para las abreviaturas.

Por el contrario, en la raíz coclear de las hembras tratadas con DSP-4 encontramos un aumento de NA de alrededor de un 50% comparadas con las controles y

un descenso en su metabolito MHPG (Figura 34 B). En el resto de las regiones estudiadas en el grupo de hembras tratadas, el tronco del encéfalo, el colículo inferior, el cerebelo, la corteza prefrontal y el bulbo olfatorio se aprecia un descenso tanto en la NA, como en su metabolito MHPG y un aumento en la DA –sustrato de la NA- (Figura 34 B).

En general, los animales de ambos sexos al ser tratados con DSP-4 experimentan una reducción de NA y su metabolito MHPG en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas, mientras que se da un incremento pronunciado en los precursores de NA: DA y DOPA (Figura 34).

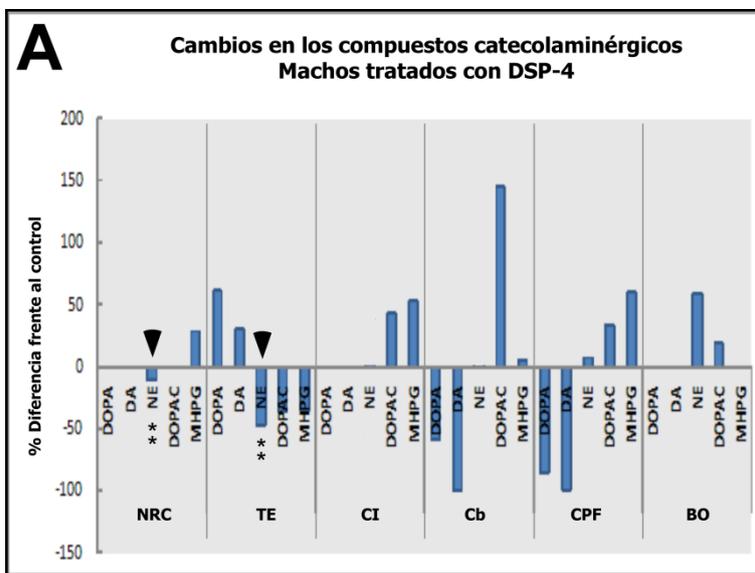
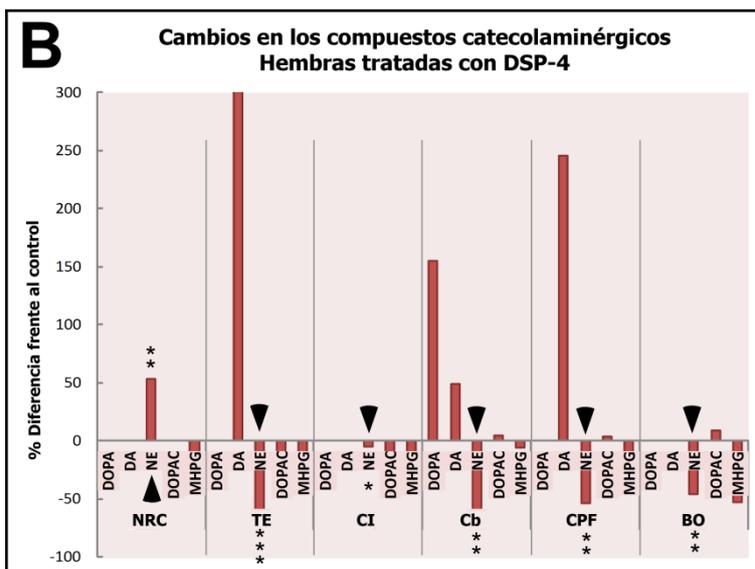


Figura 34. Representación de los cambios en la concentración de los compuestos catecolaminérgicos causadas por DSP-4.

A: gráfica de los machos tratados con respecto al control. B: gráfica de las hembras tratadas con respecto al control. El porcentaje negativo significa que hubo un decremento y el positivo que hubo un aumento. Las puntas de flechas muestran un decremento de NA en los animales tratados. Ver lista adjunta para las abreviaturas.



3.5 Estudios de modificación de la capacidad sensoriomotora.

En el día previo al tratamiento (Día 0), a todos los animales se les evaluó el RAS. En ese momento ya se observa una pequeña diferencia en la amplitud del reflejo de sobresalto entre sexos, siendo las ratas machos las que presentaban una mayor amplitud de respuesta, aunque sin diferencias significativas (Figura 35 A). En el día 7 post-tratamiento, la amplitud del reflejo de sobresalto en todos los grupos tendió a descender, aunque sin presentar diferencias significativas en relación al primer día. Esta reducción fue más pronunciada en las ratas hembras tratadas que en las controles, sin embargo en los machos se observó el fenómeno inverso (Figura 35 A). En el día 14 post-tratamiento con DSP-4, coincidiendo con los mayores niveles de depleción del sistema noradrenérgico coeruleo en los núcleos del tronco del encéfalo, la amplitud del RAS se mantuvo con valores menores que al inicio en todos los grupos excepto en el de los machos tratados con DSP-4, donde el valor de amplitud se disparó ($t = -2,579$; $df = 77$; $p = 0,016$) (Figura 35).

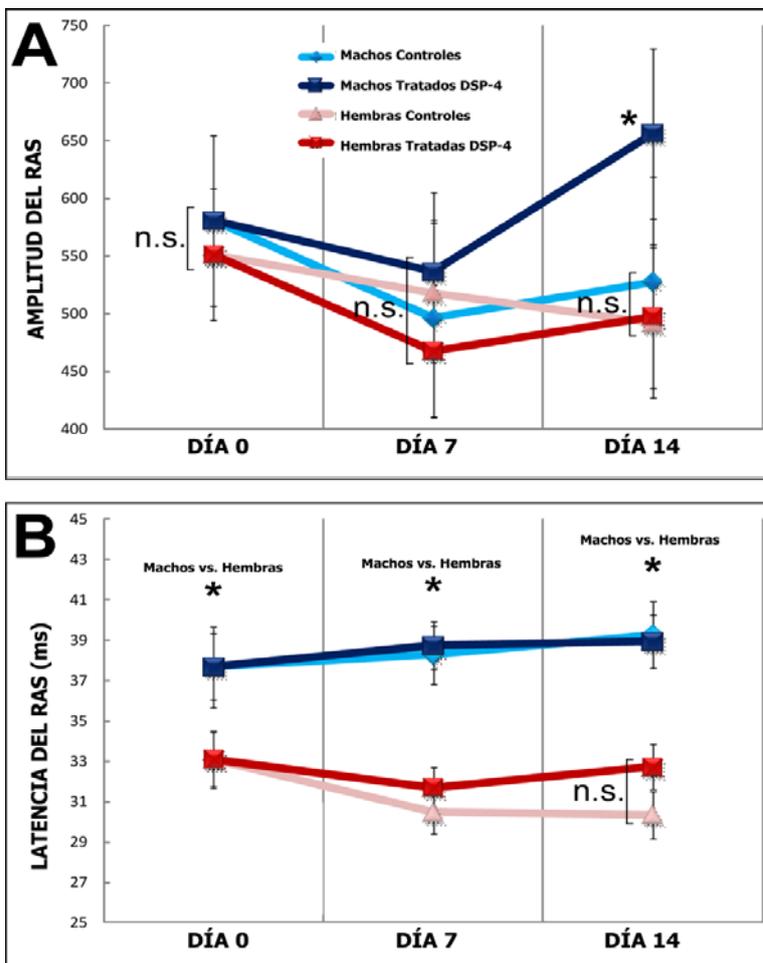


Figura 35. Representación del Reflejo auditivo de sobresalto: amplitud y latencia.

A: gráfica de progresión a lo largo del tiempo (día 0, 7 y 14) de la amplitud del RAS en todos los grupos. B: gráfica de progresión a lo largo del tiempo (día 0, 7 y 14) de la latencia del RAS en todos los grupos. Nótese la gran diferencia entre sexos.

Con respecto a la latencia del RAS, hemos observado que existe una clara diferencia en ambos géneros: las hembras (ya sean controles o tratadas con DSP-4) presentan una latencia más corta que los machos controles o tratados (Figura 35 B). No existe diferencia estadística entre la condición de ser tratado con el neurotóxico o no, pero sí una clara diferencia debida al sexo ($t = -2,186$; $df = 77$; $p = 0,011$) (Figura 35 B).

Por otro lado, hubo un grado diferente de inhibición en las respuesta de sobresalto en todas las ratas en el día 0 (previo a ningún tratamiento) dependiendo del ISI (desde ~45% a ~60%) (Figura 36 A). Ambos sexos mostraron la máxima inhibición cuando el ISI = 50 ms (Figura 36 A, C y D). Con el paso de las sesiones, todas las ratas presentaron unos mayores niveles de inhibición del reflejo. En el día 14 post-tratamiento, las ratas machos tratadas con DSP-4 mostraron una PPI similar a los valores de los controles para los ISIs más cortos (25, 50 y 100 ms). Sin embargo, cuando el ISI = 150 ms, las ratas machos del grupo de tratamiento con DSP-4 obtuvieron una menor PPI que los controles ($t = -2,148$; $df = 74$; $p = 0,034$) (Figura 36 C). Por el contrario, son las ratas hembra tratadas con DSP-4 las que obtuvieron una mayor PPI que las controles ($t = -2,226$; $df = 82$; $p = 0,029$) en los estímulos de mayor duración de ISI (Figura 36 D). Además, para los ISIs más cortos, la PPI fue mayor en las ratas hembra tratadas con DSP-4 que en las controles (para ISI = 25 ms; $t = -2,324$; $df = 82$; $p = 0,036$); y cuando el ISI = 50 ms ($t = -2,217$; $df = 82$; $p = 0,041$) (Figura 36 D). Como hemos dicho, el efecto de depleción del DSP-4 sobre el sistema noradrenérgico en el día 14 post-tratamiento es el mayor y sorprendentemente es en este punto donde los valores de la PPI en todos los ISIs tienden a homogeneizarse entre sexos, no existiendo las típicas diferencias significativas entre machos y hembras (Figura 36 B).

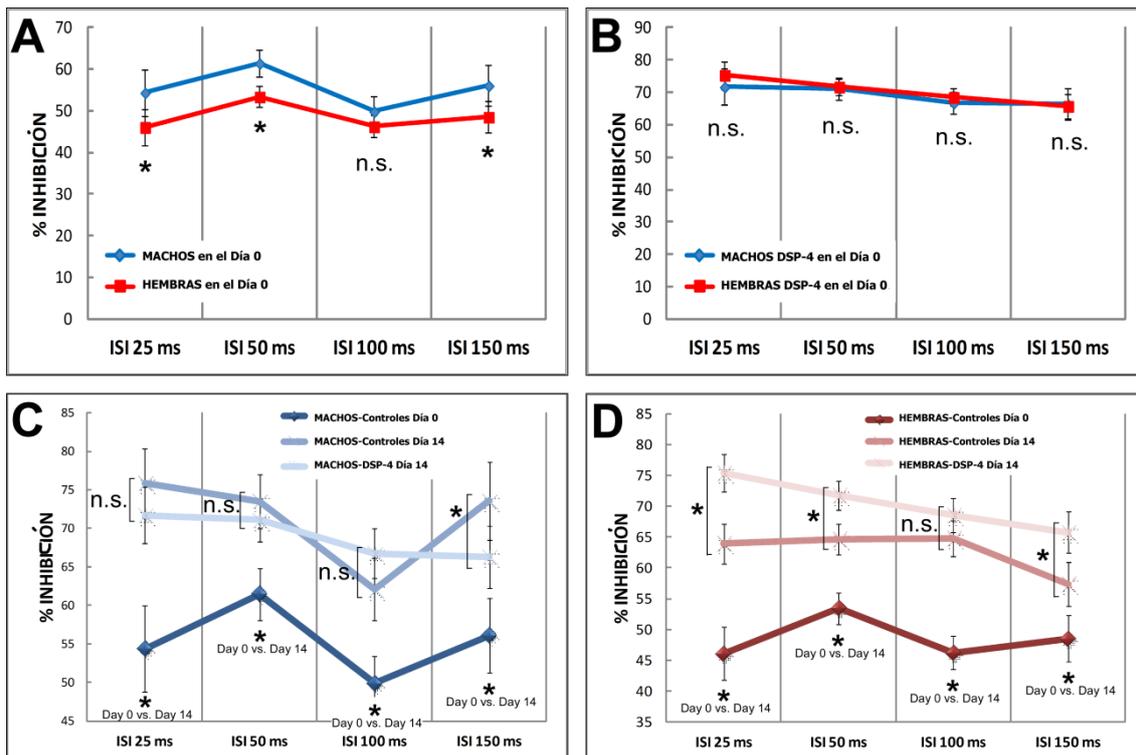


Figura 36. Inhibición por un estímulo previo: valores según el intervalo entre estímulos. A: representación gráfica de la PPI en machos y hembras en el día previo al tratamiento. B: representación gráfica de la PPI en ambos sexos a los 14 días post-inyección de DSP-4. Nótese como han desaparecido las diferencias intersexuales típicas del día 0 (en A). C: representación gráfica de la PPI en machos controles en el día 0, 14 y machos tratados. D: representación gráfica de la PPI en hembras controles en el día 0, 14 y hembras tratadas. Nótese la diferencia en la PPI obtenida del día 14 entre machos y hembras (B, C y D), la inhibición se produce de manera diferente según el sexo.

