



**EL SISTEMA EFERENTE OLIVOCOCLEAR EN EL  
TRAUMA ACÚSTICO. UN ESTUDIO  
INMUNOCITOQUÍMICO CUANTITATIVO DE LA  
INERVACIÓN COLINÉRGICA DEL  
ÓRGANO DE CORTI**

Memoria presentada por **Iván Díaz García** para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Salamanca

Director:

Prof. Dr. Miguel Á. Merchán Cifuentes

Salamanca, 2022





---

PROF.MIGUEL MERCHAN

---



merchan@usal.es



+34 23 294563

INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS DE CASTILLA  
Y LEON  
C/PINTOR FERNANDO  
GALLEGO I  
37007 SALAMANCA  
SPAIN

---

---

DOCTORADO EN NEUROCIENCIAS

---

MIGUEL A. MERCHÁN CIFUENTES, CATEDRÁTICO DEL  
DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOG.A DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada:

- El sistema eferente coclear en el trauma acústico. Un estudio inmunocitoquímico cuantitativo de la innervación colinérgica del órgano de Corti -

Es el trabajo de investigación realizado por D. Iván Díaz García bajo mi dirección durante los últimos cinco años. La memoria de este estudio recoge un análisis exhaustivo y detallado del efecto a corto y largo plazo del trauma acústico reversible. Los datos presentados en esta memoria constituyen una contribución original y han permitido un avance significativo en el conocimiento del sistema eferente coclear y sus efectos en la sobreestimulación con sonido.

Por todo ello, considero que esta tesis reúne la calidad y rigor científicos necesarios para que sea defendida en la Universidad de Salamanca como requisito para que D. Iván Díaz García opte al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Y para que así conste, firmo el presente certificado  
en Salamanca a 8 de junio de 2022

Prof. Miguel A. Merchán Cifuentes

---





Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-78898-C2-2-R), Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-117266RB-C21) y Universidad de Salamanca (Programa de financiación de grupos de investigación Modalidad B1 - 2020)



# **AGRADECIMIENTOS**





En primer lugar, agradecer al profesor Miguel Á. Merchán haber aceptado ser mi director de tesis doctoral y haberme acogido en su laboratorio para formarme como investigador. Gracias por la paciencia y la confianza puesta sobre mi, por haberme enseñado a hacer ciencia y buscar soluciones a los problemas que surgen. Gracias también por haberme aportado conocimiento, demostrarme que todo lo aprendido es poco y que aún queda mucho por descubrir.

Gracias a Nacho, por ser un maravilloso técnico de laboratorio, además de una gran persona. Gracias por toda la ayuda prestada en toda mi etapa de doctorando y por tener esas manos tan prodigiosas para la inmunocitoquímica. Gracias también por saber escuchar y estar siempre disponible para ayudar a los demás. Sin duda, serás alguien inolvidable.

A Ana Cecilia, por ser mi compañera desde el primer momento. Mil gracias por la gran ayuda aportada en los experimentos de trauma acústico y los registros electrofisiológicos, por aguantarme y por aportar alegría al laboratorio. No cambies nunca.

A Venezia e Inés por la ayuda prestada en este trabajo. Venezia, gracias por tu contribución a la hora de hacer las fotografías de las cócleas y los análisis y por ser siempre tan atenta. Inés, gracias por ayudarme con los análisis de la respuesta inflamatoria y por tener tanta paciencia conmigo.

A David Pérez, por haber formado parte de este trabajo, dedicándole tiempo y aportando ayuda para que, tanto los experimentos como los registros, salieran correctamente. A Blanca Cervantes, por ayudarnos a poner en marcha la configuración de la caja de sobreestimulación acústica. A Peter Johannsen, por la calibración del ruido utilizado para el trauma acústico.

A Marianny Pernía, por haberme enseñado a realizar las técnicas de análisis densitométrico, a manejar el microscopio y por ser siempre un apoyo para mi.

Al profesor Juan Carro, por haberme aguantado durante tantos años y por su ayuda con los análisis estadísticos.

Gracias a Sandra, por su gran ayuda para la inmunocitoquímica de las cócleas, por compartir tus momentos de alegría y locura y por ser una persona maravillosa.

Por último, quiero agradecer a mi esposa, familia y amigos, a quienes dedico este trabajo, el apoyo recibido durante todos estos años de formación. Gracias por ofrecerme vuestro apoyo, por escucharme y por compartir vuestros consejos que tanto me han servido para poder seguir adelante con este trabajo. Sin vuestro cariño esto no hubiera sido posible.

# **ABREVIATURAS**



**ABR:** respuestas auditivas evocadas del tronco del encéfalo (*Auditory Brainstem Responses*)

**acetil-CoA:** acetil coenzima A

**ACh:** acetilcolina (*acetylcholine*)

**AChE:** acetilcolinesterasa (*Acetylcholinesterase*)

**BK:** canales de potasio dependientes de calcio de alta conductancia

**CCE:** células ciliadas externas

**CCI:** células ciliadas internas

**ChAT:** acetilcolintransferasa o acetiltransferasa de colina (*Choline acetyltransferase*)

**COS:** complejo olivar superior

**dB SPL:** decibelios (en referencia al nivel de presión sonora)

**DO:** densidad óptica

**HHL:** pérdida auditiva oculta (*hidden hearing loss*)

**ISB:** haz espiral interno (*inner spiral bundle*)

**LOC:** sistema olivococlear lateral (*lateral olivocochlear system*)

**MOC:** sistema olivococlear medial (*medial olivocochlear system*)

**NLCT:** núcleo lateral del cuerpo trapezoide

**NMCT:** núcleo medial del cuerpo trapezoide

**NVCT:** núcleo ventral del cuerpo trapezoide

**OLS:** oliva lateral superior

**PTS:** cambio de umbral permanente (*permanent threshold shift*)

**ROI:** región de interés (*region of interest*)

**SK:** canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia

**TA:** trauma acústico

**TTS:** cambio de umbral temporal (*temporary threshold shift*)

# ÍNDICE





<b>PREÁMBULO</b> .....	<b><i>i</i></b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Sistema eferente olivococlear medial (MOC) .....	5
El sistema eferente olivococlear medial en el trauma acústico.....	10
Respuesta inflamatoria de la cóclea .....	12
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>GRUPOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>21</b>
<b>SOBREEXPOSICIÓN AL RUIDO</b> .....	<b>23</b>
<b>REGISTROS DE ABR</b> .....	<b>25</b>
<b>INMUNOCITOQUÍMICA</b> .....	<b>27</b>
Fijación y extracción de cócleas.....	27
Reconstrucción coclear.....	30
Análisis cuantitativo de los terminales inmunorreactivos.....	35
Morfometría .....	38
Densitometría.....	39
Cuantificación de la respuesta inflamatoria .....	42
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>42</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>REGISTROS DE POTENCIALES EVOCADOS TRONCOENCEFÁLICOS</b> .....	<b>47</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES DE SUPERFICIE INMUNOTEÑIDAS CON CHAT.</b>	<b>50</b>
<b>DESCRIPCIÓN DE LOS TERMINALES DENSITOMÉTRICOS EN LOS CASO CONTROL.</b>	
<b>MORFOMETRÍA Y DENSITOMETRÍA</b> .....	<b>53</b>
<b>ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y DENSITOMÉTRICO TRAS TA</b> .....	<b>56</b>
Morfometría .....	56
Densitometría.....	56
Cuantificación de los botones por niveles cocleotópicos .....	57
<b>RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA CÓCLEA</b> .....	<b>60</b>

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>VALIDACIÓN DEL MODELO DE TTS .....</b>	<b>65</b>
<b>INMUNOCITOQUÍMICA CUANTITATIVA PARA CHAT EN LOS TERMINALES     COLINÉRGICOS DEL MOC.....</b>	<b>66</b>
<b>ANÁLISIS COCLEOTÓPICO.....</b>	<b>68</b>
<b>RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA CÓCLEA .....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>

# PREÁMBULO



La Organización Mundial de la Salud estima que, en los próximos 30 años, más de 1.000 millones de personas podrían llegar a tener problemas auditivos relacionados con la exposición al ruido debido a prácticas inadecuadas y al uso inseguro de aparatos de reproducción de audio (WHO, 2015). Es por ello por lo que desde esta misma organización se considera la pérdida auditiva por exposición al ruido como una amenaza para la salud pública que debe ser abordada en términos de prevención, formando parte, por tanto, de uno de los objetivos de desarrollo sostenible.

Sin embargo, el ruido actualmente forma parte de nuestro día a día. Los problemas auditivos generados como consecuencia de una excesiva exposición acústica son cada vez mayores entre los jóvenes debido a una experimentación poco segura a altos niveles sonoros (WHO, 2015). Es muy común también estar sometidos al ruido durante la jornada laboral. Actualmente, el ruido ocupacional forma parte de uno de los problemas percibidos por los empleados como factor de riesgo para su salud en sus puestos de trabajo. Y mientras tanto, el ruido ambiental va en aumento, sobre todo en zonas urbanas, gracias al tráfico intensivo y al desarrollo de la industrialización. Sin embargo, exponerse durante largos periodos de tiempo al ruido produce alteraciones en el sistema auditivo además de afectar a otros aspectos vitales como pueden ser alteraciones de aprendizaje, de la atención, la memoria y el lenguaje entre otros problemas cognitivos (ver revisiones de Arlinger, 2003; Daniel, 2007 y Basner et al., 2014).

Las principales lesiones por que se generan en el oído interno debido a la exposición al ruido se producen tanto en las células ciliadas como en la inervación neuronal de la cóclea (Mulroy et al., 1990; Liberman y Kujawa,

2017; Coyat et al., 2019). Ya que este tipo de lesiones no tiene cura, las líneas de investigación van encaminadas a la prevención de la sordera. Es por todo ello que resulta de interés general conocer los riesgos que supone la exposición prolongada al ruido y contribuir de manera activa para tratar de prevenir lesiones acústicas.

Diversos estudios científicos han asociado al sistema olivococlear medial como una estructura anatómica cuya función es la de proteger el receptor auditivo frente a la exposición al ruido (Handrock y Zeisberg, 1982; Zheng et al., 1997). Sin embargo, posteriores investigaciones muestran resultados controvertidos acerca del papel protector del sistema olivococlear en la audición, cuestionando su función protectora y asociando este papel a la actividad que genera sobre el receptor auditivo (Fuente, 2015; Smith y Keil, 2015). Así pues, resulta de gran interés conocer en detalle el funcionamiento del sistema olivococlear y profundizar en los efectos que producen sobre los receptores auditivos. En esta tesis doctoral pretendemos estudiar el efecto de la exposición al ruido sobre las fibras colinérgicas del sistema eferente olivococlear medial. De esta manera, trataremos de identificar los cambios anatómicos producidos en sus botones sinápticos como consecuencia de un trauma acústico por sobreexposición al ruido que genera cambios de umbral reversibles.