En relación con la latencia de la PPI, no hubo una diferencia significativa ni entre el sexo (machos vs. hembras), ni entre la condición (controles vs. tratados con DSP-4), ni entre el día de medición (día 0 vs. día 7 vs. día 14) (Figura 37). Las ratas hembras tendieron en general a presentar latencias menores, pero no eran significativas, al igual que en las ratas machos controles en los que las latencias para los ISIs cortos (50 ms) tendieron a aumentar a lo largo de las sesiones (Figura 37).

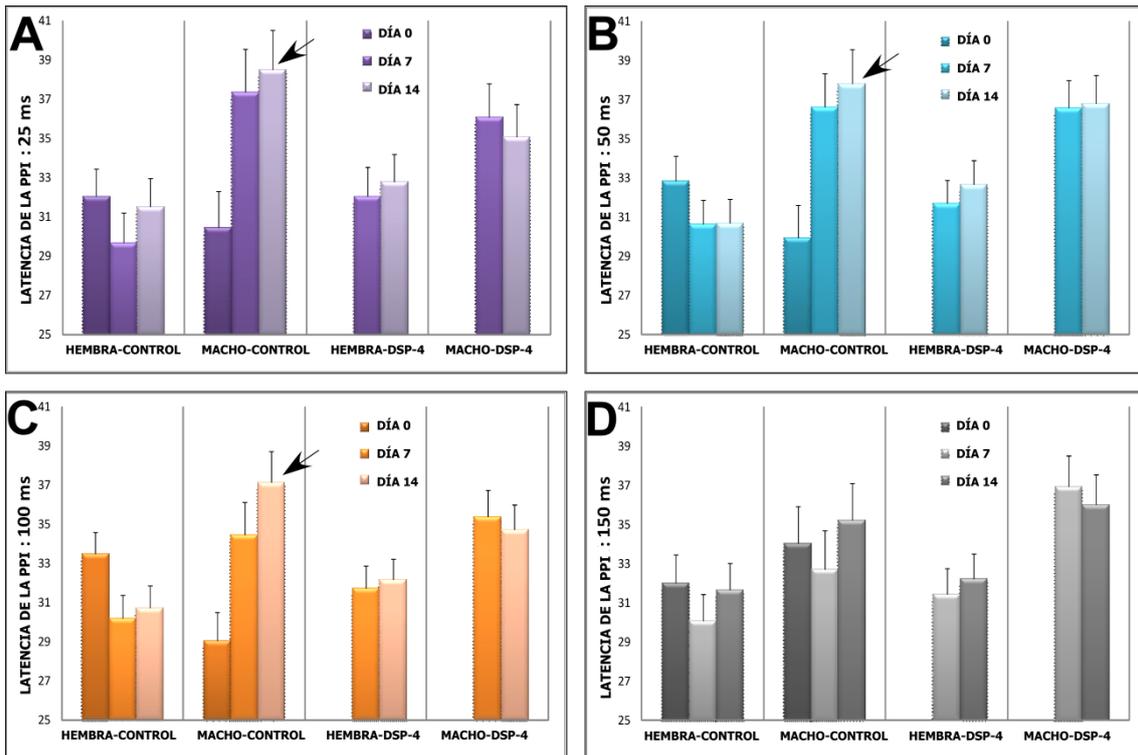


Figura 37. Latencia de los estímulos que desencadenan la inhibición prepulso.

A: representación de la latencia de la PPI cuando el ISI es de 25 ms. B: representación gráfica de la latencia de la PPI cuando el ISI es de 50 ms. C: Representación gráfica de la latencia de la PPI cuando el ISI es de 100 ms. D: representación gráfica la latencia de la PPI cuando el ISI es de 150 ms. Las flechas indican la tendencia al aumento de la latencia en el grupo de machos controles. No existen diferencias significativas entre grupos o días.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo, hemos analizado la estructura anatómica del LC y las diferencias existentes entre el número de células según el sexo, lo que sugiere un dimorfismo sexual en este núcleo. Mediante la inyección de trazadores, hemos demostrado además que el NRC recibe una proyección noradrenérgica desde el LC. Esta proyección se confirma con los resultados de inmunotinción para las diferentes enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de catecolaminas, con la presencia de diferentes receptores noradrenérgicos en la región y por la expresión génica de los diferentes ADRs. La naturaleza neuroquímica de las proyecciones del LC descritas es noradrenérgica, dado que TH y DBH colocalizan con las fibras del LC marcadas con el trazador BDA.

Nuestros hallazgos también describen una proyección directa desde el LC al CI, principalmente ipsilateral, que alcanza la CDCI, la CLCI y la comisura del colículo inferior. En concordancia con estos resultados, estudios previos mostraron que la proyección desde el LC a regiones rostrales, como núcleos somatosensoriales, son también ipsilaterales (Simpson y cols., 1997). Nuestros resultados también mostraron fibras marcadas con TH solamente, o fibras marcadas con TH y DBH a la vez, en el CI, lo que concuerda con el trabajo de Tong y cols., (2005).

En los animales tratados con DSP-4, aunque la inmunorreactividad para la DBH se redujo drásticamente, la inmunorreactividad para la TH no fue totalmente eliminada, lo que indica la presencia de una fuerte inervación dopaminérgica dentro del CI. Estos datos muestran que ambos sistemas catecolaminérgicos (dopaminérgico y noradrenérgico) están presentes en el CI. La fuente de esta inervación dopaminérgica puede venir desde la sustancia negra (Garcia-Munoz cols., 1982; Takada cols., 1987; Kemel cols., 1988; Yasui cols., 1991; Deniau and Chevalier, 1992; Moriizumi cols., 1992; Yasui cols., 1995; Richards cols., 1997).

Los resultados de este trabajo muestran que tanto el RAS como la PPI experimentan cambios dependiendo del sexo y del tratamiento con DSP-4. Las mayores diferencias ocurren a los 14 días post-tratamiento, cuando el DSP-4 promueve la máxima depleción noradrenérgica. Las latencias no experimentaron una gran variación por el DSP-4, ni la latencia del RAS ni las de la PPI.

4.1 Consideraciones técnicas.

4.1.1 Trazadores neuronales.

La utilización de trazadores neuronales es una herramienta de investigación fundamental en este trabajo. Actualmente, existen muchas sustancias con las propiedades necesarias para ser consideradas como trazadores neuronales (Kobbert y cols., 2000). Los trazadores neuronales pueden ser clasificados de muchas formas, por ejemplo, siguiendo criterios funcionales se dividen en dos grandes grupos: trazadores anterógrados y trazadores retrógrados. Los anterógrados son aquellos que después de ser captados por las dendritas y por el cuerpo celular de las neuronas y transportados a los terminales axónicos. Los trazadores retrógrados, por su parte, son aquellos que después de ser captados por los terminales axónicos de las neuronas, son transportados en dirección al soma y a las dendritas.

La elección del FG como trazador retrógrado se debe a las excelentes propiedades de poder rellenar el cuerpo celular y a la estabilidad observada en el trazado de varias vías neuronales (Richmond y cols., 1994; Novikova y cols., 1997; Puigdemívol-Sánchez y cols., 1998; Naumann y cols., 2000; Choi y cols., 2002).

La inyección de FG en la raíz coclear fue realizada utilizando un ángulo positivo (en dirección al movimiento de las agujas del reloj). De esta forma, la micropipeta penetró en el encéfalo en posición caudal al lugar de inyección, a través del cerebelo. Además, el trayecto de la micropipeta pasó caudalmente al seno venoso transversal de la duramadre, evitando su ruptura y disminuyendo la posibilidad de hemorragia durante o después de la cirugía.

Con el empleo del FG, pretendíamos dilucidar dónde y cómo se distribuyen los somas de las neuronas cuyos axones o colaterales axónicos terminan o atraviesan el lugar de inyección. En otras regiones del sistema nervioso, este aspecto es mucho más complejo, pues en el lugar de inyección pueden existir fibras nerviosas de paso con orígenes diversos y parcialmente desconocidos. En nuestro caso, la raíz del nervio coclear es una región relativamente aislada, en la cual solamente existen el NRC y las siguientes fibras de paso:

- Fibras del nervio coclear, que terminan en los núcleos cocleares ipsilaterales (Lorente de Nó, 1926, 1933b, a).

- Fibras olivococleares laterales y mediales (sistema eferente auditivo), que tienen su origen en algunas neuronas de alrededor del núcleo olivar superior lateral (neuronas de la concha), en el propio núcleo olivar superior lateral y en el núcleo ventral del cuerpo trapezoide (White y Warr, 1983; Vetter y Mugnaini, 1992).
- Fibras vestibulares aferentes y eferentes. Las fibras aferentes primarias vestibulares se destinan a los núcleos vestibulares y al cerebelo ipsilateralmente (Strutz, 1982a, b; Strutz y Schmidt, 1982). En roedores, las neuronas eferentes vestibulares se localizan en el puente, lateral y dorsalmente a la rodilla del nervio facial de ambos lados (Strutz, 1982b; White y Warr, 1983).
- Fibras de las neuronas de la raíz coclear, que son extraordinariamente gruesas y se distribuyen fundamentalmente en centros neuronales de integración sensorio-motora del tronco del encéfalo (Merchan y cols., 1988; López y cols., 1999).
- Fibras aferentes a las neuronas de la raíz coclear (como por ejemplo aquellas fibras que provienen del LC), cuyo origen forma parte de nuestro estudio de investigación.

El FG es un trazador autofluorescente que puede ser captado por las neuronas y transportado por medio de flujo axonal retrógrado y acumulado en el pericario (Schmued y Fallon, 1986). Aunque el FG sea un trazador autofluorescente y no necesite de ningún tratamiento para su observación en las secciones del encéfalo, existen anticuerpos comerciales contra el FG que permiten la realización de un protocolo de inmunohistoquímica para su detección. Este proceso adicional se justifica por el aumento de la sensibilidad y de la estabilización de la marcación retrógrada obtenida, además de permitir el estudio del material en el microscopio óptico convencional por tiempo indeterminado (Chang y cols., 1990; Nodal y López, 2003).

Por otro lado, el BDA es un trazador bidireccional, fundamentalmente anterógrado. Fue introducido en los experimentos para trazar las vías neuronales en la década de los 90 (Brandt y Apkarian, 1992; Veenman y cols., 1992) tras la utilización con éxito del dextrano conjugado a rodamina como trazador neuronal anterógrado (Schmued y cols., 1990; Schmued y Heimer, 1990). La elección del BDA para el mapeo de las eferencias del LC se basó en la revisión de los trabajos que habían empleado este trazador con esta finalidad (Lee y cols., 1996; López y cols., 1999; Nodal y Lopez, 2003). Nuestros experimentos confirman la proyección del LC en los NRC

(experimentos de BDA) y la aferencia en los NRC de fibras procedentes del LC (experimentos de FG). Por lo tanto, afirmamos con rotundidad que el LC envía proyecciones a los NRC y por tanto podría estar contribuyendo a la modulación del circuito de sobresalto.