# INTRODUCCIÓN





Las vías eferentes olivococleares se originan en neuronas del complejo olivar superior (COS), una estructura anatómica situada en el puente del tronco encefálico. Este conjunto neuronal, implicado en el procesamiento de las señales binaurales y la regulación de la respuesta coclear, está compuesto por tres núcleos principales, la oliva lateral superior (OLS), la oliva medial superior y el núcleo medial del cuerpo trapezoide (NMCT), y áreas que rodean a los anteriores núcleos conocidas como periolivares. De los núcleos que componen el COS, conviene destacar por razón del trabajo que presentamos dentro de estas áreas, los núcleos lateral y ventral del cuerpo trapezoide (NLCT y NVCT respectivamente), y el núcleo paraolivar superior (ver una revisión en: Malmierca, 2003; Guinan, 2006).

Los primeros datos anatómicos sobre la existencia de un sistema de conexiones entre el sistema nervioso central y la cóclea se obtuvieron utilizando el método de Marchi (impregnación argéntica de axones en degeneración), tras realizar pequeñas lesiones en diferentes zonas del COS en gato (Rasmussen, 1946, 1953). En estos experimentos, ya considerados como clásicos, se demostró la existencia de botones de degeneración impregnados (degeneración Walleriana) que marcan bilateralmente fibras que, desde el COS, alcanzan el suelo del IV ventrículo y luego entran en la cóclea a través del nervio vestibulococlear (Rasmussen, 1946, 1953).

La localización precisa de las neuronas del sistema eferente olivococlear en el COS se estudió inicialmente en gato, tras inyectar unilateralmente un trazador retrógrado (peroxidasa del rábano picante) en la cóclea a través de la ventana redonda, observándose, sobre todo en el lado ipsilateral a la inyección, neuronas marcadas en las proximidades de la OLS

y en el lado contralateral en el NVCT y el núcleo periolivar dorsomedial (Warr, 1975).

Por otra parte, tras inyectar <sup>35</sup>S-Metionina, como trazador anterógrado en la OLS, se observaron botones terminales marcados bajo las células ciliadas internas (CCI) y sobre las expansiones distales de las neuronas del ganglio espiral tipo I (Guinan et al., 1983). Estos mismos autores, tras inyectar este trazador en el NVCT, observaron terminales sinápticos contactando, además de con las expansiones de las neuronas ganglionares, con la base de las células ciliadas externas (CCE) (Guinan et al., 1983). Estos estudios permitieron considerar la existencia de un sistema olivococlear lateral (en inglés *lateral olivocochlear system* - LOC), procedente de OLS, y otro medial (en inglés *medial olivocochlear system* - MOC), procedente del NVCT, con dianas diferentes en el receptor.

La posible función que cumple el sistema eferente en la actividad coclear se demostró tras aplicar shocks eléctricos sobre el suelo del IV ventrículo en el lugar por donde cruzan las fibras eferentes de camino a la cóclea (Galambos, 1956). En estos experimentos, después de presentar estímulos sonoros y realizar registros de campo en la ventana redonda, se observó un descenso en la actividad eléctrica del nervio auditivo (Galambos, 1956). De este modo se concluyó, que el sistema eferente olivococlear es capaz de modificar la respuesta eléctrica del nervio coclear. En estudios más recientes con un similar planteamiento de estimulación, realizados en gatos (Desmedt y Monaco, 1961) y, otros mas recientes en chinchillas (Elgueda et al., 2011) se comprobó que, además de producir la supresión de la actividad eléctrica de la cóclea (potencial de acción compuesto), la amplitud de los

microfónicos cocleares aumenta tras aplicar shocks eléctricos sobre el suelo del IV ventrículo. Dado el origen funcional de los microfónicos cocleares en la CCE, estos experimentos permiten inferir un efecto del sistema eferente medial sobre la respuesta del nervio auditivo.

Como más adelante se explicará, uno de los objetivos de este trabajo de tesis doctoral será el de analizar el papel del sistema eferente medial tras la sobreestimulación acústica. Por tanto, nos centraremos en desarrollar e intentar comprender los aspectos básicos de esta parte del sistema eferente olivococlear.

### **Sistema eferente olivococlear medial (MOC)**

El sistema eferente olivococlear medial (*medial olivocochlear* – MOC), contiene fibras miélicas que parten de neuronas situadas en el NVCT, situado en la región ventrolateral del puente (Warr, 1980; White y Warr, 1983; Aschoff y Ostwald, 1988; Vetter y Mugnaini, 1992).

Este núcleo está compuesto por un grupo de neuronas que poseen somas grandes y planas con una morfología irregular, cuyas dendritas se extienden horizontalmente por todo el núcleo (Brown y Levine, 2008). El NVCT recibe proyecciones ascendentes desde las neuronas multipolares del núcleo coclear posteroventral del lado contralateral (Darrow et al., 2012; Brown et al., 2013) y descendentes desde el colículo inferior (Vetter et al., 1993) y desde la corteza auditiva primaria (Feliciano et al., 1995; Saldaña, 2015). Dentro de los circuitos del COS conviene destacar que las neuronas MOC del NVCT también reciben conexiones potencialmente inhibitorias del NMCT del lado ipsilateral (Cadenas et al., 2020).

Al inyectar un trazador anterógrado en regiones próximas al NVCT se comprobó que las fibras eferentes del MOC conectan con las cócleas de ambos lados, pero con una proyección mayoritaria contralateral (Guinan et al., 1983). Las fibras mielínicas del MOC que proyectan hacia la cóclea contralateral, atraviesan la línea media cerca del suelo del IV ventrículo, formando el haz olivococlear medial cruzado, mientras que las que proyectan a la cóclea ipsilateral forman el haz olivococlear medial directo (Guinan et al., 1983). Estas fibras entran en la cóclea a través del nervio vestibulococlear (anastomosis de Ohrt), continúan por el canal de Rösenthal, atraviesan el túnel de Corti y, tras un trayecto espiral, contactan con las CCE (Raphael y Altschuler, 2003).

En mamíferos, el MOC actúa sobre la amplificación coclear, un mecanismo biológico dinámico que mejora la agudeza auditiva para la discriminación de las frecuencias (Ashmore, 2008). Este fenómeno se fundamenta en la regulación del efecto del movimiento vibratorio de la membrana basilar en la superficie endolinfática del órgano de Corti, siendo inducido por cambios micromecánicos de la oscilación contráctil de las CCE (Dallos et al., 1997; Raphael and Altschuler, 2003). Se sabe que esta regulación está altamente relacionada con la neurotransmisión de los terminales eferentes del MOC actuando sobre las CCE.

Mediante el método de Köelle, una técnica de incubación de secciones histológicas se demostró por primera vez la existencia de acetilcolinesterasa (AChE) en la cóclea (Churchill et al., 1956; Churchill y Schuknecht, 1959). Debido a que la actividad de la AChE no se observa en los sistemas aferentes, surgió la idea de que dentro de la cóclea la actividad

colinérgica se debería relacionar con el sistema eferente olivococlear (Churchill y Schuknecht 1959). Para comprobar esta hipótesis, estos investigadores, en un estudio posterior, seccionaron el haz olivococlear a su paso por el suelo del IV ventrículo observando una disminución de AChE, así como la degeneración de axones en la cóclea (Churchill y Schuknecht 1959). Este estudio demostró, por tanto, que el sistema eferente olivococlear está relacionado con la neurotransmisión colinérgica. En un posterior estudio inmunocitoquímico se comprobó la especificidad de AChE y acetilcolintransferasa (ChAT), enzimas encargadas de catalizar la síntesis de acetilcolina (ACh), como anticuerpos para identificar neuronas colinérgicas en cerebros de rata (Eckenstein y Sofroniew, 1983). Los resultados mostraron que la AChE marca también células no colinérgicas, siendo, por lo tanto, un marcador menos específico que ChAT (Eckenstein y Sofroniew, 1983). Actualmente, se acepta que ChAT podía ser considerada como el mejor marcador específico de neuronas colinérgicas y de terminales sinápticos en preparaciones de superficie del órgano de Corti (Altschuler et al., 1985; Eybalin and Pujol, 1987).

La síntesis de ACh por medio de la ChAT se realiza mediante la unión del acetyl-CoA a la colina en los terminales sinápticos de las neuronas colinérgicas (Nachmansohn y Machado, 1943). Esta enzima es sintetizada en el soma neuronal, codificada por el gen *CHAT*, y viaja por el axón hasta sus terminales sinápticos (Oda, 1999; Matsuo et al., 2011). La ACh se libera al espacio sináptico y se acopla a un receptor postsináptico. El neurotransmisor restante es hidrolizado gracias a la acción de la enzima AChE, descomponiéndola en colina y acetato. La colina es reciclada y

devuelta a los terminales sinápticos para una nueva síntesis de ACh uniéndose a la acetil-CoA (Simon and Kuhar, 1976; Matsuo et al., 2011). Durante varios años, ChAT se ha empleado como marcador de fibras colinérgicas en el sistema nervioso central (Wainer et al., 1984). En cócleas, los estudios inmunocitoquímicos muestran que la actividad de ChAT se expresa principalmente en los axones de neuronas olivococleares y sus terminales, principalmente en las regiones de las CCE y CCI, además de detectarse en otras estructuras como la membrana de Reissner, la membrana basilar, la estría vascular y el ganglio espiral (Godfrey et al., 1976). En este trabajo, por tanto, se realizará inmunocitoquímica para ChAT como marcador de las fibras del sistema eferente olivococlear en cócleas de rata, lo que nos permitiría analizar cualitativa y cuantitativamente los axones y terminales colinérgicos del MOC.

La idea de que el sistema eferente olivococlear actúa mediante neurotransmisión colinérgica se pudo demostrar también empleando análisis de PCR sobre cócleas de ratas, a través de los cuales se observó la expresión de subunidades  $\alpha$  de receptores colinérgicos (Housley et al., 1994). De modo más específico, utilizando técnicas de hibridación in situ sobre un tejido coclear, se demostró la localización anatómica de una alta concentración de receptores  $\alpha 9$  colinérgicos en las CCE (Elgoyhen et al., 1994). Funcionalmente, el efecto de estos receptores se valoró mediante el estudio de ratones mutantes (*knock out*) para la subunidad  $\alpha 9$  del receptor de ACh (Vetter et al., 1999). En estos animales se comprobó que no se producía supresión coclear al estimular eléctricamente las fibras olivococleares,

describiendo así la importancia de la subunidad  $\alpha 9$  del receptor de ACh para regular el efecto del MOC sobre las CCE (Vetter et al., 1999).