4.1.2 Estimación del número de neuronas del LC.

Aunque este estudio no utiliza un método estereológico en sentido estricto, el método de contar neuronas positivamente marcadas contra DBH además del contaje celular en las tinciones de Nissl con Neurolúcida ha sido verificado como un medio adecuado para establecer una estimación correcta del número de células (Hedreen, 1998). Este mismo acercamiento metodológico ha sido usado en otros estudios (Wrenn y cols., 1996) con el objetivo de contar el número de neuronas del LC tras lesión neurotóxica con DBH-saporina.

4.1.3 Técnicas de Biología Molecular.

Los controles de los métodos científicos son fundamentales para asegurar la exactitud de los resultados obtenidos. Así, en las técnicas de Biología Molecular, que proporcionan gran cantidad de datos de forma automatizada, se exigen controles muy buenos y fiables para las diferentes etapas del protocolo.

La calidad del RNA extraído y purificado se evaluó a través de un bioanalizador que reconoce la integridad de las bandas 18S y 28S del rRNA y también el número de integridad del RNA (RIN), correspondiendo el 0 a un RNA totalmente degradado y el 10 a un RNA completamente intacto. Para todas las PCRs, sólo hemos usado aquellas muestras que presentaran un RIN mayor a 7,5, aunque la gran mayoría se encontraban en torno a 8,0.

Con la misma finalidad de control de la técnica, se obtuvieron los valores del Ct para cada gen. Después de la eliminación de los valores atípicos, los datos brutos de fluorescencia se utilizaron para determinar la eficiencia de la amplificación PCR. Todas las amplificaciones tuvieron un valor de eficiencia de PCR de 1,90-2,10; los valores de eficiencia cercanos a 2,0 indican la mayor eficiencia en la amplificación.

4.1.4 Técnicas inmunohistoquímicas.

En todos nuestros experimentos de inmunohistoquímica, la omisión del anticuerpo primario (control negativo) no originó la tinción de las secciones. Este control certifica que la cascada de anticuerpo secundario, complejo ABC y cromógeno no generaban inmunotinción inespecífica. Los anticuerpos específicos para los ADRs $\alpha 1$, $\alpha 2A$ y $\beta 2$, así como para otros receptores acoplados a proteínas G, distinguen entre ligando unido y receptores no unidos debido a la unión preferentemente hacia el estado de activación de los epítomos amino-terminales sensibles, expuestos a la presencia de agonistas para dichos receptores (Gupta y cols., 2007).

4.2 Organización anatómica del LC.

La organización anatómica del LC como la describimos en este trabajo es consistente con los estudios clásicos puramente descriptivos, en los que se usaron métodos inmunohistoquímicos, citoarquitectónicos y de Golgi para evaluar la organización celular del LC (Swanson, 1976; Shimizu y cols., 1978; Shimizu y cols., 1979). El concepto de “dimorfismo sexual” para el LC no es novedoso, habiendo sido descrito anteriormente (Bangasser y cols., 2011; Pinos y cols., 2001). Las dendritas del LC en ratas hembras se extienden a la región del peri-LC, cubriendo un área significativamente mayor, con mayor densidad dendrítica, poseen mayor número de contactos sinápticos y presentan un patrón de ramificación más complejo (son más largos y con mayor arborización) que en los machos (Bangasser y cols., 2011). Esta mayor extensión y complejidad dendrítica observada en las hembras predice una mayor probabilidad de comunicación con los diversos aferentes que terminan en la región peri-LC (Bangasser y cols., 2011). Con respecto a la ontogenia, se ha descrito un incremento continuo en el número de neuronas en el LC tras el nacimiento, que en los machos paró en P45, y en las hembras no se detuvo hasta P60 (Pinos y cols., 2001). Esos hallazgos apuntaron la existencia de diferentes patrones de desarrollo en machos y hembras que podrían sugerir que las diferencias sexuales pueden estar establecidas por el hecho de presentar un periodo diferente de neurogénesis en ambos sexos en la etapa post-puberal. Nuestro estudio confirma que el LC es una estructura sexualmente dimórfica y añade

que el número de perfiles neuronales del LC también es mayor en las ratas hembras que en las ratas machos.

4.2.1 Inervación noradrenérgica del CI.

La inervación noradrenérgica del CI ha sido estudiada ampliamente (Swanson y Hartman, 1975; Levitt y Moore, 1979; Olazabal y Moore, 1989; Fritschy y Grzanna, 1990); sin embargo, la distribución subnuclear de las inervaciones catecolaminérgicas en el CI no fue caracterizada. Kromer y Moore (1980) describieron que las fibras inmunorreactivas para DBH presentaban un patrón difuso en todas las subdivisiones del CI, mientras que otros autores (Klepper y Herbert, 1991) utilizando técnicas de marcado inmunohistoquímicas para DBH y estudios de trazador retrógrado tras inyecciones en el CI, especificaron que existe claramente una distribución de las fibras noradrenérgicas en el CI en regiones específicas.

Según fue descrito previamente (Klepper y Herbert (1991), la inervación noradrenérgica del CI proviene del LC; son proyecciones bilaterales, con predominancia (2/1) hacia el lado ipsilateral. Sin embargo, el campo de proyección de la inervación del LC hacia el CI no había sido estudiado en detalle. Fritschy y Grzanna (1990) han descrito axones del LC, marcados con lectina *Phaseolus vulgaris* leucoaglutinina en combinación con inmunohistoquímica para DBH, que discurrían bilateralmente dentro de los colículos inferiores distribuyéndose en parche dentro de los núcleos sensoriales. Otros autores encontraron muy pocas fibras marcadas con BDA en el CI tras inyecciones en el LC, con pequeñas diferencias entre los lados ipsi- y contralateral (Mulders y Robertson, 2001). Nuestros experimentos con trazador anterógrado verificaron que la proyección LC-CI es principalmente ipsilateral, analizando además, la distribución topográfica de esta proyección en toda la extensión rostrocaudal del CI y en sus subdivisiones.

El LC es un núcleo con una extensión rostrocaudal considerablemente grande y ha sido descrito como un núcleo con una población neuronal heterogénea, diferenciándose sus proyecciones en consonancia a criterios topográficos: axones que se dirigen al prosencéfalo y axones que se dirigen a la médula espinal (Mason y Fibiger, 1979; Grzanna y Molliver, 1980; Nagai y cols., 1981; Loughlin y cols., 1986). Las

contribuciones de cada tipo neuronal en una red eferente amplia se presentan con mucho detalle en esos estudios, sin embargo no se da una descripción de las proyecciones al CI.

En nuestro estudio, hemos inyectado un trazador anterógrado restringido a diferentes regiones del LC para evitar el esparcimiento hacia los núcleos adyacentes, los cuales también proyectan al CI (como por ejemplo el LDTg) (Simpson y cols., 1997). Debido al pequeño tamaño de las zonas de inyección de BDA, sólo una fracción de todas las neuronas del LC fue marcada en cada caso, dando como resultado un marcaje axonal poco denso. Por ello, para determinar el campo total de inervación del LC en el CI, hemos destruido las neuronas del LC y sus fibras usando una neurotoxina altamente selectiva, el DSP-4, y, a partir de aquí estudiamos la distribución y la densidad de los axones inmunomarcados con TH y DBH en el CI. La administración de DSP-4 induce la degeneración noradrenérgica, afectando exclusivamente a las fibras noradrenérgicas originadas en el LC (Fritschy y Grzanna, 1989; Grzanna y cols., 1989; Fritschy y cols., 1991). Los análisis densitométricos de la TH-ir y la DBH-ir a lo largo de todo el CI en los animales tratados con DSP-4 y en controles, nos proporcionó una información muy valiosa en lo que concierne a la distribución topográfica y a la extensión total de la red eferente del LC en el CI.

Tras el tratamiento con DSP-4, encontramos una pérdida de fibras inmunorreactivas para TH en las cortezas dorsal y lateral del CI y además, una pérdida de casi todas las fibras inmunorreactivas para DBH. Unas pocas fibras DBH-ir no fueron eliminadas y que pueden tener su origen en las pocas neuronas noradrenérgicas que están distribuidas en el CI. Fritschy y Grzanna (1989) constataron la existencia de dos sistemas distintos de fibras noradrenérgicas en el CI: el sistema noradrenérgico que proviene del LC (coerúleo) y el que no proviene del LC (no-coerúleo). Nuestros resultados sugieren que las fuentes de NA que provienen de estructuras diferentes al LC son mucho más escasas ya que la mayor pérdida de fibras corresponde a las que provienen del LC. Por tanto, nuestro estudio verificó que el sistema del LC es la mayor fuente de NA en el CI, e indicó que las fibras están distribuidas indistintamente en las áreas dorsal y lateral del CI y en la comisura intercolicular, principalmente.

4.2.2 Efectos de la pérdida de inervación noradrenérgica provocada por DSP-4.

La administración de DSP-4 en ratas causa una pérdida del patrón de ritmo de micción diurno y un gran incremento en el volumen de vaciado y en la ingesta de agua, todos ellos debidos a cambios en la actividad de la tirosina hidroxilasa (Ranson y cols., 2003).

Varias investigaciones afirmaron que los efectos neurotóxicos del DSP-4 no son uniformes en todas las regiones del tronco del encéfalo, ni tampoco en el prosencéfalo (Fritschy y Grzanna, 1989; Grzanna y cols., 1989; Fritschy y cols., 1991; Szot y cols., 2010). La reducción en los niveles noradrenérgicos y la pérdida de las diferentes subunidades de los ADRs son más pronunciadas en las regiones inervadas por el LC que las que lo son por otras células noradrenérgicas no-coerúleas (Fritschy y Grzanna, 1989). Se ha sugerido una absoluta especificidad del compuesto por los axones del LC (Jonsson y cols., 1981; Jonsson y cols., 1982; Grzanna y cols., 1989), aunque otras regiones también se ven comprometidas a un nivel mucho menor. En base a estos resultados se han establecido dos subsistemas noradrenérgicos diferentes, axones del LC y axones no coerúleos, que difieren no sólo en las áreas de proyección, sino también en las propiedades farmacológicas de los terminales axónicos (Fritschy y Grzanna, 1989).

Esa profunda diferencia de sensibilidad por los axones noradrenérgicos coerúleos del DSP-4 es debida a las diferencias que existen en la morfología y en la topografía de sus proyecciones. Se supone que el tratamiento con DSP-4 no destruye directamente los terminales noradrenérgicos, sino que la supresión podría ser debida al resultado de un daño intraneuronal y la consecuente depleción de noradrenalina dentro de los terminales sinápticos (Booze y cols., 1988). También es interesante remarcar que los marcadores noradrenérgicos quedan alterados transitoriamente y que todos estos cambios ocurren sin una pérdida *per se* de neuronas noradrenérgicas del LC, indicando que el DSP-4 no es una neurotoxina para las neuronas del LC en la rata. El DSP-4 debe ser caracterizado como un compuesto que tiene efectos localizados en las proteínas de los terminales noradrenérgicos de las ratas (Szot y cols., 2010).

Todos los datos previos publicados relacionados con cambios en los marcadores noradrenérgicos en las regiones terminales tras el tratamiento con DSP-4 fueron realizados sin evaluar los cambios concomitantes en los cuerpos celulares de las

neuronas del LC, mientras que nuestro trabajo puede conectar los cambios medidos en la región del tronco del encéfalo con las neuronas noradrenérgicas del LC. Por tanto, este es el primer estudio exhaustivo de los efectos del DSP-4 en el sistema nervioso noradrenérgico en los terminales del tronco del encéfalo principalmente, y en las neuronas del LC de ratas. Nuestros resultados coinciden con trabajos publicados previamente en los que también se usa DSP-4, en los que se observa una pérdida significativa de neuronas noradrenérgicas marcadas y cuya máxima depleción se observa a las dos semanas tras la administración del compuesto (Grzanna y cols., 1989; Fritschy y cols., 1991; Zhang y cols., 1995).

El presente análisis exhaustivo sobre los efectos del DSP-4 en los marcadores noradrenérgicos del cerebro, con la evaluación de las neuronas noradrenérgicas del LC, indica la importancia de la medición de múltiples marcadores noradrenérgicos en varias regiones cerebrales para verificar la selectividad de la lesión, como se muestra en nuestros resultados de HPLC. Otros grupos (Logue y cols., 1985) también han estudiado los efectos del DSP-4 sobre los metabolitos noradrenérgicos del cerebro de la rata y su recaptación en seis regiones cerebrales diferentes: corteza, hipocampo, cerebelo, tronco del encéfalo, hipotálamo y LC. La administración de una dosis de 50 mg/kg disminuyó significativamente los niveles de noradrenalina en todas las regiones observadas. Aparentemente, las mayores reducciones fueron encontradas en la corteza (~86%) y en el hipocampo (~91%). Dosis más bajas no provocaron un decremento en los niveles noradrenérgicos en esas regiones, excepto en el cerebelo. Los niveles del metabolito de NA (MHPG) se redujeron paralelamente a los niveles noradrenérgicos, excepto en el tronco del encéfalo (Logue y cols., 1985). Igualmente, nuestros resultados muestran una reducción de NA y su metabolito en ambos sexos tratados con DSP-4, mientras que se da un incremento en los precursores de NA: DOPA y DA. Hasta cierto punto, los núcleos cuyos aferentes noradrenérgicos han sido eliminados por la acción del DSP-4 intentan poner en marcha las vías de síntesis de catecolaminas para compensar la pérdida de NA.

En nuestros casos no hemos encontrado ni el metabolito de dopamina, HVA, ni el metabolito de noradrenalina, VMA. Esto puede ser debido al protocolo de extracción empleado o a nuestro proceso de detección de metabolitos por espectrometría de masas, aunque tampoco existen evidencias en la literatura de la presencia de HVA ó VMA en las regiones cerebrales estudiadas.

Uno de los datos más sorprendentes extraído de los análisis de HPLC, fue el aumento de NA en la raíz coclear de las hembras tratadas con DSP-4, cuando esperábamos un descenso. Pensamos que debido a la pérdida noradrenérgica coerúlea mayor en hembras que en machos (el número de neuronas en el LC de las hembras es mayor) se podría dar una hipercompensación por parte de otras fuentes noradrenérgicas, como del grupo celular A5. Sabemos que los efectos de los neurotransmisores se pueden alterar cambiando sus concentraciones efectivas o bien el número de receptores. Las concentraciones de neurotransmisores se pueden modificar:

- Cambiando la velocidad de síntesis.
- Alterando la velocidad de liberación en las sinapsis.
- Bloqueando la recaptación (por ejemplo, la cocaína y las anfetaminas la bloquean y provocan la liberación de catecolaminas en la hendidura sináptica).
- Bloqueando la degradación (los inhibidores de la MAO previenen el catabolismo de las catecolaminas, por lo que aumentan las concentraciones de éstas en las sinapsis, e incrementan la acción de los transmisores).

En esa línea argumental, hay trabajos que describen que ciertos inhibidores de la MAO protegen el sistema nervioso de la acción del DSP-4 (Finnegan y cols., 1987; Gibson y cols., 1987; Fornai y cols., 2001; Haberle y cols., 2002).

Los cambios en el número de receptores pueden estar implicados en las adaptaciones a largo plazo de los fármacos administrados, por lo que el DSP-4 podría estar dando lugar a diferentes efectos moduladores dependiendo del sexo. En este punto se abre una línea de investigación interesante que necesitaría de más experimentos para evaluar cuáles son exactamente los mecanismos compensadores cuando se da la depleción noradrenérgica coerúlea por DSP-4.

4.2.3 Papel de los diferentes receptores noradrenérgicos.

Los ADRs participan en el comienzo o el mantenimiento de varios estados patológicos como la hipertensión, la disfunción cardíaca (insuficiencia cardíaca congestiva, isquemia y arritmias), diabetes, glaucoma, depresión e impotencia.

Los subtipos de ADRs α_1 se encuentran en una amplia variedad de tejidos y se ha demostrado que están involucrados en la regulación de la presión sanguínea a través

de cambios en el tono vascular y en el trabajo cardiaco. Los efectos en la contracción uterina, el metabolismo hepático de la glucosa, la proteína heat-shock 70, la expresión de protooncogenes y la mitogénesis han sido relacionados a la activación del ADR α 1. Los diferentes subtipos de ADRs α 1 son receptores post-sinápticos (Cooper y cols., 2003); la NA puede incrementar los niveles de la óxido nítrico sintasa en el sistema nervioso central por la activación del ADR α 1, el cual puede suprimir indirectamente la liberación de la hormona luteinizante, los andrógenos, el estrógeno y la progesterona (Dong y cols., 1999; Vicentic y cols., 2002). Todos estos datos crean una base de conocimientos para la explicación de las diferentes respuestas encontradas en los tests del RAS relacionadas con el dimorfismo sexual.

Contrariamente, los subtipos de ADRs α 2 están localizados como autoceptores pre-sinápticos y receptores post-sinápticos en las dendritas o en los terminales axónicos (Cooper y cols., 2003). Los diferentes subtipos de ADRs α 2 inhiben a la adenilato ciclasa, suprimen a los canales de calcio dependientes de voltaje y activan a los canales de potasio dependientes de ligando. La inhibición de la adenilato ciclasa por los ADRs α 2 se realiza a través de su acoplamiento a los miembros de la superfamilia de proteínas G de las clases $G_{i/o}$. Éstas, son un componente esencial de los circuitos neurales que regulan la fisiología cardiovascular. Además, en el riñón, los ADRs α 2 regulan el intercambio sodio/hidrógeno, aunque su papel aún tiene que ser determinado de forma más precisa (Kreiss y cols., 2004). El ADR α 2A de 450 aminoácidos es el receptor noradrenérgico más expresado en el cerebro, bazo y riñón en humanos, y es un ortólogo del ADR α 2D expresado de forma similar en rata, rat y vaca (Guimaraes y Moura, 2001). La activación del ADR α 2A (a través de la subunidade alfa de las proteínas $G_{i/o}$) inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, incrementa el transporte de potasio, inhibe la conductancia del calcio y estimula a la fosfolipasa A_2 (Brown, 1990; Jones y cols., 1991). Nuestros resultados muestran una sobreexpresión de los subtipos de ADRs α 1 en los machos tratados con DSP-4 comparados con los controles y también una sobreexpresión del subtipo α 2A en las hembras tratadas con DSP-4 comparadas con las controles.

Por otro lado, el ADR β 2 es corto (418 aminoácidos) y se expresa predominantemente en el cerebro, el pulmón y el corazón (Guimaraes y Moura, 2001). El receptor β 2 también puede provocar la acumulación de cGMP y la activación de la proteína cinasa G, a través del acoplamiento a la unidad alfa de $G_{i/o}$ en algunos tipos celulares (Li y cols., 2004). Nuestros resultados mostraron que los mayores cambios en

la expresión génica de los ADRs fueron encontrados en los de tipo β , especialmente el $\beta 1$ (~140 veces más expresado en las hembras tratadas con DSP-4 que en las controles) y en el $\beta 3$ (~10 veces más expresado en los machos tratados que en los controles).

4.2.4 Implicaciones funcionales de la proyección del locus coeruleus a los núcleos del reflejo de sobresalto.

Una de las consideraciones funcionales más interesantes es la participación del LC en el circuito de modulación del RAS (Adams y Geyer, 1981; Von Coelln y cols., 2004) ya que el LC se activa tras estimulación acústica o táctil, como se observa en estudios de inmunotinción para visualizar la proteína Fos (Palmer y Printz, 1998). Además, el papel de las proyecciones noradrenérgicas desde el LC a los núcleos del tronco del encéfalo que participan en el circuito del RAS parece tener una importancia significativa para la inhibición de la respuesta de sobresalto, especialmente cuando el ISI entre el prepulso y el pulso es mayor (150 ms). Los núcleos que participan en el circuito de la PPI en el tronco del encéfalo han sido descritos en diversos trabajos (Fendt y cols., 2001; Li y cols., 2009) Según estos, los prepulsos sonoros que desencadenan la PPI se retransmiten a través del CI. También el colículo superior es importante para la PPI mediada por pre-estímulos auditivos, pero puede ser más importante para la PPI producida por prepulsos táctiles y visuales. En la PPI, la activación colicular es rápidamente transmitida a través del núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg) y en menor medida a través del núcleo tegmental laterodorsal (LDTg) y la sustancia negra, pars reticulada (SNR). La activación transitoria de los núcleos del cerebro medio por los estímulos de la PPI se convierten en inhibición de larga duración por las neuronas gigantes del núcleo reticular caudal del puente (PnC) (Fendt y cols., 2001; Li y cols., 2009). El núcleo ventral del cuerpo trapezoide (VNTB) también participa en el circuito de la PPI, proveyendo inputs inhibitorios al NRC (Gomez-Nieto y cols., 2008).

Además de todas estas estructuras troncoencefálicas, con este estudio estamos demostrando que el LC es también otro núcleo importante en el circuito de la PPI. El LC proporciona inputs noradrenérgicos a los núcleos cocleares (Klepper y Herbert, 1991; Ebert, 1996; Thompson, 2003), al complejo olivar superior (Mulders y Robertson, 2005a), al núcleo de la raíz coclear (Gómez-Nieto y cols., 2008) y al colículo inferior

(Klepper y Herbert, 1991; Hormigo y cols., 2012). Presumiblemente, el LC está jugando un papel importante en la PPI por medio de la modulación noradrenérgica de todos esos núcleos troncoencefálicos. En machos, el LC parece que está inhibiendo la amplitud de la respuesta de sobresalto a través de su conexión con el NRC, como demuestran nuestros resultados, ya que al carecer de inputs noradrenérgicos sobre las neuronas de la raíz, hay un aumento muy significativo del RAS, pero esto mismo no ocurre de la misma manera en las hembras, que mantienen la respuesta. El LC también modula la inhibición de la respuesta de sobresalto por un estímulo previo en el paradigma experimental de ISIs de mayor duración (150 ms), probablemente actuando a través del circuito largo de la PPI, que involucra también al CI. Esto se aprecia especialmente en machos tratados, ya que al perder la inervación noradrenérgica, se produce un incremento en la PPI. Como hemos apuntado, en las hembras el LC al parecer no actúa sobre la amplitud del reflejo de sobresalto, pero sí en la modulación del mismo y, además, de un modo diferente que en los machos: a través de una modulación noradrenérgica directa. La inervación del LC al primer eslabón del circuito de sobresalto provoca que las hembras presenten una menor inhibición de la respuesta de sobresalto durante el paradigma de ISIs cortos (25 y 50 ms), pues cuando se les priva del sistema noradrenérgico coeruleo a través del tratamiento con DSP-4, la PPI ante ISIs cortos es mayor.