Desde el punto de vista molecular, en experimentos en el que se emplearon ovocitos que expresan las subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$  como heterómeros, se demostró que  $\alpha 10$  es esencial para modular la sensibilidad de la entrada de calcio en la CCE (Elgoyhen et al., 2001). Mediante técnicas de patch clamp se demostró que este influjo de  $Ca^{2+}$  inducido por la actividad colinérgica sobre las CCE desencadena la activación de canales de potasio en las CCE generando hiperpolarización (Blanchet et al., 1996). En esas células se han descrito dos tipos de canales de potasio: uno de alta conductancia (BK) y otro de baja (SK) (Wersinger et al., 2010; Rohmann et al., 2015). Mientras que los canales BK se expresan en la región basal de la cóclea, los SK se sitúan en regiones más apicales (Maison et al., 2013; Katz y Elgoyhen, 2014; Delacroix y Malgrange, 2015; Lin y Bozovic, 2020). La hiperpolarización de las CCE, inducida por la apertura de canales de potasio, hace que se modifique su contractilidad cambiando el efecto piezoeléctrico de la prestina, una proteína motora de la membrana, propia de estas células y, que se activa al producirse cambios de voltaje (Dallos et al., 1997; Cooper y Guinan, 2006). De esta manera, las sinapsis colinérgicas del MOC actúan sobre la electromotilidad de las CCE y regulan la micromecánica y la amplificación coclear (Santos-Sacchi y Dilger, 1988; Dallos et al., 1997; Raphael y Altschuler, 2003).

## **El sistema eferente olivococlear medial en el trauma acústico**

Se denomina trauma acústico (TA) al efecto producido sobre los mecanismos y estructuras del oído interno como consecuencia de una excesiva exposición al ruido (Medina-Garin et al., 2016). Según la nomenclatura internacional más aceptada, a los cambios reversibles de umbral tras un trauma acústico se les denomina *temporary threshold shift* (TTS), y *permanent threshold shift* (PTS) si se mantiene en el tiempo. El grado de recuperación frente a la sobreestimulación sonora depende de varios parámetros del estímulo como el tiempo de exposición, el método de estimulación (campo abierto o cerrado), el espectro de frecuencias que compone el sonido o la intensidad del estímulo acústico (Patuzzi y Thompson, 1991; Ryan et al., 2016; Hertzano et al., 2020). Diversos estudios anatómicos han demostrado que el TA, además de degeneración sináptica aferente, como acabamos de mencionar, también puede producir pérdida de CCE, pérdida de configuración de los penachos de los estereocilios (Kujawa y Liberman, 2015; Ryan et al., 2016). Además, se ha descrito daño en las células de soporte y lesiones en la estría vascular tras la inducción de un TA (ver revisiones de Fuente, 2015; Ryan et al., 2016; Frye et al., 2019).

No existe acuerdo entre los diferentes autores respecto al tiempo que debe pasar sin recuperación de umbrales desde la exposición al ruido para considerar que la pérdida auditiva se considere como permanente. Sin embargo, por consenso, este límite máximo de tiempo ha sido establecido en 30 días tras la estimulación (Ryan et al., 2016).

En un estudio realizado en ratones a los que se sobreexpone a un ruido de banda de 8-16KHz durante 2 horas a 100dB, se observó una



alteración en las respuestas auditivas evocadas del tronco del encéfalo (*Auditory Brainstem Responses* – ABR), que revirtió a las 2 semanas (Kujawa y Liberman, 2009). Sin embargo, a pesar de la recuperación de las pruebas funcionales, un análisis histológico del órgano de Corti realizado sobre estos animales, demostró una pérdida de terminales aferentes y una degeneración tardía del nervio auditivo que se conoce como sinaptopatía coclear (Kujawa y Liberman, 2009). Con el tiempo, esta alteración de los terminales aferentes, que puede cursar con umbrales normales de respuesta al sonido, podría ir acompañadas de dificultades en la discriminación auditiva (Liberman y Kujawa, 2017; Fernandez et al., 2020). A este fenómeno, se le conoce actualmente con el nombre de pérdida auditiva oculta (*Hidden Hearing Loss* – HHL) (Schaette y McAlpine, 2011).

En el apartado anterior se explicó que los receptores de ACh, a través de la subunidad  $\alpha 9$ , son los responsables de la activación colinérgica del MOC sobre las CCE (Vetter et al., 1999). El efecto del TTS sobre los terminales eferentes del MOC se estudió en ratones *knock out* y *knock in* para la expresión de la subunidad  $\alpha 9$  del receptor de ACh. Al someter a los animales *knock out* a un ruido intenso de 1–16 kHz a 100 dB durante una hora se produjo un cambio de umbral irreversible una semana después junto con una reducción en el número de contactos sinápticos de los terminales del MOC con las CCE; en cambio, en los animales *knock in*, que no mostraron cambio de umbral tras la exposición al ruido, se observó un aumento en el número de contactos sinápticos por CCE (Boero et al., 2018). Este estudio muestra que la actividad colinérgica del MOC está potencialmente relacionada con la

prevención de la HHL y que, el sistema eferente medial incrementa la resistencia de la cóclea a sufrir daños por el TA.

A pesar de que se ha analizado el efecto del TA sobre el sistema aferente, hasta la fecha muy pocos estudios han analizado en profundidad los efectos del TTS sobre el MOC. Sin embargo, varios autores han sugerido la posibilidad de que la sinaptopatía bien caracterizada para las CCI podría tener también un componente en la inervación de las CCE (Darrow et al., 2007; Kujawa y Liberman, 2009; Boero et al., 2018). Por ello, en esta tesis doctoral nos hemos centrado en analizar los cambios de umbral (registrados mediante ABR) y el estado de la inervación colinérgica sobre las CCE mediante inmunocitoquímica cuantitativa en preparaciones de superficie del órgano de Corti, en un modelo bien validado de TTS.

## **Respuesta inflamatoria de la cóclea**

Durante mucho tiempo, la cóclea ha sido considerada como una estructura inmunológicamente especial, debido a que se haya aislada en su estuche óseo, sugiriendo que no sería capaz de producir una respuesta inmunológica convencional (McCabe, 1989). Sin embargo, la evidencia de la existencia de células inflamatorias en los espacios laberínticos del oído interno ya se conocía gracias a observaciones realizadas sobre cortes ultra finos del hueso temporal en cobayos donde se encontraron células libres, consideradas inicialmente como macrófagos o linfocitos (Rask-Andersen y Stahle, 1979). La aparición de la respuesta inflamatoria en la cóclea se asoció a posibles lesiones traumáticas o patologías propias del oído interno (Harris y Ryan, 1984), si bien también se ha descrito la existencia de células

inflamatorias procedentes del sistema inmunológico que residen en la cóclea en condiciones normales (Lang et al., 2006; Zhang et al., 2012; Cai et al., 2014; Okano, 2014), su aparición también puede ser producto de una respuesta inflamatoria debida a diferentes patologías vestibulococleares, incluyendo las lesiones acústicas (Harris y Ryan, 1984; Cai et al., 2014; Okano, 2014).

Según mostró un reciente estudio en el que se emplearon marcadores de expresión génica, se detectaron abundantes cantidades de células residentes proinflamatorias, destacando los macrófagos y monocitos, en cócleas de ratón con pérdida auditiva progresiva (Matern et al., 2017). Como se mencionó anteriormente, el órgano de Corti es susceptible de sufrir daños en las estructuras celulares y anatómicas que lo componen debido a un trauma acústico generado por exposición prolongada al ruido. En un estudio realizado en cobayos se observaron a través de microscopio electrónico células inflamatorias fagocíticas en la región de las CCE y el túnel de Corti cinco días después de haber inducido a los animales a un PTS (Fredelius y Rask-Andersen, 1990). Igualmente, en estudios posteriores se detectaron macrófagos en el ligamento espiral, el limbo espiral y en el ganglio espiral incluso 7 días después de la estimulación (Hirose et al., 2005). La aparición de estas células inflamatorias tras TA ha sido asociada a procesos apoptóticos y catabólicos encaminados a la eliminación de restos celulares y reparación de tejido tras una lesión coclear (Yang et al., 2015; He et al., 2020). No obstante, al producirse un TTS sin pérdida de células ciliadas, también se demostró la existencia de respuesta inflamatoria en cócleas de ratones sometidos a un ruido prolongado de baja intensidad (Frye et al., 2018).

Utilizando el receptor CX<sub>3</sub>CR1 de fractalina, que identifica macrófagos, como marcador de la respuesta excitotóxica producida por un TTS, se demostró también su posible papel en la reparación de las estructuras sinápticas afectadas por el TA en el órgano de Corti (Kaur et al., 2019).

En resumen, debido a que las lesiones ocasionadas por el HHL han sido estudiadas a nivel del sistema eferente auditivo, poco o nada se sabe acerca de los efectos que se producen en el sistema eferente, concretamente, en el MOC. Para este trabajo, se va a emplear un modelo de TTS que será evaluado mediante el análisis de umbrales registrando ABR. Sobre este modelo de sordera temporal por TA se realizará un análisis indirecto de la neurotransmisión colinérgica, empleando inmunocitoquímica cuantitativa para los botones terminales colinérgicos del órgano de Corti. Mediante técnicas morfológicas y densitométricas se evaluará tanto la pérdida de terminales como el tamaño de los botones colinérgicos situados bajo las CCE y la cantidad de producto de reacción que poseen para ChAT. Se explorarán los efectos del TA en la organización cocleotópica 1 día y 14 días después de recibir la sobreestimulación acústica. De esta manera, se podrán observar los cambios que sufren los terminales colinérgicos del MOC tanto a corto como a largo plazo, cuando el umbral auditivo se haya recuperado. Además, se estudiará la respuesta inflamatoria que se produce en el TTS analizando la evolución temporal del número de células libres inflamatorias a lo largo de la cóclea.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Hipótesis: los cambios de umbral temporales producidos por exposición al ruido inducen una alteración de la neurotransmisión del MOC junto con una reacción inflamatoria, ambas reversibles al recuperarse los umbrales. Dado el papel del MOC en la discriminación de frecuencias, el trauma acústico con cambio de umbral temporal afecta la organización tonotópica de la innervación colinérgica de la cóclea.

Objetivos:

1. Validar un modelo de trauma acústico reversible basado en la estimulación con ruido de banda (8-16 kHz, a 107 dB SPL de intensidad durante 90 minutos) en ratas.
2. Evaluar la evolución en el tiempo de los umbrales auditivos en relación con los cambios en el número, tamaño y la densidad óptica (DO) de los terminales colinérgicos del MOC en la cóclea mediante inmunocitoquímica cuantitativa.
3. Estudiar los parámetros del objetivo anterior en relación con las diferencias cocleotópicas en el órgano de Corti.
4. Evaluar cuantitativamente la evolución temporal de la reacción inflamatoria inducida por la sobreestimulación acústica mediante el análisis cuantitativo de células libres en las preparaciones de superficie.





# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **GRUPOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para este trabajo se emplearon un total de 18 ratas Wistar macho adultas de entre 250 y 300 g de peso. Los experimentos han sido realizados cumpliendo con la normativa española (Real Decreto 53/2013 – Ley 32/2007) y la guía de la Unión Europea (Directiva 2010/63/EU) para el uso y el cuidado de los animales de investigación. Los protocolos experimentales que se han llevado a cabo para este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. A todos los animales se les registraron ABR antes del inicio del protocolo para comprobar el funcionamiento normal de la vía auditiva. También se registraron ABR en diferentes momentos del protocolo para observar los cambios en el umbral auditivo a lo largo del procedimiento experimental. Cada animal fue asignado de manera aleatoria a uno de los grupos siguientes:

### **Grupo control**

Este grupo de animales (n=12) no fue sometido a TA. Los registros de ABR de este grupo servían para establecer las condiciones de respuesta auditiva normal. También se realizó un estudio histológico empleando inmunocitoquímica para ChAT y poder así analizar la distribución tonotópica normal de los botones eferentes a lo largo de la longitud de la cóclea (Figura 1).