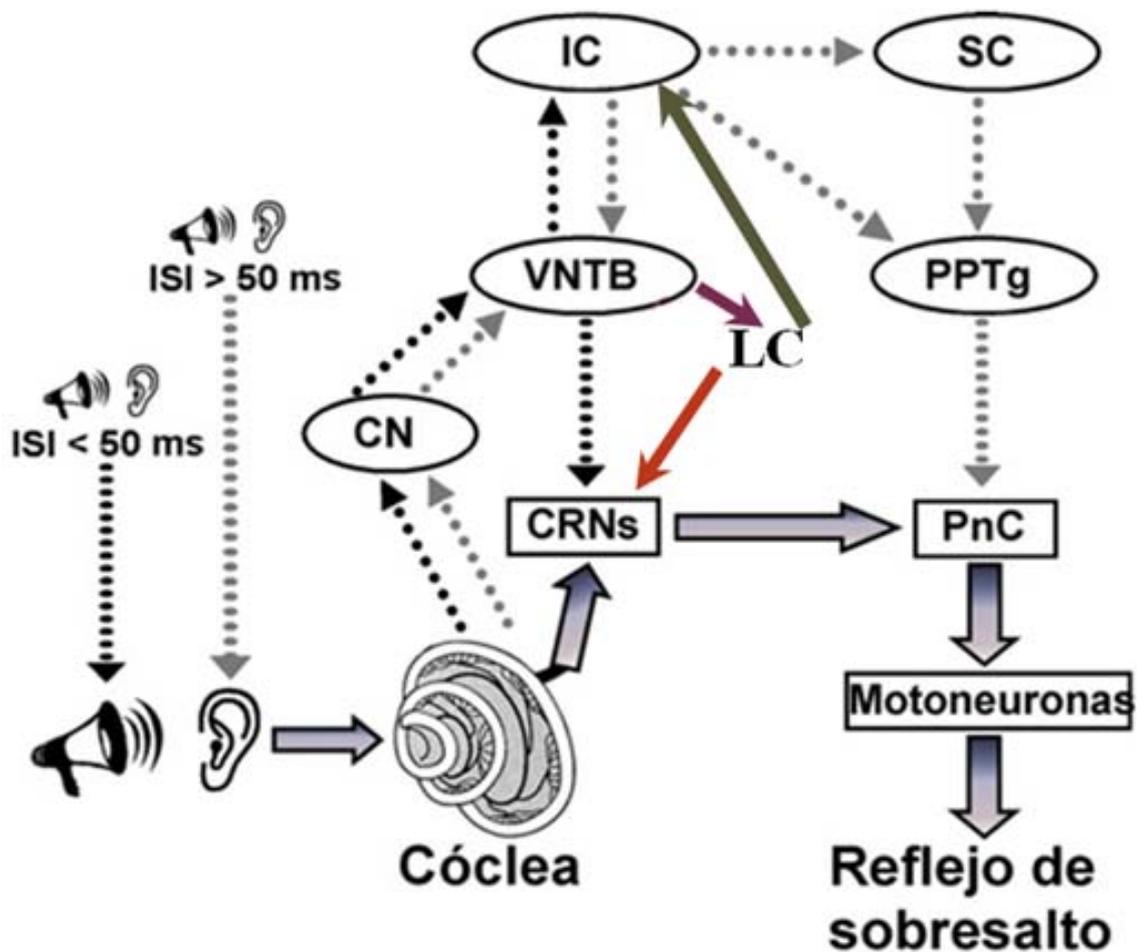


Figura 38. Esquema básico del circuito de la PPI.

Sustrato morfológico de la inhibición del reflejo de sobresalto por un estímulo auditivo a través de dos tipos de circuitos interrelacionados, dependiendo de los ISIs cortos o largos. El LC es una estructura fundamental de modulación de las dos vías: de la corta (flecha roja) a través de los inputs noradrenérgicos sobre las neuronas de la raíz coclear y de la vía larga (flecha verde), a través de la conexión con el CI.

Cómo las conexiones noradrenérgicas modulan el circuito del RAS no está bien definido, pues los efectos dependen del subtipo de receptor en el que actúa la NA (Davis y cols., 1989; Bylund, 1992; Wamsley y cols., 1992; Stevens y cols., 1994; Carasso y cols., 1998; Sallinen y cols., 1998; Kable y cols., 2000). Este estudio proporciona las primeras evidencias en esta línea. Sin embargo, se necesitan más experimentos en animales, como la administración de diferentes agonistas y antagonistas farmacológicos para activar o bloquear los diferentes ADRs, con el objetivo de clarificar el papel específico de cada subtipo de receptor, del LC en general y de la particular modulación noradrenérgica del circuito del RAS y la PPI. Estos experimentos farmacológicos podrían arrojar luz sobre cómo la maquinaria celular interna regula las cascadas bioquímicas implementadas por la activación de los diferentes ADRs durante el test del RAS.

La detección de la novedad está relacionada con el reconocimiento de entradas (inputs) que difieren en algún aspecto de inputs previos. En todas las modalidades sensoriales, una percepción inesperada y novedosa es altamente efectiva para atraer y centrar la atención. El CI y el LC juegan un papel muy importante en la detección de la novedad. El CI constituye un núcleo fundamental y altamente integrador para la información auditiva ascendente o descendente y también para procesos de información multimodal, incluyendo señales visuales (Cooper y Young, 1976; Elverland, 1978; Morest y Oliver, 1984; Faye-Lund y Osen, 1985; Saldana y cols., 1996). Las neuronas del CI responden selectivamente a sonidos novedosos y muestran adaptación específica a estímulos (Perez-Gonzalez y cols., 2005; Malmierca y cols., 2009). De forma similar, las neuronas del LC también integran información multimodal e incrementan su tasa de disparo cuando se presentan estímulos novedosos (Foote y cols., 1980; Grant y cols., 1988). Por tanto, ambos núcleos del tronco del encéfalo (el CI y el LC) son esenciales para provocar una respuesta orientada. Nuestro estudio demuestra la proyección noradrenérgica desde el LC al CI, lo que sugiere una correlación funcional entre estos dos núcleos. De hecho, las principales áreas y patrones de proyección de las fibras del LC dentro del CI son precisamente las mismas del CI donde se localizan las neuronas detectoras de la novedad (neuronas *novelty*).

En comparación con las neuronas del núcleo central del CI, las neuronas de las cortezas dorsal y lateral del CI muestran una fuerte adaptación específica a estímulo, que podría estar contribuyendo al análisis de la escena auditiva, a la detección de la novedad y a la atención selectiva (Perez-Gonzalez y cols., 2005; Malmierca y cols., 2009; Lumani y Zhang, 2010). Curiosamente, nuestros resultados mostraron que la proyección noradrenérgica del LC es hacia a las cortezas dorsal y lateral del CI y, en menor medida, al núcleo central del CI.

Los moduladores como la noradrenalina pueden participar en la adaptación específica a estímulos ya que bloquean los canales de Ca^{2+} y Na^{+} dependientes de corrientes de K^{+} (Foehring y cols., 1989). La adaptación auditiva cortical en ratas despiertas subyace, en parte, en las corrientes de K^{+} (Abolafia y cols., 2011). Este hecho sugiere que la proyección noradrenérgica LC-CI pudiera contribuir a la información que esta población de neuronas coliculares integra para la detección de la novedad.

Como hemos demostrado en el CI, el NRC y el complejo olivar superior también reciben inputs noradrenérgicos desde el LC (Klepper y Herbert, 1991; Ebert, 1996; Mulders y Robertson, 2001; Thompson, 2003). Por tanto, algunos de las estructuras más

importantes en el procesamiento de la información auditiva están influenciados de alguna forma por el neuromodulador noradrenalina.

En el contexto de la regulación del comportamiento por noradrenalina, se sabe que la activación del sistema noradrenérgico del LC incrementa los procesos de atención e influyen los circuitos en los que proyecta el LC relacionados con los estados de excitación, aprendizaje y memoria, alerta y vigilancia (Aston-Jones y cols., 1991; Woodward y cols., 1991; Berridge y Waterhouse, 2003; Lapid y Morilak, 2005). Esto nos lleva a cuestionarnos cómo afecta el sistema noradrenérgico coeruleo a la percepción auditiva y cómo se lleva a cabo el procesamiento auditivo ante diferentes circunstancias comportamentales. En la detección de señales auditivas, un estudio reciente muestra que la estimulación del ADR α 2 es muy efectiva para la precisión y la latencia de respuesta en animales no estresados (Brown y cols., 2012). Este hecho sugiere que la noradrenalina no sólo induce el estado de excitación para iniciar el proceso de atención, sino que también está sugiriendo un papel más específico en la discriminación de señales auditivas con respecto a la ausencia de señales (Brown y cols., 2012). Dado que la corteza del CI es particularmente rica en la presencia de ADRs α 2 (Probst y cols., 1984), es esencial conocer las zonas de proyección noradrenérgica del LC dentro del CI. Nuestro estudio indica que el sistema noradrenérgico coeruleo inerva principalmente hacia las porciones dorsal y lateral del CI y demuestra que estas proyecciones están significativamente dañadas tras la administración de DSP-4. Estos resultados pueden contribuir al diseño de nuevos experimentos centrados en el papel de los ADRs del CI.

Como hemos demostrado, el LC proyecta al NRC, otro núcleo troncoencefálico que también procesa estímulos acústicos inesperados y media en la alerta auditiva y el comportamiento de escape, (Lee y cols., 1996; López y cols., 1999; Gómez-Nieto y cols., 2008). El NRC proyecta a su vez hacia las neuronas del núcleo motor del facial, el cual promueve los movimientos de la oreja en roedores hacia la fuente de un sonido grande e inesperado (Horta-Junior y cols., 2008) y también recibe inputs desde el CI a través de una vía auditiva descendente corta que termina en el núcleo ventral del cuerpo trapezoide (Gomez-Nieto y cols., 2008). Ya que el CI juega un papel en la inhibición binaural y es crítico para la modulación del RAS por estímulos auditivos (Fendt y cols., 2001), resulta fundamental el estudio de las conexiones entre el CI, el LC y el NRC.

Uno de los mayores objetivos de este estudio fue re-examinar las proyecciones del LC al CI en ratas controles y tratadas con DSP-4. Nuestros resultados demuestran que la proyección noradrenérgica desde el LC al CI fue drásticamente dañada tras la administración de DSP-4. Esto implica que el DSP-4 debe ser utilizado como una herramienta muy importante para estudiar los roles funcionales de las proyecciones del LC hacia los núcleos troncoencefálicos, como el CI o el NRC, los cuales están relacionados con la detección de la novedad, la orientación de la respuesta y los comportamientos de alerta.

Por otro lado, varios tipos de estimulación del LC, con electricidad por ejemplo, puede incrementar la actividad de descarga neuronal espontánea y evocada por tono en los núcleos cocleares, equivalente a una inyección iontoforética de NA (Ebert, 1996). Podemos especular que este efecto puede ayudar a la mejora de la sensibilidad al procesamiento acústico o a la reducción del umbral para reflejos acústicos de baja latencia, como el RAS.

Por añadidura, la NA se supone que también está involucrada en la plasticidad de los núcleos cocleares (Mavridis y cols., 1991; Marien y cols., 2004), la cual está asentada en el ambiente y también en experiencias previas. Algunos investigadores han mostrado que la actividad de los núcleos cocleares se modifica por el condicionamiento (Harvey y cols., 1988; Woody y cols., 1992) y por las condiciones comportamentales (May y cols., 1998). De acuerdo con esto, los núcleos cocleares pueden ser por tanto modulados por el sistema noradrenérgico, y además, la salida neural coclear puede ser también modulada por neuronas noradrenérgicas (Mulders y Robertson, 2005b).

Eventualmente, podemos concluir que el LC juega un papel muy importante en el circuito de la PPI a través de la estimulación de los diferentes ADRs en varios núcleos fundamentales del circuito de modulación del reflejo acústico. Este papel del LC es también significativamente distinto dependiendo del sexo y esto podría explicar las divergencias encontradas por género en los tests del RAS, como un reflejo de los mecanismos de la capacidad sensoriomotora.

CONCLUSIONES.

PRIMERA

Hay una proyección eferente noradrenérgica del locus coeruleus hacia el núcleo de la raíz coclear. La proyección es bilateral, aunque hay una fuerte preponderancia ipsilateral.

SEGUNDA

Existe una proyección noradrenérgica directa desde el locus coeruleus al colículo inferior, en su mayor parte ipsilateral, distribuyéndose las fibras coeruleas en las cortezas coliculares dorsal y lateral.

TERCERA

Existe un dimorfismo sexual anatómico en el locus coeruleus, presentando las hembras un mayor número de neuronas que los machos. Este hecho influye en la presencia de receptores noradrenérgicos en los núcleos que inerva, como la raíz del nervio coclear, en la que la población de receptores noradrenérgicos difiere dependiendo del sexo.

CUARTA

La administración intraperitoneal de la neurotoxina DSP-4 provoca una depleción casi completa de las fibras noradrenérgicas en la región de la raíz coclear y en el colículo inferior.

QUINTA

La eliminación selectiva de las proyecciones del locus coeruleus proporciona una herramienta eficaz para el estudio funcional de este núcleo.

SEXTA

El tratamiento con DSP-4 modifica el patrón de expresión génica de los receptores noradrenérgicos en la raíz coclear; en los machos tratados, se incrementa la expresión de todos los subtipos de receptores noradrenérgicos, mientras que en las hembras tratadas la expresión es variable.

SÉPTIMA

El tratamiento con DSP-4 en ambos sexos provoca una reducción de noradrenalina y su metabolito 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol en la mayoría de las regiones cerebrales, mientras que incrementa la presencia de sus precursores, dopamina y dihidroxifenilalanina.

OCTAVA

La depleción del sistema noradrenérgico coeruleo provoca la desaparición de las diferencias en los valores de la inhibición prepulso del reflejo auditivo de sobresalto que existían entre machos y hembras, haciendo desaparecer el dimorfismo sexual funcional en la PPI.

NOVENA

El locus coeruleus es una estructura fundamental en el circuito subyacente a la inhibición del reflejo auditivo de sobresalto por un estímulo previo, a través de los inputs noradrenérgicos sobre las neuronas de la raíz coclear y a través de su conexión con el colículo inferior.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abolafia JM, Vergara R, Arnold MM, Reig R, Sanchez-Vives MV (2011) Cortical auditory adaptation in the awake rat and the role of potassium currents. *Cereb. Cortex* 21(5):977-990.
- Adams LM, Geyer MA (1981) Effects of 6-hydroxydopamine lesions of locus coeruleus on startle in rats. *Psychopharmacology* 73(4):394-398.
- Asakura M, Nagashima H, Fujii S, Sasuga Y, Misonoh A, Hasegawa H, Osada K (2000) Influences of chronic stress on central nervous systems. *Japanese Journal of Psychopharmacology* 20(3):97-105.
- Aston Jones G and Bloom FE. (1991) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in sleep-waking cycle. *J. Neurosci.* 1:876-886.
- Aston Jones G, Chaing C and Alexinsky T. (1991) Discharge of noradrenergic locus coeruleus neurons in behaving rats and monkeys suggests a role in vigilance. *Progress in Brain Research* 88:501-520.
- Aston Jones G, Foote SL and Bloom FE. (1982) Low doses of ethanol disrupt sensory responses of brain NA neurons. *Nature* 296: 857-860.
- Aston-Jones G, George P (2004) Chapter 11 - Locus Coeruleus, A5 and A7 Noradrenergic Cell Groups. In: *The Rat Nervous System (Third Edition)*, pp 259-294. Burlington: Academic Press.
- Aston-Jones G., Rajkowski J., Cohen J.(1999). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol. Psychiatry* 46:1309–1320.
- Aston-Jones G, Shipley MT, Chouvet G, Ennis M, van Bockstaele E, Pieribone V, Shiekhattar R, Akaoka H, Drolet G, Astier B (1991) Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog. Brain Res.* 88:47-75.
- Bakker MJ, van Dijk JG, van den Maagdenberg AM, Tijssen MA (2006) Startle syndromes. *Lancet Neurol.* 5(6):513-524.
- Bangasser DA, Zhang X, Garachh V, Hanhauser E, Valentino RJ (2011) Sexual dimorphism in locus coeruleus dendritic morphology: a structural basis for sex differences in emotional arousal. *Physiol. Behav.* 103(3-4):342-351.
- Baudrie V, Tulen JH, Blanc J, Elghozi JL (1997) Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J. Auton. Pharmacol.* 17:303-309.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res* 42(1):33-84.
- Booze RM, Hall JA, Cress NM, Miller GD, Davis JN (1988) DSP-4 treatment produces abnormal tyrosine hydroxylase immunoreactive fibers in rat hippocampus. *Experimental Neurology* 101:75-86.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Cansen Steur EN, Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 24:197-211.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L (1978) Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 15:339-343.
- Brandt HM, Apkarian AV (1992) Biotin-dextran: a sensitive anterograde tracer for neuroanatomic studies in rat and monkey. *J. Neurosci. Methods* 45(1-2):35-40.
- Brown AM (1990) Regulation of heartbeat by G protein-coupled ion channels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 259:H1621-H1628.
- Brown DC 2nd, Co MS, Wolff RC, Atzori M (2012) alpha-Adrenergic receptors in auditory cue detection: alpha2 receptor blockade suppresses false alarm responding in the rat. *Neuropharmacology* 62(7):2178-2183.

- Buu NT (1985) Relationship between catechol-O-methyltransferase and phenolsulfotransferase in the metabolism of dopamine in the rat brain. *J. Neurochem* 45(5):1612-1619.
- Bylund DB. (1992) Subtypes of alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors. *European Neuropsychopharmacology* 2:229-230.
- Carasso BS, Bakshi VP, Geyer MA (1998) Disruption in prepulse inhibition after alpha-1 adrenoceptor stimulation in rats. *Neuropharmacology* 37:401-404.
- Cooper FEB, R.H. Roth (1997), *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* J.R. Cooper, F.E. Bloom, R.H. Roth, Editors, 7th ed. Oxford University Press, New York. *Journal of Epilepsy* 10:94.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (2003) *The biochemical basis of neuropharmacology*. (6nd ed.). Oxford, England: Oxford U. Press.
- Cooper MH, Young PA (1976) Cortical projections to the inferior colliculus of the cat. *Exp. Neurol.* 1976 May;51(2):488-502.
- Cornwell-Jones CA, Palfai T, Krasenbaum D, Byer Jr E, Clark R, Kinnard K (1992) Housing influences exploration and social interaction of control and DSP-4-treated rats. *Physiology & Behavior* 52:271-276.
- Couto LB, Moroni CR, Ferreira CMR, Elias-Filho DH, Parada CA, Pelao IR, Coimbra NC (2006) Descriptive and functional neuroanatomy of locus coeruleus-noradrenaline-containing neurons involvement in bradykinin-induced antinociception on principal sensory trigeminal nucleus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 32:28-45.
- Chang HT, Kuo H, Whittaker JA, Cooper NG (1990) Light and electron microscopic analysis of projection neurons retrogradely labeled with Fluoro-Gold: notes on the application of antibodies to Fluoro-Gold. *J. Neurosci. Methods* 35(1):31-7.
- Choi D, Li D, Raisman G (2002) Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: a comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald, Fluoro-Gold and Dil. *J. Neurosci. Methods* 117(2):167-72.
- Davis M, Gendelman PM. (1977). Plasticity of the acoustic startle response in the acutely decerebrate rat. *J Comp Physiol Psychol*; 91(3):549-63.
- Davis M, Gendelman DS, Tischler MD, Gendelman PM (1982) A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J. Neurosci.* 2:791-805.
- Davis M, Commissaris RL, Yang S, Wagner KR, Kehne JH, Cassella JV, Boulis NM (1989) Spinal vs. supraspinal sites of action of the α 2-adrenergic agonists clonidine and ST-91 on the acoustic startle reflex. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 33:233-240.
- Delini-Stula A, Mogilnicka E, Hunn C, Dooley DJ (1984) Novelty-oriented behavior in the rat after selective damage of locus coeruleus projections by DSP-4, a new noradrenergic neurotoxin. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 20:613-618.
- Deniau JM, Chevalier G (1992) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: Distribution of projection neurons. *Neuroscience* 46:361-377.
- Dong L-W, Yang J, Tong L-J, Tang C, Liu M-S (1999) Transcriptional regulation of α 1-adrenoceptor gene in the rat liver during different phases of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1453:207-215.
- Ebert U (1996) Noradrenalin enhances the activity of cochlear nucleus neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 8(6):1306-14.
- Elverland HH (1978) Ascending and intrinsic projections of the superior olivary complex in the cat. *Exp Brain Res* 32(1):117-34.
- Faye-Lund H, Osen KK (1985) Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol* 171(1):1-20.
- Fendt M, Li L, Yeomans JS (2001) Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology* 156:216-224.

- Finnegan KT, Skratt JJ, Irwin I, DeLanney LE, Langston JW (1990). Protection against DSP-4-induced neurotoxicity by deprenyl is not related to its inhibition of MAO B. *Eur J Pharmacol.* 1990 Aug 2;184(1):119-26.
- Foehring RC, Schwindt PC, Crill WE (1989) Norepinephrine selectively reduces slow Ca²⁺- and Na⁺-mediated K⁺ currents in cat neocortical neurons. *J Neurophysiol* 61(2):245-56.
- Foote SL, Aston-Jones G, Bloom FE (1980) Impulse activity of locus coeruleus neurons in awake rats and monkeys is a function of sensory stimulation and arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(5):3033-7.
- Fornai F, Giorgi FS, Gesi M, Chen K, Alessrì MG, Shih JC (2001). Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-4 and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse.* 39(3):213-21.
- Freitas RL, Ferreira CM, Ribeiro SJ, Carvalho AD, Elias-Filho DH, Garcia-Cairasco N, Coimbra NC (2005) Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. *Exp Neurol* 191(2):225-42.
- Fritschy JM, Grzanna R (1989) Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience* 30:181-197.
- Fritschy JM, Grzanna R (1990) Distribution of locus coeruleus axons within the rat brainstem demonstrated by Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tracing in combination with dopamine-beta-hydroxylase immunofluorescence. *J. Comp. Neurol* 293(4):616-31.
- Fritschy JM, Grzanna R, Pompeiano CDBO (1991) Chapter 20 Selective effects of DSP-4 on locus coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axons in the central nervous system? In: *Progress in Brain Research*: 257-268
- Garcia-Munoz M, Patino P, Aguilar R, Arbuthnott G (1982) Participation of projections from substantia nigra reticulata to the lower brain stem in turning behavior. *Experimental Neurology* 78:380-390.
- Geyer MA (2006) Are cross-species measures of sensorimotor gating useful for the discovery of procognitive cotreatments for schizophrenia? *Dialogues Clin. Neurosci.* 8:9-16.
- Gibson CJ (1997). Inhibition of MAO B, but not MAO A, blocks DSP-4 toxicity on central NE neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 141(1):135-8.
- Gold MS. (1993) Opiate addiction and the LC. *Recent advances in addictive disorders.* 17:61-73.
- Gomez-Nieto R, Rubio ME, López DE (2008) Cholinergic input from the ventral nucleus of the trapezoid body to cochlear root neurons in rats. *J. Comp. Neurol.* 506(3):452-68.
- Gómez-Nieto R, Horta-Junior JAC, Castellano O, Herrero-Turrión MJ, Rubio ME, López DE (2008) Neurochemistry of the afferents to the rat cochlear root nucleus: Possible synaptic modulation of the acoustic startle. *Neuroscience* 154:51-64.
- Gómez-Nieto R, Horta-Junior JAC, Castellano O, Sinex DG, López García DE (2010) Auditory prepulse inhibition of neuronal activity in the rat cochlear root nucleus. In: *The Neurophysiological bases of auditory perception.* Ed. Lopez-Poveda, Enrique A.; Palmer, Alan R.; Meddis, Ray. Springer, New York. ISBN 978-1-4419-5685-9.
- Grant SJ, Aston-Jones G, Redmond DE Jr. (1988) Responses of primate locus coeruleus neurons to simple and complex sensory stimuli. *Brain Res Bull* 21(3):401-10.
- Grzanna R, Molliver ME (1980) The locus coeruleus in the rat: an immunohistochemical delineation. *Neuroscience* 5(1):21-40.
- Grzanna R, Berger U, Fritschy JM, Geffard M (1989) Acute Action of DSP-4 on Central Norepinephrine Axons: Biochemical and Immunohistochemical Evidence for Differential Effects. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37:1435-1442.
- Guimaraes S, Moura D (2001) Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacological Reviews* 53:319-356.