### **Grupo experimental: trauma acústico**

Este grupo de animales recibió una sesión de TA a lo largo del protocolo. Los registros de ABR se realizaron en los mismos momentos del protocolo que los del grupo control. Para el análisis histológico, el grupo de TA se subdividió en dos grupos:



## **SOBREEXPOSICIÓN AL RUIDO**

Se sometió a los animales del grupo de TA a una sesión de sobreestimulación acústica en campo abierto dentro de una caja de madera diseñada *ad hoc* para el experimento. Esta caja fue diseñada con paredes asimétricas para evitar un ambiente reverberante en su interior. En sus cuatro paredes no paralelas se situaron cuatro altavoces Hifi (Mac Audio Electronic GmBH & Co. KG, Alemania) a diferentes alturas de la caja (figura 2). Durante el procedimiento de sobreestimulación acústica, los animales permanecieron despiertos dentro de jaulas individuales que se encontraban suspendidas en el centro de la caja. El estímulo sonoro se generó de manera digital (RP2.1, TDT), fue amplificado (AudioSource AMP One/A), filtrado (RPVDS software) y calibrado dentro de la caja utilizando un micrófono de 1/2" (Brüel and Kjaer instruments, 4134) acoplado a un sonómetro con un analizador de la transformada rápida de Fourier (Larson Davis 831). Las sesiones de sobreestimulación se realizaron empleando un ruido de entre 8 y 16 kHz a 107 dB SPL durante 90 minutos.



Figura 2. Caja de estimulación acústica donde se generó el trauma acústico (TA). Se trata de una caja de madera con cuatro paredes laterales dispuestas de manera no paralela para evitar efectos reverberantes. En cada una de estas paredes hay incrustado un altavoz, situados a diferentes alturas para que el ruido abarque toda la caja a la misma intensidad. En el centro de la caja se situaron 4 jaulas colgantes donde se introdujeron los animales que recibieron el TA.

## REGISTROS DE ABR

Los registros electrofisiológicos de ABR permiten establecer el umbral auditivo a lo largo del protocolo experimental. Esto permitirá validar el modelo de TTS, que es el primer objetivo de este estudio. Los registros se realizaron en diferentes momentos del protocolo: en el día 0, que corresponde al momento antes de someter a los animales al TA; un día y dos días después de recibir el TA; a los 7 y a los 14 días (Figura 1 – círculos naranjas). Tanto los animales del grupo control como los del grupo de TA siguieron el mismo protocolo de registro. Para el análisis histológico de la cóclea, unos animales de ambos grupos fueron sacrificados un día después del TA (TA + 1 día), para un estudio a corto plazo, mientras que otros fueron sacrificados a los 14 días (TA + 14 días) para su estudio a largo plazo.

Los ABR se realizaron bajo anestesia de gas (sevoflurano al 5%). Para registrar los potenciales evocados se empleó un sistema de procesamiento de señal en tiempo real (RZ6 Multi I/O Processor, Tucker-Davis Technologies [TDT], Alachua, FL, United States). El estímulo sonoro que evocaría la respuesta eléctrica en la vía auditiva fue calibrado empleando un micrófono de 1/4" (Brüel and Kjaer) antes de registrar los ABR. El estímulo sonoro consiste en clics de polaridad alterna de 0,1 ms presentado en una tasa de repetición de 21 clics por segundo que se libera en pasos ascendentes de 10 dB desde 10 a 90dB empleando un altavoz magnético (MF1 Multi- Field Magnetic 147 Speaker TDT) conectado al conducto auditivo externo mediante un tubo de plástico de 10 cm de longitud. Esto supondría un retraso controlado de 1,4 ms hasta que el estímulo alcanza el tímpano.

Para registrar los ABR se colocaron 3 electrodos de manera subcutánea, dos de registro activo en ambas mastoides y uno en el vértex. Los registros se realizaron de manera monoaural, usando el electrodo situado en la mastoides ipsilateral al oído estimulado con clics como electrodo de referencia, y el de la mastoides contralateral como electrodo de tierra. Los potenciales evocados fueron amplificados y digitalizados usando un preamplificador Medusa RA16PA y un amplificador RA4LI (TDT). Ambos lados fueron analizados individualmente. La señal final fue filtrada con un filtro de paso alto a 500 Hz y uno de paso bajo a 3.000 Hz. Se calculó el umbral auditivo utilizando el software MatLab (©MatLab R-2017 a) a partir de la amplitud de la onda II de los ABR. Se establece el umbral como la mínima intensidad sonora capaz de producir una onda en estos registros electrofisiológicos. Se considera onda cuando el voltaje está por encima o por debajo de la media y 2 veces la desviación estándar de las variaciones de voltaje que se producen durante el primer milisegundo del registro. La onda II fue la primera que apareció en los registros de ABR y, por tanto, se estableció como referencia para calcular los umbrales empleando el software Matlab (©MatLab R-2017 a). Todos los registros de ABR se realizaron en una cámara aislada de ruido externo en diferentes momentos del protocolo: antes de someter a los animales al TA (día 0), 24 y 48 horas después del TA (días 1 y 2 respectivamente), 7 y 14 días después del TA (día 7 y día 14 respectivamente).



## **INMUNOCITOQUÍMICA**

### **Fijación y extracción de cócleas**

Los animales controles y estimulados se perfundieron simultáneamente bajo anestesia empleando una inyección intraperitoneal de Pentobarbital sódico al 6% (60 mg/kg de peso corporal). Posteriormente, se les abrió la caja torácica para realizar una incisión en el ventrículo izquierdo, dejando a la vista la aorta, a través de la cual se introduce una cánula arterial de perfusión conectada a un aparato de presión que controla la cantidad de líquido que puede soportar por presión. Para la perfusión se aplicó, en primer lugar, una solución de suero Ringer (125 ml de tampón salino con pH 6,9) para y, por último, 500 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato a 0,1M pH 7,6. Una vez fijados se decapitó a los animales para extraerles ambas cócleas, las cuales fueron perfundidas a través de la ventana redonda y almacenadas en una habitación a temperatura ambiente durante 2 horas en una solución de paraformaldehído al 4%. Después pasaron por un proceso de descalcificación utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 8% durante 12 días.

La estructura membranosa de la cóclea fue separada de la pared ósea (figura 3). Se extrajeron cuidadosamente 6 secciones de membrana para una preparación de superficie del epitelio coclear para su procesamiento inmunocitoquímico. En primer lugar, las secciones cocleares fueron lavadas empleando una solución de tampón de bloqueo (tampón de fosfato en solución salina al 5% más Tritón X-100 al 0,3%) durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a incubar el anticuerpo acetilcolintransferasa (AB144P; Merck Millipore, Temecula, CA, USA), con

una dilución de 1:100, durante 2 días. Posteriormente, las secciones cocleares pasaron por un proceso de lavado con tampón - Tris más Tritón X-100 (TBS-Tx) durante 15 minutos, proceso que se repitió tres veces. Después se añadió el anticuerpo secundario (biotinylated anti-goat IgG H+L, BA-5000; Vector, Burlingame, CA, USA), con una dilución de 1:200, y se dejó incubando durante 24 horas a temperatura ambiente. Por último, la muestra fue lavada con TBS-Tx, se dejó incubando con el complejo avidina/biotina peroxidasa (ABC complex, Vectastain Standard ABC kit PK-4000; Vector, Burlingame, CA, USA) durante 24 horas y se realizó, de nuevo, otro lavado con TBS-Tx seguido de Tris HCl. Para visualizar la reacción de la peroxidasa, las secciones cocleares se dejaron incubando en diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,006%. Por último, las muestras se deshidrataron empleando distintos grados de solución de alcohol, desde 50 hasta 100%, seguido de un aclarado en xileno. Cada una de las secciones cocleares fue colocada en un portaobjetos y se le añadió un cubreobjetos para poder visualizarlas a microscopio.

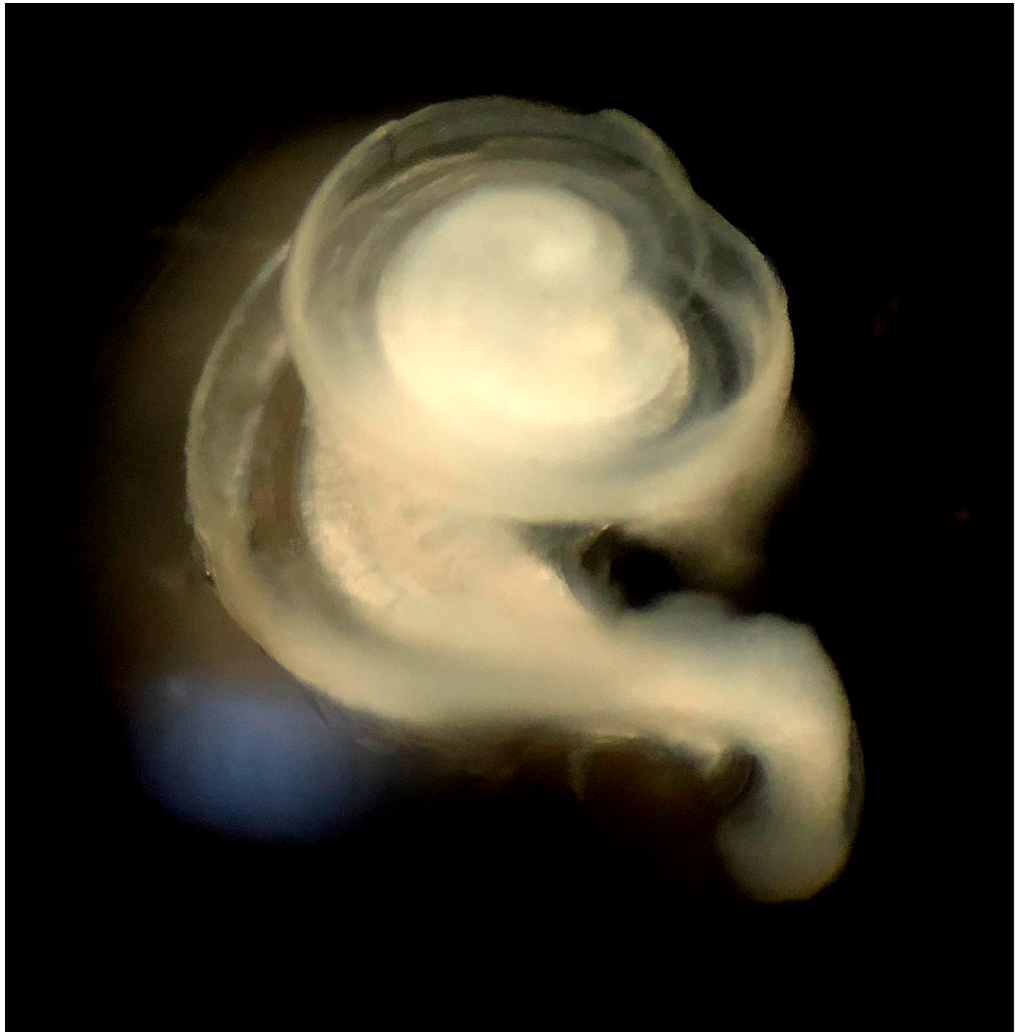


Figura 3. Imagen del caracol membranoso tras su extracción *in toto* de la pared ósea.