- Gupta A, D'caillot FM, Gomes I, Tkalych O, Heimann AS, Ferro ES, Devi LA (2007) Conformation State-sensitive Antibodies to G-protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 282:5116-5124.
- Guyenet PG (1980) The coeruleospinal noradrenergic neurons: anatomical and electrophysiological studies in the rat. *Brain Res* 189:121-133.
- Haberle D, Magyar K, Szöke E (2002). Determination of the norepinephrine level by high-performance liquid chromatography to assess the protective effect of MAO-B inhibitors against DSP-4 toxicity. *J Chromatogr Sci.* 40(9):495-9.
- Hancock MB (1982) DAB-Nikel Substrate for the differential immunoperoxidase staining of nerve fibers and fiber terminals. *J Histochem Cytochem* 30:578.
- Hansson E (1984) Enzyme activities of monoamine oxidase, catechol-O-methyltransferase and gamma-aminobutyric acid transaminase in primary astroglial cultures and adult rat brain from different brain regions. *Neurochem Res* 9(1):45-57.
- Harro J, Orelund L, Vasar E, Bradwejn J (1995) Impaired exploratory behaviour after DSP-4 treatment in rats: implications for the increased anxiety after noradrenergic denervation. *European Neuropsychopharmacology* 5:447-455.
- Harvey JA, Winsky L, Schindler CW, McMaster SE, Welsh JP (1988) Asymmetric uptake of 2-deoxy-D-[14C]glucose in the dorsal cochlear nucleus during Pavlovian conditioning in the rabbit. *Brain Res* 449(1-2):213-24.
- Hedreen JC (1998) What was wrong with the Abercrombie and empirical cell counting methods? A review. *Anat Rec* 250:373-380.
- Hormigo S, Horta Junior J de A, Gómez-Nieto R, López García DE (2012) The selective neurotoxin DSP-4 impairs the noradrenergic projections from the locus coeruleus to the inferior colliculus in rats. *Frontiers in Neural Circuits* 41:6.
- Horta-Junior J de A, López DE, Alvarez-Morujó AJ, Bittencourt JC (2008) Direct and indirect connections between cochlear root neurons and facial motor neurons: pathways underlying the acoustic pinna reflex in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 2008 Apr 10;507(5):1763-79.
- Hsu LL (1984) Brain irradiation: effects on regional MAO and COMT activity in the brain of the squirrel monkey and on the incorporation of [14C]tyrosine into catecholamines. *J Toxicol Environ Health* 14(5-6):749-58.
- Hsu SM, Soban E (1982) Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 30:1079-1082.
- Hu CY, Robinson CP (1988) The effects of soman on norepinephrine uptake, release, and metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*; 96(2):185-90.
- Huotari M, Gogos JA, Karayiorgou M, Koponen O, Forsberg M, Raasmaja A, Hyttinen J, Mannisto PT (2002) Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* 15(2):246-56.
- Jennings R (1999) *The Attentive Brain*, Cambridge, R. Parasuraman (Ed.), Massachusetts: The MIT Press, 1998. (ISBN 0-262-16172-9). *Acta Psychologica* 102:97-99.
- Jones SB, Halenda SP, Bylund DB (1991) Alpha 2-adrenergic receptor stimulation of phospholipase A2 and of adenylate cyclase in transfected Chinese hamster ovary cells is mediated by different mechanisms. *Molecular Pharmacology* 39:239-245.
- Jonsson G, Sachs C (1976) Regional changes in [3H]-noradrenaline uptake, catecholamines and catecholamine synthetic and catabolic enzymes in rat brain following neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Med Biol*; 54(4):286-97.
- Jonsson G, Hallman H, Sundström E (1982) Effects of the noradrenaline neurotoxin DSP4 on the postnatal development of central noradrenaline neurons in the rat. *Neuroscience* 7:2895-2907.

- Jonsson G, Hallman H, Ponzio F, Ross S (1981) DSP4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine)--A useful denervation tool for central and peripheral noradrenaline neurons. *European Journal of Pharmacology* 72:173-188.
- Kable JW, Murrin LC, Bylund DB (2000) In vivo gene modification elucidates subtype-specific functions of alpha(2)-adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*; 293(1):1-7.
- Keay KA, Redgrave P, Dean P (1988) Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res Bull* 20:13-26.
- Kemel ML, Desban M, Gauchy C, Glowinski J, Besson MJ (1988) Topographical organization of efferent projections from the cat substantia nigra pars reticulata. *Brain Research* 455:307-323.
- Kim MA, Lee HS, Lee BY, Waterhouse BD (2004) Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Res*; 1026(1):56-67.
- Klepper A, Herbert H (1991) Distribution and origin of noradrenergic and serotonergic fibers in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. *Brain Res* 557:190-201.
- Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol*; 62(4):327-51.
- Koch M, Lingenhöhl K, Pilz PK (1992) Loss of the acoustic startle response following neurotoxic lesions of the caudal pontine reticular formation: possible role of giant neurons. *Neuroscience* 49:617-625.
- Koeppen AH (2000) *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*; edited by G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, and M.D. Uhler, sixth edition, Lipincott-Raven, Philadelphia. *Journal of the Neurological Sciences* 174:49-50.
- Kreiss C, Toegel S, Bauer AJ (2004) α 2-Adrenergic regulation of NO production alters postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 287:G658-G666.
- Kromer LF, Moore RY (1980) A study of the organization of the locus coeruleus projections to the lateral geniculate nuclei in the albino rat. *Neuroscience* 5(2):255-71.
- Kumari V, Soni W, Mathew VM, Sharma T (2000) Prepulse inhibition of the startle response in men with schizophrenia: effects of age of onset of illness, symptoms, and medication. *Arch Gen Psychiatry*; 57(6):609-14.
- Landis C, Hunt WA (1939) *The startle pattern*. New York: Ferrar & Rinehart.
- Lapiz MD, Morilak DA (2005) Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience* 137(3):1039-49.
- Lee Y, López DE, Meloni EG, Davis M (1996a) A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.* 16:3775-3789.
- Levitt P, Moore RY (1979) Origin and organization of brainstem catecholamine innervation in the rat. *J Comp Neurol*; 186(4):505-28.
- Li L, Frost BJ (2000). Azimuthal directional sensitivity of prepulse inhibition of the pinna startle reflex in decerebrate rats. *Brain Res Bull.*; 51(1):95-100.
- Li F, De Godoy Mr, Rattan S (2004) Role of Adenylate and Guanylate Cyclases in α 1-, α 2-, and β 3-Adrenoceptor-Mediated Relaxation of Internal Anal Sphincter Smooth Muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308:1111-1120.
- Li L, Du Y, Li N, Wu X, Wu Y (2009) Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33(8):1157-67.
- Lingenhöhl K, Friauf E (1994) Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J. Neurosci.* 14:1176-1194.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402-408.

- Logue MP, Growdon JH, Coviella ILG, Wurtman RJ (1985) Differential effects of DSP-4 administration on regional brain norepinephrine turnover in rats. *Life Sciences* 37:403-409.
- López DE, Merchán MA, Bajo VM, Saldana E (1993) The cochlear root neurons in the rat, mouse and gerbil. In: *The mammalian cochlear nuclei: organization and function* (Merchán MA, ed), pp 291-301. New York: Plenum Press.
- López DE, Saldana E, Nodal FR, Merchán MA, Warr WB (1999) Projections of cochlear root neurons, sentinels of the rat auditory pathway. *J. Comp. Neurol.* 415:160-174.
- Lorente de Nó R (1926) Études sur l'anatomie et la physiologie du labyrinthe de l'oreille et du VIII nerf. Deuxième partie: quelques données au sujet de l'anatomie des organes sensoriels du labyrinthe. *Travaux Lab Rech Biol Univ Madrid* 24:53-153.:53-153.
- Lorente de Nó R (1933a) Anatomy of the eighth nerve. The central projection of the nerve endings of the internal ear. *Laryngoscope* 43:1-38.
- Lorente de Nó R (1933b) Anatomy of the eighth nerve III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope* 43:27-350.
- Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R (1986) Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* 18(2):307-19.
- Lumani A, Zhang H (2010) Responses of neurons in the rat's dorsal cortex of the inferior colliculus to monaural tone bursts. *Brain Res.* 1351:115-29.
- Ma S, Mifflin SW, Cunningham JT, Morilak DA (2008) Chronic intermittent hypoxia sensitizes acute hypothalamic-pituitary adrenal stress reactivity and Fos induction in the rat locus coeruleus in response to subsequent immobilization stress. *Neuroscience* 154:1639-1647.
- Malmierca MS, Cristaudo S, Perez-Gonzalez D, Covey E (2009) Stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the anesthetized rat. *J. Neurosci.* 29(17):5483-93.
- Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC (2004) Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Research Reviews* 45:38-78.
- Martinez DL, Geyer MA (1997) Characterization of the disruptions of prepulse inhibition and habituation of startle induced by [alpha]-ethyltryptamine. *Neuropsychopharmacology* 16:246-255.
- Mason ST, Fibiger HC (1979) Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 187(4):703-24.
- Mavridis M, Degryse AD, Lategan AJ, Marien MR, Colpaert FC (1991) Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in monkeys: A possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson's disease. *Neuroscience* 41:507-523.
- May BJ, Prell GS, Sachs MB (1998) Vowel representations in the ventral cochlear nucleus of the cat: effects of level, background noise, and behavioral state. *J. Neurophysiol.* 79(4):1755-67.
- Merchan MA, Collia F, López DE, Saldana E (1988) Morphology of cochlear root neurons in the rat. *J. Neurocytol.* 17:711-725.
- Miao-Kun S (1995) Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Progress in Neurobiology* 47:157-233.
- Mishra P, Burger R, Bettendorf A, Browning R and Jose B. (1994) Role of NE in forebrain and brainstem seizures: Chemical lesioning of LC with DSP4. *Exp. Neurol.* 125: 58-64.
- Morest DK, Oliver DL (1984) The neuronal architecture of the inferior colliculus in the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J. Comp. Neurol.* 222(2):209-36.

- Moriizumi T, Leduc-Cross B, Wu JY, Hattori T (1992) Separate neuronal populations of the rat substantia nigra pars lateralis with distinct projection sites and transmitter phenotypes. *Neuroscience* 46:711-720.
- Mulders WH, Robertson D (2001) Origin of the noradrenergic innervation of the superior olivary complex in the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 21(4):313-22.
- Mulders WHAM, Robertson D (2005a) Catecholaminergic innervation of guinea pig superior olivary complex. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 30:230-242.
- Mulders WHAM, Robertson D (2005b) Noradrenergic modulation of brainstem nuclei alters cochlear neural output. *Hearing Research* 204:147-155.
- Nagai T, Satoh K, Imamoto K, Maeda T (1981) Divergent projections of catecholamine neurons of the locus coeruleus as revealed by fluorescent retrograde double labeling technique. *Neurosci. Lett.* 23(2):117-23.
- Naumann T, Hartig W, Frotscher M (2000) Retrograde tracing with Fluoro-Gold: different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies. *J. Neurosci. Methods* 103(1):11-21.
- Nodal FR (1999) El sustrato anatómico de los reflejos auditivos en la rata. In: Departamento de Biología Celular y Patología, Facultad de Medicina, p 181. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Nodal FR, López DE (2003) Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. *J. Comp. Neurol.* 460:80-93.
- Novikova L, Novikov L, Kellerth JO (1997) Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers: a comparison between Fast Blue, Fluoro-Gold and various dextran conjugates. *J. Neurosci. Methods* 74(1):9-15.
- Olazabal UE, Moore JK (1989) Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohistochemical studies in rats, cats, and bats. *J. Comp. Neurol.* 282(1):98-118.
- Olpe HR, Laszlo J, Dooley DJ, Heid J, Steinmann MW (1983) Decreased activity of locus coeruleus neurons in the rat after DSP-4 treatment. *Neuroscience Letters* 40:81-84.
- Osborne N (1994) Basic neurochemistry: Edited by G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R. W. Albers and P. B. Molinoff. Fifth Edition. ISBN 0-7817-0104X. Published by Raven Press, New York, U.S.A. 1994. *Neurochemistry International* 25:201.
- Page ME, Akaoka H, Aston-Jones G, Valentino RJ (1992) Bladder distention activates noradrenergic locus coeruleus neurons by an excitatory amino acid mechanism. *Neuroscience* 51:555-563.
- Palmer AA, Printz MP (1998) Attenuation of Fos expression to airpuff startle stimuli following tympanic membrane rupture. *Brain Res.* 787(1):91-98.
- Paxinos G, Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: the new coronal set - 161 diagrams*, 5th Edition. San Diego: Academic Press.
- Perez-Gonzalez D, Malmierca MS, Covey E (2005) Novelty detector neurons in the mammalian auditory midbrain. *Eur. J. Neurosci.* 22:2879-2885.
- Pieribone VA, Aston-Jones G (1988) The iontophoretic application of Fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei. *Brain Res.* 475(2):259-271.
- Pinos H, Collado P, Rodriguez-Zafra M, Rodriguez C, Segovia S, Guillamon A (2001) The development of sex differences in the locus coeruleus of the rat. *Brain Research Bulletin* 56:73-78.
- Probst A, Cortes R, Palacios JM (1984) Distribution of alpha 2-adrenergic receptors in the human brainstem: an autoradiographic study using [3H]p-aminoclonidine. *Eur. J. Pharmacol.* 106(3):477-88.
- Puigdellivol-Sanchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C (1998) Efficacy of the fluorescent dyes Fast Blue, Fluoro-Gold, and Diamidino Yellow for retrograde tracing to dorsal root ganglia after subcutaneous injection. *J. Neurosci. Methods* 86(1):7-16.