## Reconstrucción coclear

Cada una de las secciones cocleares extraídas e inmunoteñidas con ChAT fue fotografiada, en forma de mosaico, con un objetivo de X5 utilizando un microscopio óptico Leica DMRX y una cámara fotográfica acoplada. Las muestras fueron digitalizadas con ayuda del programa informático Neurolucida 8.0 (NL- Vs 8.0, MicroBrightField®, Inc., Williston, VT, United States) para procesarlas posteriormente.

Con las 6 secciones fotografiadas de cada cóclea se realizó una reconstrucción digital de la estructura utilizando el software Canvas (Canvas Draw 5). Para ordenarlas de manera cocleotópica, se tomó como referencia el grosor del órgano de Corti, el cual aumenta progresivamente hacia la zona del ápex, y del haz espiral interno (*inner spiral bundle – ISB*), que aumenta desde el ápex hasta las regiones centrales y vuelve a disminuir a medida que se acerca a la base. Esta reconstrucción nos permitió medir la longitud de cada cóclea trazando una línea a lo largo del ISB que fue medida utilizando la herramienta de perímetro de Canvas.

En la figura 4 de este trabajo se puede observar la reconstrucción digital de las imágenes de las membranas o secciones extraídas que fueron fotografiadas utilizando un microscopio óptico. Se trata de una preparación de superficie de la cóclea de un caso control, la cual ha sido inmunoteñida con ChAT. En esta cóclea, vista desde un plano horizontal, se pueden observar las fibras colinérgicas olivococleares dirigiéndose hacia el órgano de Corti, entrando a través del limbo espiral. Las fibras que forman parte del MOC atraviesan el túnel de Corti y se ramifican antes de hacer contacto con la base de las 3 filas de CCE (figura 4).

Las cócleas reconstruidas permitieron que se pudieran localizar las zonas específicas para determinadas frecuencias dentro de su eje tonotópico. Para ello, se utilizó el plugin “measure\_line”, proporcionado por Eaton-Peabody Laboratories, del software NIH ImageJ 1.53a (EEUU; RRID: SCR\_003070) para el análisis de imágenes. Para llevar a cabo el procedimiento se trazó una línea segmentada a lo largo del ISB de cada una de las 6 secciones cocleares, empezando desde la base hasta el ápex, y se aplicó el plugin el cual, automáticamente y teniendo en cuenta la longitud de la cóclea, situaba las frecuencias dentro del su eje tonotópico (ver detalles del procedimiento en Figura 5).

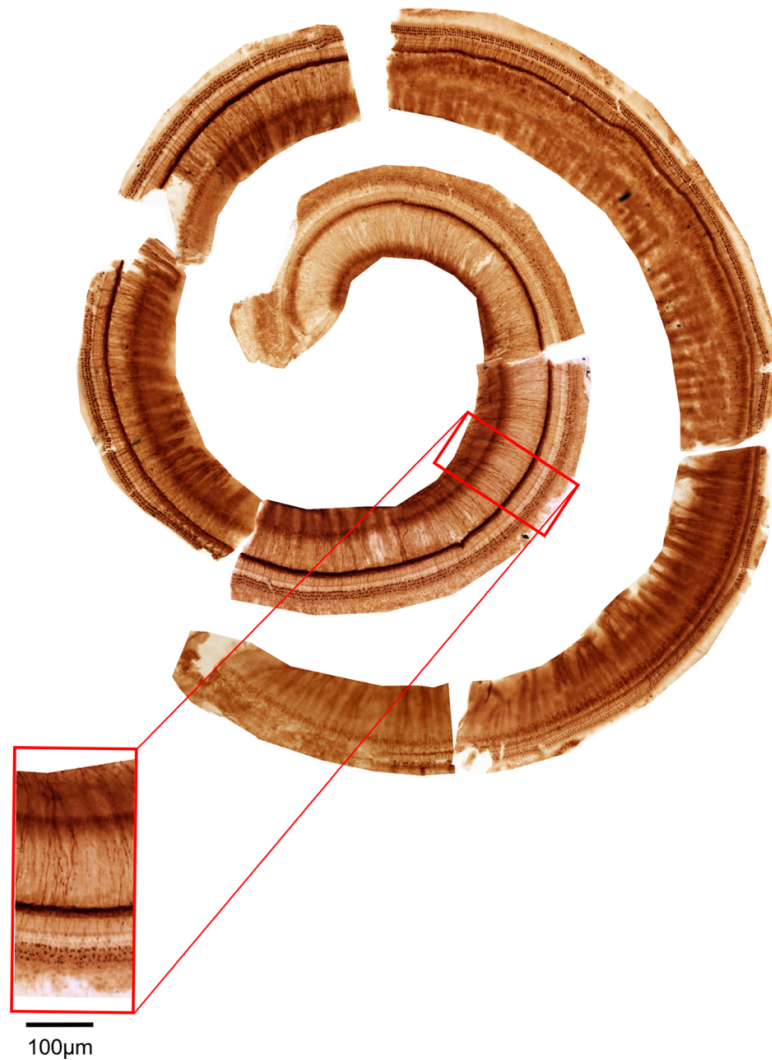


Figura 4. Reconstrucción digital de las preparaciones de superficie de la cóclea de un animal control inmunoteñida para acetilcolintransferasa (ChAT). En el recuadro rojo, abajo a la izquierda, detalle extraído de una sección de esta cóclea donde se pueden apreciar las gruesas fibras colinérgicas entrando en el órgano de Corti a través del limbo espiral, recorriendo el ISB, atravesando el túnel de Corti y contactando con las 3 filas de CCE.

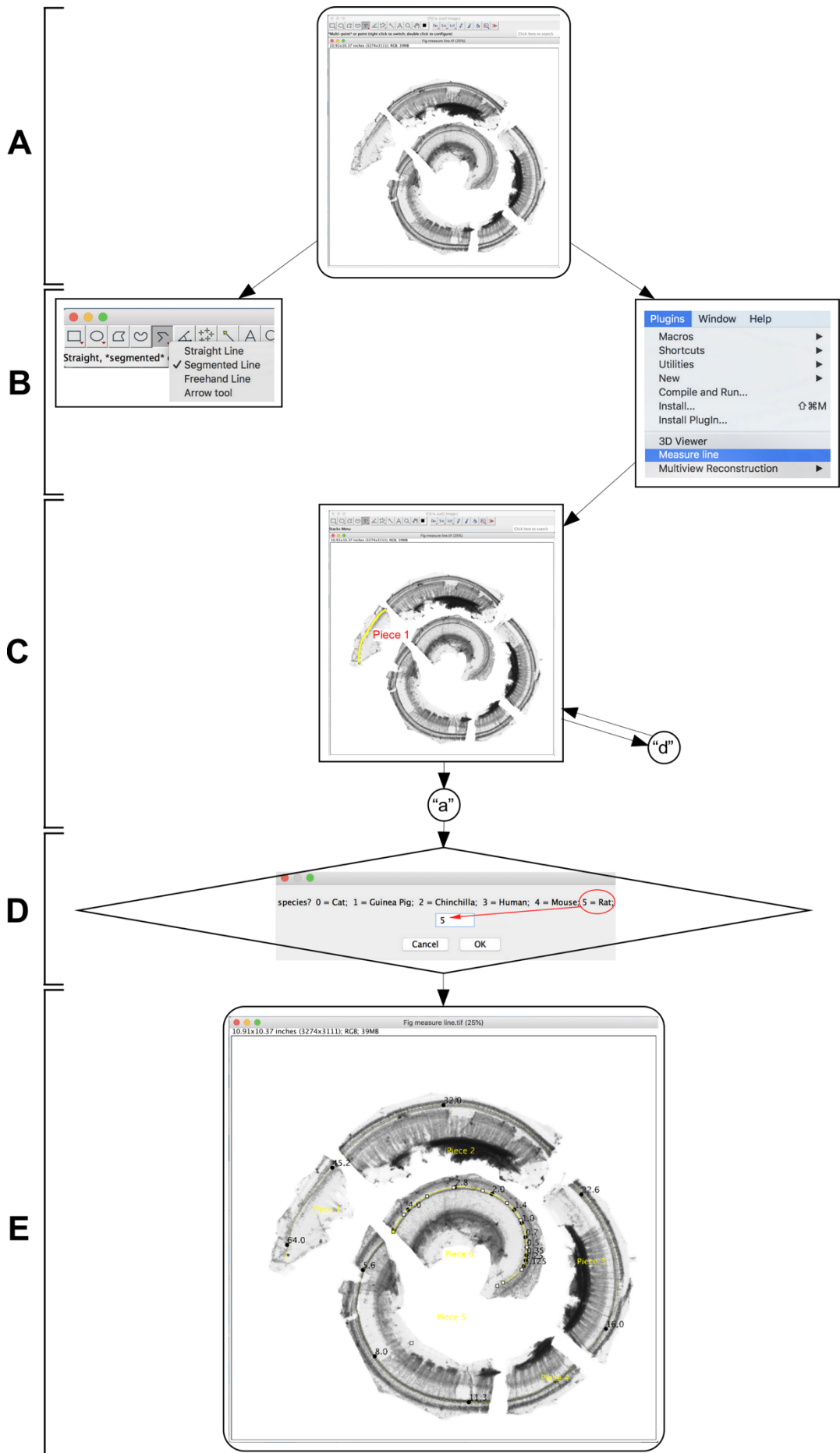


Figura 5. Diagrama que muestra el procedimiento seguido para localizar anatómicamente las regiones de frecuencias en la cóclea utilizando el plugin “measure\_line” de ImageJ. (A) Indica el comienzo del procedimiento con la apertura, en ImageJ, de una imagen digital con las espiras extraídas de la cóclea. (B) Es el primer paso para hacer correr el plugin que sitúa topográficamente las frecuencias en la cóclea. Para ello, se selecciona en ImageJ el tipo de línea segmentada y se abre el plugin “Measure line”. (C) Una vez activado el plugin, empezando siempre por la parte más basal, se traza una línea segmentada sobre la espira basal, y siempre empezando por el extremo más basal, a lo largo del haz espiral interno, haciendo doble clic para finalizar el trazado. A continuación, se presiona la tecla “d” en el teclado y, automáticamente, se establece como pieza de inicio para situar las frecuencias en la cóclea. Este proceso se repetirá sucesivamente con el resto de las espiras hasta terminar en el ápex. Una vez establecidas todas las piezas de la cóclea, se presiona la tecla “a” en el teclado y, (D) aparecerá en el monitor un cuadro de diálogo en el que se muestran varias opciones de animales a las que se asigna un número a cada una. Se pide teclear el número que corresponde con el animal al que pertenece la cóclea en cuestión (en el caso de este trabajo la rata corresponde al número 5). (E) Finalmente, el programa sitúa automáticamente las frecuencias en su lugar correspondiente en la cóclea.