- Ranson RN, Gaunt K, Santer RM, Watson AHD (2003) The effects of ageing and of DSP-4 administration on the micturition characteristics of male Wistar rats. *Brain Research* 988:130-138.
- Richards CD, Shiroyama T, Kitai ST (1997) Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 80:545-557.
- Richmond FJ, Gladdy R, Creasy JL, Kitamura S, Smits E, Thomson DB (1994) Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *J. Neurosci. Methods* 53(1):35-46.
- Robinson DS, Sourkes TL, Nies A, Harris LS, Spector S, Bartlett DL, Kaye IS (1977) Monoamine metabolism in human brain. *Arch. Gen. Psychiatry* 34(1):89-92.
- Rosario LA, Abercrombie ED (1999) Individual differences in behavioral reactivity: correlation with stress-induced norepinephrine efflux in the hippocampus of Sprague-Dawley rats. *Brain Res. Bull.* 48(6):595-602.
- Ross SB (1985) DSP4 and behavioural experiments. *Trends in Pharmacological Sciences* 6:237-237.
- Ross SB, Johansson JG, Lindborg B, Dahlbom R (1973) Cyclizing compounds. I. Tertiary N-(2-bromobenzyl)-N-haloalkylamines with adrenergic blocking action. *Acta Pharm. Suec.* 10(1):29-42.
- Saldana E, Feliciano M, Mugnaini E (1996) Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J. Comp. Neurol.* 371:15-40.
- Salgado H, Garcia-Oscos F, Martinolich L, Hall S, Restom R, Tseng KY, Atzori M (2011) Pre- and postsynaptic effects of norepinephrine on γ -aminobutyric acid-mediated synaptic transmission in layer 2/3 of the rat auditory cortex. *Synapse* 66:20-28.
- Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, Kobilka BK, Scheinin M (1998) d-amphetamine and l-5-hydroxytryptophan-induced behaviours in mice with genetically-altered expression of the α 2C-adrenergic receptor subtype. *Neuroscience* 86:959-965.
- Sara SJ, and Segal M. (1991). Plasticity of sensory responses of LC neurons in the behaving rat: implications of cognition. *Progress in Brain Research.* 88: 571-585.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3(6):1101-1108.
- Schmued L, Kyriakidis K, Heimer L (1990) In vivo anterograde and retrograde axonal transport of the fluorescent rhodamine-dextran-amine, Fluoro-Ruby, within the CNS. *Brain Res.* 526(1):127-134.
- Schmued LC, Fallon JH (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377(1):147-54.
- Schmued LC, Heimer L (1990) Iontophoretic injection of fluoro-gold and other fluorescent tracers. *J Histochem Cytochem;* 38(5):721-723.
- Shimizu N, Ohnishi S, Satoh K, Tohyama M (1978) Cellular organization of locus coeruleus in the rat as studied by Golgi method. *Arch. Histol. Jpn.* 41(2):103-112.
- Shimizu N, Katoh Y, Hida T, Satoh K (1979) The fine structural organization of the locus coeruleus in the rat with reference to noradrenaline contents. *Exp. Brain Res.* 37(1):139-48.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (1998). *Basic neurochemistry*, 6th ed. New York: Lippincott-Raven.
- Simpson KL, Altman DW, Wang L, Kirifides ML, Lin RC, Waterhouse BD (1997) Lateralization and functional organization of the locus coeruleus projection to the trigeminal somatosensory pathway in rat. *J. Comp. Neurol.* 385(1):135-147.
- Singewald N, Zhou G-Y, Schneider C (1995) Release of excitatory and inhibitory amino acids from the locus coeruleus of conscious rats by cardiovascular stimuli and various forms of acute stress. *Brain Research* 704:42-50.

- Sintorn IM, Bischof L, Jackway P, Haggarty S, Buckley M. (2010) Gradient based intensity normalization. *J. Microsc.* 240(3):249-258.
- Spyraki C, Arbuthnott GW, Fibiger HC (1982) The effect of DSP-4 on some positively reinforced operant behaviors in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 16:197-202.
- Stevens DR, McCarley RW, Greene RW (1994) The mechanism of noradrenergic alpha 1 excitatory modulation of pontine reticular formation neurons. *J. Neurosci.* 14:6481-6487.
- Strutz J (1982a) The origin of efferent labyrinthine fibres: a comparative study in vertebrates. *Arch. Otorhinolaryngol.* 234(2):139-143.
- Strutz J (1982b) The origin of efferent vestibular fibres in the guinea pig. A horseradish peroxidase study. *Acta Otolaryngol.* 94(3-4):299-305.
- Strutz J, Schmidt CL (1982) Acoustic and vestibular efferent neurons in the chicken (*Gallus domesticus*). A horseradish peroxidase study. *Acta Otolaryngol.* 94(1-2):45-51.
- Sullivan RM, Wilson DA, Lemon C, Gerhardt GA. (1994) Bilateral 6-OHDA lesions of the LC impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res.* 643: 306-309.
- Swanson LW (1976) The locus coeruleus: a cytoarchitectonic, Golgi and immunohistochemical study in the albino rat. *Brain Res.* 110(1):39-56.
- Swanson LW, Hartman BK (1975) The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J. Comp. Neurol.* 163(4):467-505.
- Swerdlow NR, Auerbach P, Monroe SM, Hartston H, Geyer MA, Braff DL (1993) Men are more inhibited than women by weak prepulses. *Biological Psychiatry* 34:253-260.
- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (2000) Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav. Pharmacol.* 11:185-204.
- Swerdlow NR, Halim N, Hanlon FM, Platten A, Auerbach PP (2001) Lesion size and amphetamine hyperlocomotion after neonatal ventral hippocampal lesions: more is less. *Brain Res. Bull.* 55:71-77.
- Swerdlow NR, Sprock J, Light GA, Cadenhead K, Calkins ME, Dobie DJ, Freedman R, Green MF, Greenwood TA, Gur RE, Mintz J, Olincy A, Nuechterlein KH, Radant AD, Schork NJ, Seidman LJ, Siever LJ, Silverman JM, Stone WS, Tsuang DW, Tsuang MT, Turetsky BI, Braff DL (2007) Multi-site studies of acoustic startle and prepulse inhibition in humans: initial experience and methodological considerations based on studies by the Consortium on the Genetics of Schizophrenia. *Schizophr Res.* 92(1-3):237-251.
- Szot P, Miguez C, White SS, Franklin A, Sikkema C, Wilkinson CW, Ugedo L, Raskind MA (2010) A comprehensive analysis of the effect of DSP4 on the locus coeruleus noradrenergic system in the rat. *Neuroscience* 166:279-291.
- Takada M, Li ZK, Hattori T (1987) A note on the projections of pars compacta neurons within pars reticulata of the substantia nigra in the rat. *Brain Research Bulletin* 18:285-290.
- Thiel CM, Fink GR (2007) Visual and auditory alertness: modality-specific and supramodal neural mechanisms and their modulation by nicotine. *J. Neurophysiol.* 97(4):2758-2768.
- Thompson AM (2003) Pontine sources of norepinephrine in the cat cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 457(4):374-383.
- Tong L, Altschuler RA, Holt AG (2005) Tyrosine hydroxylase in rat auditory midbrain: distribution and changes following deafness. *Hear. Res.* 206(1-2):28-41.
- Toshihiro M (2000) The locus coeruleus: history. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 18:57-64.
- Tsuruoka M, Tamaki J, Maeda M, Hayashi B, Inoue T (2011) The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus contributes to antinociception during freezing behavior following the air-puff startle in rats. *Brain Research* 1393:52-61.
- Unemoto S., Noguchi K, Kawai Y, Senba E. (1994) Repeated stress reduces the subsequent stress induced expression of Fps in rat brain. *Neurosci. Lett.* 167: 101-104.

- Valentino RJ, Van Bockstaele E (2008) Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European Journal of Pharmacology* 583:194-203.
- Valentino RJ, Foote SL, Aston-Jones G (1983) Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res* 270:363-367.
- Valls-Sole J (2004a) Contribution of subcortical motor pathways to the execution of ballistic movements. *Suppl. Clin. Neurophysiol.*57:554-562.
- Valls-Sole J (2004b) Function and dysfunction of the startle reaction in humans. *Rev. Neurol.* 39(10):946-955.
- Valls-Sole J (2012) Assessment of excitability in brainstem circuits mediating the blink reflex and the startle reaction. *Clin. Neurophysiol.* 123(1):13-20.
- Valls-Solé J (1998) Acoustic and somatosensory prepulse modulation of the blink reflex and the startle reaction. In: *Brainstem Reflexes and Functions.*, pp 119-131. Madrid: Litofinter,S.A.
- van den Buuse M, Lambert G, Fluttert M, Eikelis N (2001) Cardiovascular and behavioural responses to psychological stress in spontaneously hypertensive rats: effect of treatment with DSP-4. *Behavioural Brain Research* 119:131-142.
- van Dongen PA (1981) The central noradrenergic transmission and the locus coeruleus: a review of the data, and their implications for neurotransmission and neuromodulation. *Prog. Neurobiol.* 16(2):117-143.
- Veenman CL, Reiner A, Honig MG (1992) Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. *J. Neurosci. Methods* 41(3):239-54.
- Velley L, Cardo B, Kempt E., Mormede P, Nassif-Caudarella S. and Velly J. (1991) Facilitation of learning consecutive to electrical stimulation of the LC: cognitive alteration or stress reduction? *Progress in Brain Research* 88: 555-569.
- Vetter DE, Mugnaini E (1992) Distribution and dendritic features of three groups of rat olivocochlear neurons. A study with two retrograde cholera toxin tracers. *Anat. Embryol. (Berl)* 185(1):1-16.
- Vicentic A, Robeva A, Rogge G, Uberti M, Minneman KP (2002) Biochemistry and Pharmacology of Epitope-Tagged α 1-Adrenergic Receptor Subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302:58-65.
- Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, Hess EJ, Dawson VL, Dawson TM (2004) Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29):10744-10749.
- Wamsley JK, Alburges ME, Hunt MAE, Bylund DB (1992) Differential localization of α 2-adrenergic receptor subtypes in brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 41:267-273.
- White JS, Warr WB (1983) The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 219(2):203-214.
- Woodward DJ, Moises HC, Waterhouse BD, Yeh HH, Cheun JE (1991) Modulatory actions of norepinephrine on neural circuits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 287:193-208.
- Woody CD, Wang XF, Gruen E, Landeira-Fernandez J (1992) Unit activity to click CS changes in dorsal cochlear nucleus after conditioning. *Neuroreport* 3(5):385-388.
- Wrenn CC, Picklo MJ, Lappi DA, Robertson D, Wiley RG (1996) Central noradrenergic lesioning using anti-DBH-saporin: anatomical findings. *Brain Res.* 740(1-2):175-184.
- Yasui Y, Nakano K, Kayahara T, Mizuno N (1991) Non-dopaminergic projections from the substantia nigra pars lateralis to the inferior colliculus in the rat. *Brain Research* 559:139-144.
- Yasui Y, Tsumori T, Ando A, Domoto T (1995) Demonstration of axon collateral projections from the substantia nigra pars reticulata to the superior colliculus and the parvocellular reticular formation in the rat. *Brain Research* 674:122-126.

Zhang X, Zuo DM, Yu PH (1995) Neuroprotection by R(-)-deprenyl and N-2-hexyl-N-methylpropargylamine on DSP-4, a neurotoxin, induced degeneration of noradrenergic neurons in the rat locus coeruleus. *Neuroscience Letters* 186:45-48.