## Análisis cuantitativo de los terminales inmunorreactivos.

Se realizó inmunocitoquímica cuantitativa de las cócleas para estudiar los botones terminales del MOC mediante densitometría y morfometría. Para ello, se seleccionaron 6 niveles topográficos correspondientes a 6 frecuencias dentro de la cóclea (2,8; 8; 11,3; 16; 32 y 45,2 kHz) para su análisis (ver figura 6). A través de microscopio óptico, se fotografiaron, mediante microscopio óptico, las regiones donde se situaban dichas frecuencias empleando un objetivo de X40. Las imágenes fotográficas fueron tomadas utilizando la herramienta de Deep focus, integrada en el software Neurolucida 8.0, realizando una pila de imágenes (stack) de 5 fotografías microscópicas, con intervalos de 1  $\mu\text{m}$ , en el eje Z (figura 7 A y B). El stack comenzó desde su fotografía más superficial, tomando como referencia la profundidad del tejido a partir de la cual comienza a verse la parte superior del botón colinérgico que hace sinapsis con las CCE (figura 7 A). El final de cada stack coincidió con la parte inferior de los botones bajo las 3 filas de CCE (figura 7 B). Al terminar de realizar el stack de microfotografías, las 5 imágenes obtenidas se superpusieron, dando lugar a una sola imagen con la que se trabajó en el análisis morfométrico y densitométrico (Figura 7 C).



Figura 6. Identificación de regiones cocleotópicas tras ser localizadas y situadas en nuestra preparación de superficie reconstruida mediante el procedimiento de “measure\_line”. Las frecuencias seleccionadas para el análisis se encuentran dentro de los rectángulos negros que representan la zona sobre la que se realizaron las microfotografías.

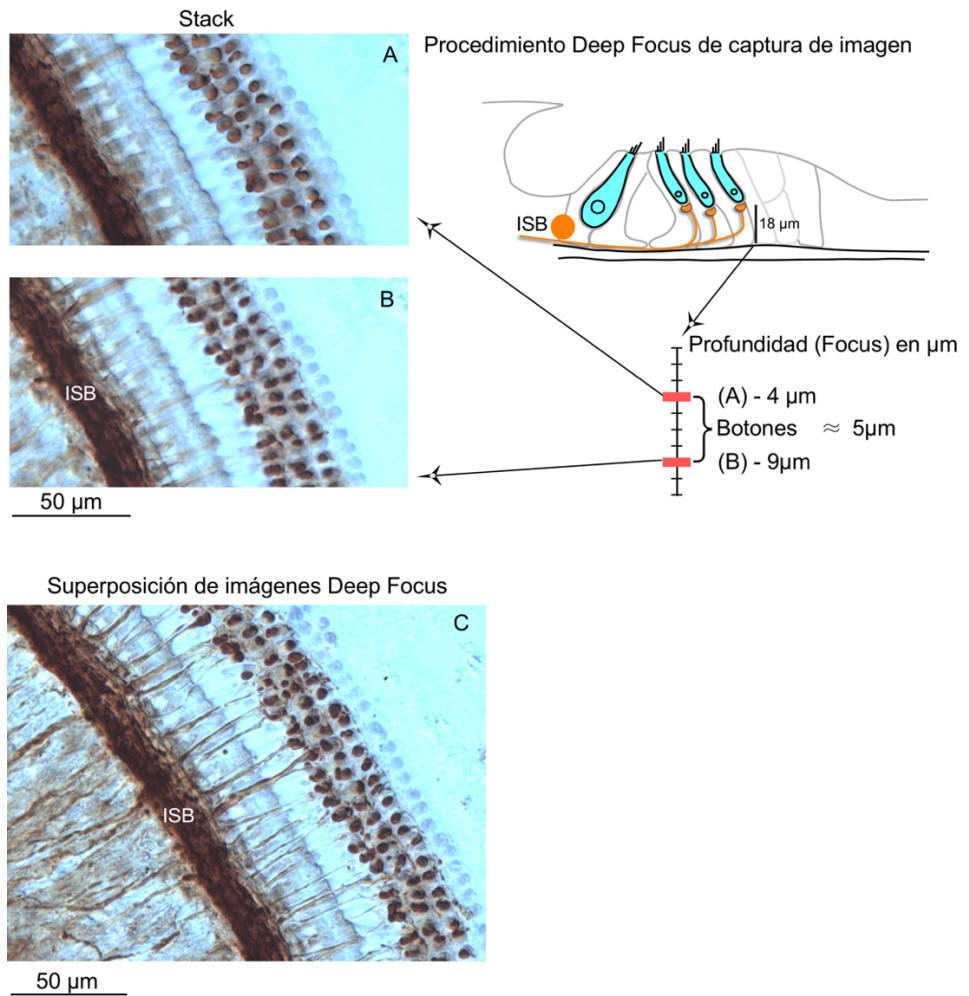


Figura 7. Representación gráfica del método de captura de imágenes de los botones colinérgicos empleando la herramienta de Deep focus (NeuroLucida). (A y B) Captura superior (A) e inferior (B) del stack de 5 microfotografías que, posteriormente, fueron superpuestas. (C) Imagen resultante de la superposición del stack de microfotografías ISB = *inner spiral bundle* o haz espiral interno.

## Morfometría

Para realizar el estudio morfométrico, se evaluaron el tamaño y el número de botones inmunorreactivos del MOC. Las imágenes fueron procesadas empleando el software ImageJ. Primero, fueron convertidas en formato de 8 bit en escala de grises, cuyos valores se sitúan entre 0 y 255, siendo 0 el valor dado al píxel más negro dentro de la imagen, y 255 al más blanco (figura 8 A). Sobre esta imagen, que poseía una resolución digital de 25 píxeles por  $\mu\text{m}^2$  (figura 8 B), establecimos nuestra región de interés (*region of interest - ROI*) para el análisis que se centró en la zona del órgano de Corti que contenía los botones colinérgicos situados bajo las CCE. La ROI fue seleccionada y recortada para analizarla de manera aislada del resto de la imagen (figura 8 C). Para el análisis, en primer lugar, se aplicó una segmentación automática de la densidad inmunorreactiva de los botones, o área terminal basal de las CCE, utilizando el algoritmo “máximo entropía”, proporcionado por el software de ImageJ. Este algoritmo de segmentación selecciona los píxeles más oscuros, correspondientes a los botones terminales, basándose en el gradiente de grises de la imagen, y sería la parte de la imagen que, posteriormente, se analizaría. Para recopilar los datos del tamaño y el número de los botones segmentados, se empleó la herramienta *Analyze particles* de ImageJ. El número de botones de cada imagen fue normalizado en  $10.000 \mu\text{m}^2$  y el tamaño se expresó en  $\mu\text{m}^2$ .

## Densitometría

Antes de capturar las imágenes sobre las frecuencias seleccionadas utilizando Deep focus con el objetivo de X40, empleando para ello las mismas condiciones del microscopio (iluminación, exposición, gamma), se calibraron los valores de gris a los de densidad óptica (DO), con los que se trabajó en el análisis. Debido a que la DO es una magnitud física que mide la absorción de luz que atraviesa un tejido, la calibración se realizó empleando un filtro que contenía una escala de 11 grados de densidad de gris (©Eo Edmund industrial optics—ref 32599, Karlsruhe, Germany). Cada uno de esos 11 grados de gris tenía un valor predeterminado de DO, siendo 1 el valor dado al grado de mayor densidad del filtro y descendiendo en saltos de 0,1 hasta el valor de densidad menor, el cual poseía un valor de 0,04. Se fotografiaron cada uno de los filtros de densidad utilizando las mismas condiciones de cámara que las que se emplearon para la captura de imágenes de las cócleas. De ellas se obtuvo el valor de gris medio correspondiente a cada grado de densidad del filtro que se calibró en valores de DO utilizando ImageJ.

De cada imagen se seleccionaron al azar 30 botones, los cuales formaron parte de nuestra ROI para su análisis densitométrico (figura 8 C). Se segmentaron los botones utilizando el algoritmo “máximo entropía” y se calibraron los valores de gris del filtro con sus correspondientes de DO utilizando la herramienta de calibración de ImageJ. Se seleccionó la función de Rodbar, ya que su curva fue la que más se ajustó a la distribución de los valores de calibración. De esta manera, cada medida de nivel de gris de la imagen nos la transformó en valores de DO. Para obtener la media de DO de cada botón colinérgico analizado se utilizó la herramienta “analyze particles”.

En el análisis densitométrico, la DO determina la cantidad de producto de reacción que posee la muestra. Para el caso de este estudio, los valores de DO nos indican la capacidad de síntesis de acetilcolina, expresada por la cantidad inmunorreactiva de ChAT en los botones colinérgicos. Para minimizar los sesgos producidos en las imágenes obtenidas, debido a posibles oscilaciones de iluminación durante el proceso de captura de imágenes, los valores de DO obtenidos fueron normalizados de la siguiente manera: a la media de la DO de los 30 botones se le resta la media de DO medida en toda la región que contiene las 3 filas de botones y se divide el resultado entre la desviación estándar de la DO de esta última medida.

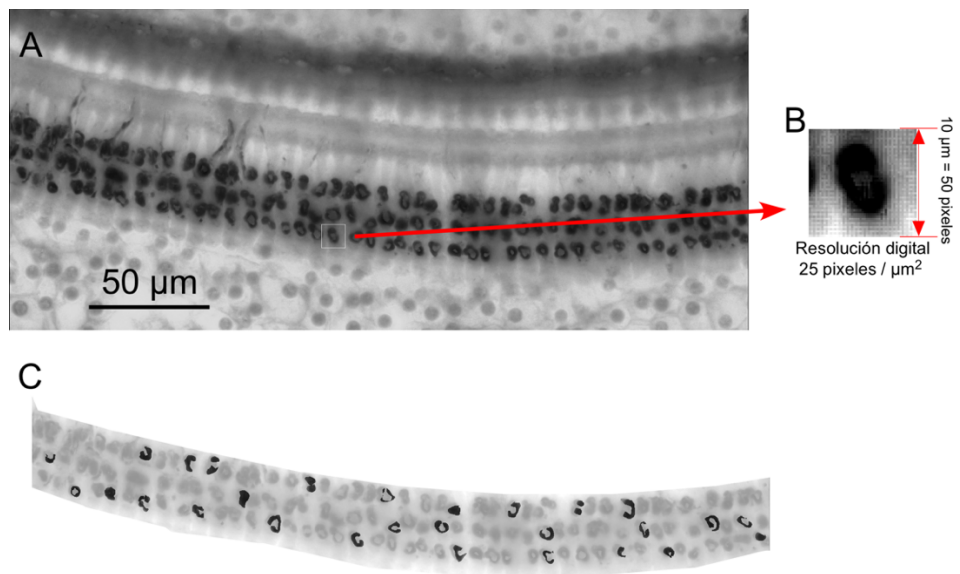


Figura 8. Método de selección de botones colinérgicos para analizar cuantitativamente. (A) es la imagen tomada a microscopio óptico empleando la herramienta Deep Focus. Se pueden apreciar perfectamente las 3 filas de botones inmunorreactivos a ChAT bajo las CCE. (B) Detalle de uno de los botones inmunorreactivos (resolución digital = 25 pixeles por micra cuadrada) que permite realizar un buen análisis de imagen. (C) Botones seleccionados para el análisis. Estos 30 botones fueron recortados de la imagen fotográfica original para un análisis morfométrico y densitométrico empleando el software ImageJ, basándonos en el área para la morfometría y en el gradiente de gris para la densitometría.

## Cuantificación de la respuesta inflamatoria

Para la cuantificación de las células libres procedentes del sistema inmunitario se utilizaron las muestras de tejido inmunoteñidas con ChAT de animales sacrificados 4 días después de la sobreexposición acústica. Se realizó un conteo visual de células inmunopositivas e inmunonegativas detectadas en el tejido. Los valores obtenidos del conteo en cada cóclea se normalizaron sobre una longitud de 1.000  $\mu\text{m}$ .

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los datos obtenidos lo realizamos empleando el software SPSS IBM, versión 25 (IBM Corp. and SPSS Inc., Chicago, IL, United States, RRID:SCR\_002865). Para los registros de ABR, analizamos los umbrales auditivos. En primer lugar, se comprobó el supuesto de normalidad de los datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Tras descartar la distribución normal de los datos, se analizaron las diferencias entre los diferentes momentos de registro dentro de cada grupo empleando la prueba no paramétrica de Friedman. Para encontrar las diferencias entre los registros se realizaron comparaciones dos a dos mediante la prueba de rangos con signos de Wilcoxon. Además, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar las medias de los umbrales entre diferentes grupos para cada momento de registro. Para realizar estos análisis se combinaron los registros de ambos lados (derecho e izquierdo) debido a que no se



encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos para ninguno de los grupos.

Para el análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica, se estudiaron las diferencias entre los grupos en cuanto a DO, número de botones/10.000  $\mu\text{m}^2$  y tamaño de los botones terminales inmunorreactivos a ChAT. Tras comprobar que se cumple el supuesto de normalidad de los datos, se realizó un ANOVA de un factor, seguido de las pruebas post hoc de Bonferroni y Games-Howell correspondientes, con los datos obtenidos del análisis de todas las frecuencias. Se realizó un ANOVA de dos factores para analizar las diferencias entre los grupos por cada frecuencia estudiada. Los resultados descriptivos se expresarán como media  $\pm$  desviación estándar a la significación estadística en las comparaciones. Las gráficas serán representadas por la media  $\pm$  error estándar. El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas se estableció en  $p < 0,05$ .



# RESULTADOS



## **REGISTROS DE POTENCIALES EVOCADOS TRONCOENCEFÁLICOS**

El umbral promedio de los registros controles (día 0 antes del estímulo sonoro) se situó en  $11,66 \pm 1,66$  dB (Figuras 9 y 10). Tras realizar un análisis estadístico de los umbrales entre los diferentes momentos del registro, utilizando la prueba de Friedman, los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo 1 día después de la sobreexposición acústica ( $30 \pm 6,32$  dB,  $p < 0,01$ ) y el día 2 ( $21,66 \pm 4,08$  dB,  $p < 0,05$ ) (Figuras 9 y 10). Sin embargo, el día 7, los umbrales mostraron una tendencia descendente ( $13,33 \pm 5,16$  dB) para alcanzar el día 14 valores prácticamente normales de  $11,66 \pm 4,08$  dB (figuras 9 y 10).

## Morfología de las ondas de ABR

### Grupo TA + 14 días

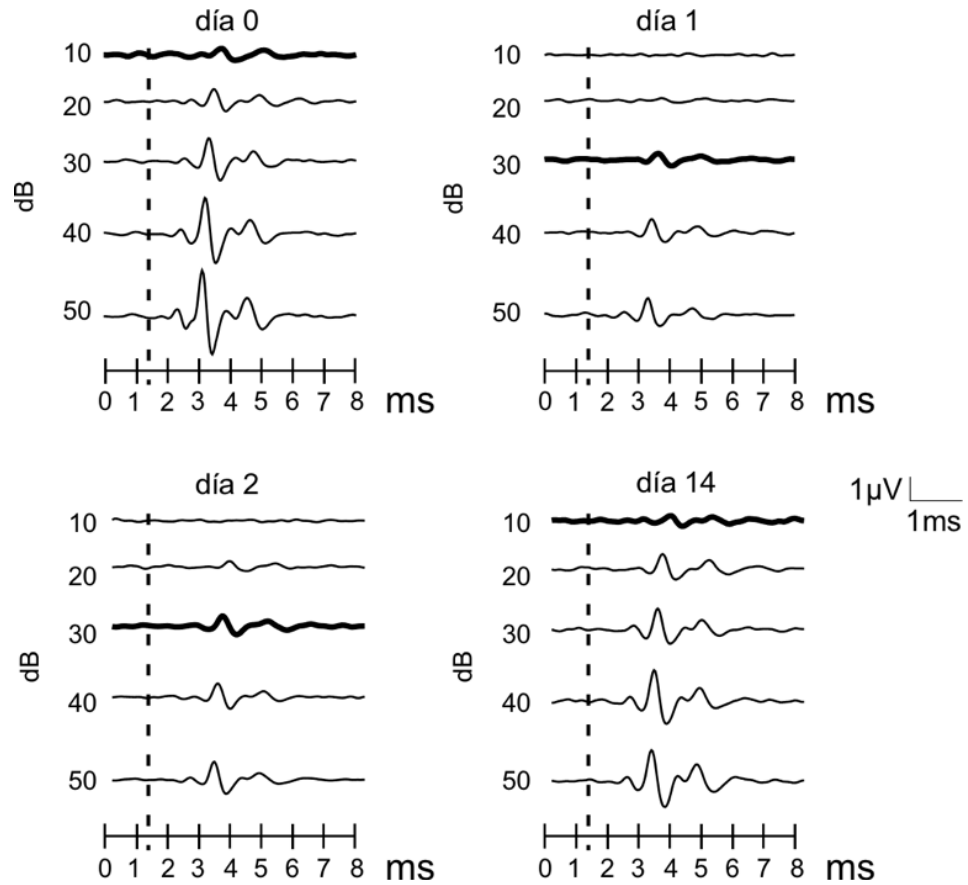


Figura 9. Morfología de ondas promedio obtenidas de los registros de los grupos TA + 1 día (día 0 y 1) y TA + 14 días (día 0, 2 y 14). Las líneas gruesas indican los umbrales de aparición de la primera onda (onda II) en cada registro.

### Evolución temporal del promedio de los umbrales de ABR

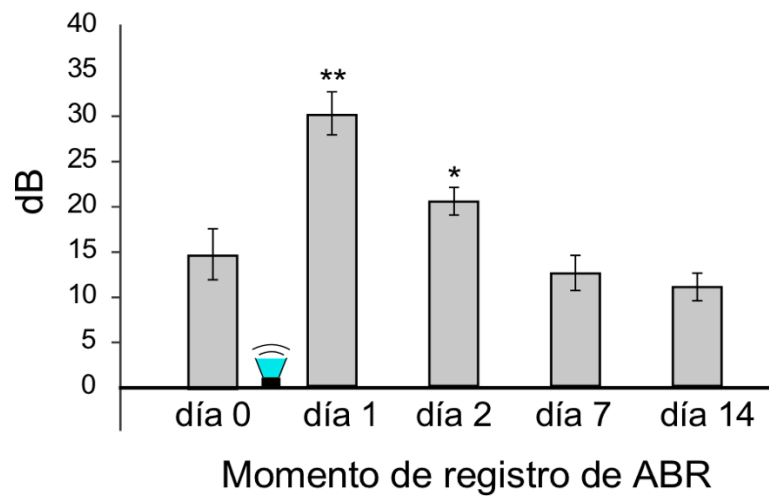


Figura 10. Gráfica de promedio de los umbrales de ABR. Los asteriscos señalan la significación estadística con respecto al registro del día 0, previo a la sobreestimulación acústica (icono del altavoz). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

## **DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES DE SUPERFICIE INMUNOTEÑIDAS CON CHAT.**

Tras la reconstrucción digital de las preparaciones de superficie del órgano de Corti inmunoteñidas con ChAT, como en la figura 4, se pudo medir la longitud del caracol membranoso en su conjunto, dando una media de 8,08  $\pm$  0,79 mm para todos los grupos. En cada una de estas preparaciones de superficie se observan haces de gruesas fibras mielínicas e inmunorreactivas a ChAT cruzando bajo el limbo espiral de Huschke (Figura 11 flecha verde). Se pueden observar también paquetes gruesos de fibras, que siguen un trayecto espiral junto al túnel del Corti, que corresponden al haz espiral interno. Las fibras inmunorreactivas cruzan el túnel de Corti y se dirigen a la región de las CCE donde se ramifican generando botones sinápticos (figura 11 puntas de flecha blancas). Dentro de esta región se puede observar, dependiendo del nivel de la cóclea analizado entre 1 y 4 contactos sinápticos por CCE (figura 12).





Figura 11. Microfotografía realizada sobre una preparación de superficie del órgano de Corti inmunoteñida con ChAT. La flecha verde señala un axón colinérgico atravesando el limbo espiral. Las puntas de flecha señalan botones colinérgicos del MOC.

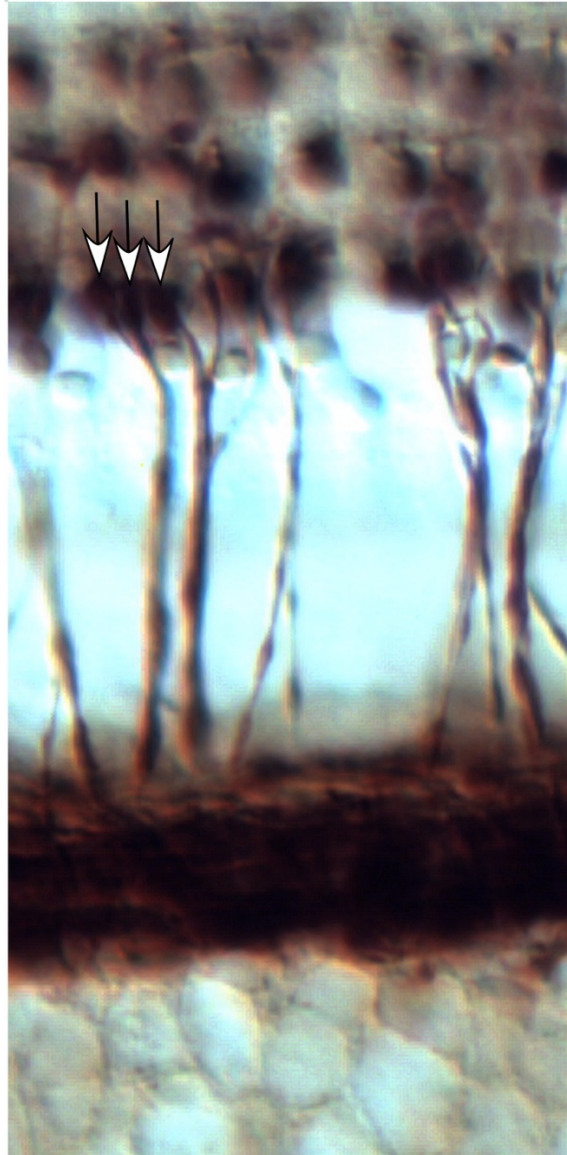


Figura 12. Detalle de la inervación eferente sobre la base de las CCE. Microfotografía tomada mediante técnica de microscopía de contraste de interferencia diferencial donde se aprecian 3 botones colinérgicos (flechas) ocupando la misma región terminal inmunorreactiva.

## **DESCRIPCIÓN DE LOS TERMINALES DENSITOMÉTRICOS EN LOS CASOS CONTROL. MORFOMETRÍA Y DENSITOMETRÍA**

En el extremo apical, en la región de las CCE, se pudo observar una distribución irregular (no lineal ni paralela a las filas de células sensoriales) de los botones inmunorreactivos a ChAT. La distribución se hacía más lineal y regular a medida que se estudia la innervación colinérgica en las regiones cocleotópicas situadas hacia la zona basal (Figura 13 A). El tamaño de los botones inmunorreactivos a ChAT en el grupo control se incrementa progresivamente al comparar el ápex con las regiones medias de la cóclea y disminuye al comparar estas últimas regiones con las más basales. Estas diferencias, que se podían apreciar con facilidad a través del microscopio (figura 13 A), nos obligaron a realizar un análisis por niveles cocleotópicos, con el fin de evaluar de forma comparativa, entre el grupo control y el experimental, los potenciales cambios inducidos por el TA.

Análisis morfométrico de los botones inmunorreactivos.

Al realizar un análisis del tamaño de los botones, comparando los de cada región cocleotópica con sus adyacentes, se pudo comprobar que hay diferencias estadísticamente significativas para todos los niveles cocleares analizados excepto entre las frecuencias 11,3 y 16 kHz (Figura 13 B).

En cuanto al número de botones inmunorreactivos también se observan variaciones entre las diferentes regiones cocleotópicas, registrando un menor número en las zonas apicales, y un aumento en el número en dirección a las regiones basales (Figura 13 C). Las áreas tonotópicas

correspondientes a las frecuencias 2,8 y 8kHz son las que menos número de botones inmunorreactivos mostraron, mientras que la de 32 kHz mostró el mayor número de ellos (figura 13 C).

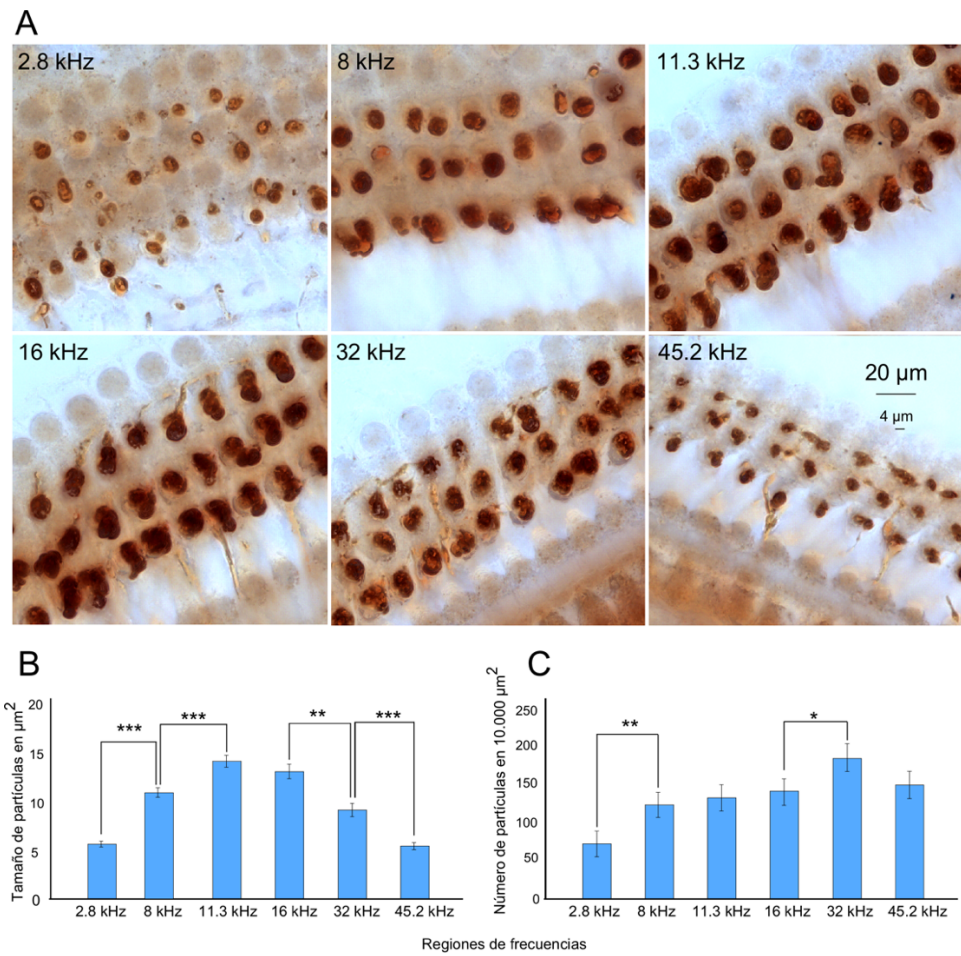


Figura 13. (A) Imágenes de los terminales inmunorreactivos contactando con las bases de las 3 filas de CCE en un caso control. Las microfotografías fueron tomadas sobre diferentes niveles topográficos que corresponden a determinadas regiones cocleotópicas (2,8; 8; 11,3; 16; 32 y 45,2 kHz). (B) Gráfica del tamaño de los botones para cada frecuencia. (C) Gráfica del número de terminales colinérgicos para cada frecuencia. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre regiones cocleotópicas adyacentes. \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## **ANÁLISIS MORFOMÉTRICO Y DENSITOMÉTRICO TRAS TA**

### **Morfometría**

Tras realizar un análisis morfométrico sobre el tamaño de los botones inmunorreactivos en el conjunto de la cóclea reconstruida, el grupo control mostró valores de  $10,00 \pm 4,64 \mu\text{m}^2$ . Se observó un descenso estadísticamente significativo en el tamaño de los botones en TA + 1 día (tamaño =  $8,14 \pm 2,52 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0,01$ ). En TA + 14 días, el tamaño de los botones fue de  $11,36 \pm 3,74 \mu\text{m}^2$ , superando, aunque de manera no significativa ( $p = 0,12$ ), los valores del grupo control (figura 14 A).

### **Densitometría**

El análisis densitométrico mostró valores de DO de  $4,30 \pm 1,25$  en los controles. En el grupo de TA + 1 día se observó una disminución estadísticamente significativa en los valores de DO de los botones inmunorreactivos segmentados (DO =  $3,38 \pm 0,84$ ;  $p < 0,001$ ). Mientras que el grupo TA + 14 mostró valores de  $4,34 \pm 0,69$  similares a los del grupo control ( $p = 1,00$ ) (Figura 14 B).

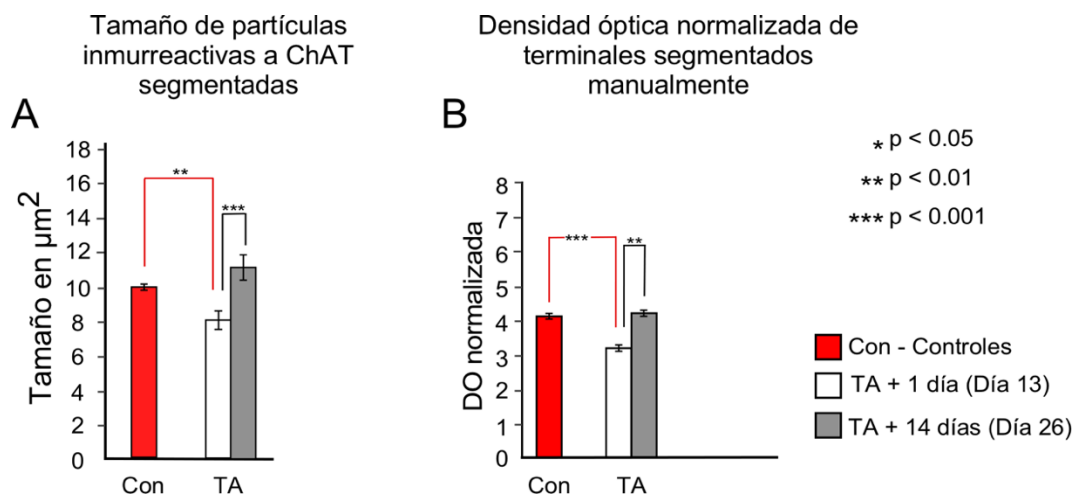


Figura 14. Graficas de tamaño (A) y densidad óptica (B) de los botones colinérgicos antes y después del TA. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

#### Cuantificación de los botones por niveles cocleotópicos

Al analizar morfométricamente los botones inmunorreactivos segmentados por gradientes de densidad, se observó que los que poseían mayor tamaño se encontraban en la región de la frecuencia de 11,3 kHz en el grupo control.

Al representar gráficamente los datos, se pudo apreciar en los controles una clara distribución gaussiana en cuanto al tamaño de los botones, que va en aumento desde las regiones apicales a las intermedias para luego disminuir hacia las regiones basales (figura 15 A – amarillo en control). 1 día después del TA, el tamaño de los botones inmunorreactivos disminuyó en las regiones intermedias de la cóclea, siendo este descenso significativo para la frecuencia 11,3 kHz, observándose una distribución más

platicúrtica o uniforme comparándola con la del grupo control (Figura 15 B – flecha de la columna izquierda). 14 días después del TA, el tamaño de los botones fue similar al del grupo control en las regiones intermedias. Sin embargo, a diferencia del grupo control, el valor máximo de tamaño se observó en la región de 16 kHz (Figura 15 C).

En cuanto a los resultados del análisis densitométrico, el grupo control mostró valores de DO muy semejantes en todos los niveles cocleotópicos, no observándose diferencias estadísticamente significativas al comparar cada uno de estos valores con los de sus áreas tonotópicas adyacentes (Figura 15 D). Sin embargo, 1 día después del TA disminuyeron los valores de DO en las frecuencias intermedias, siendo este descenso estadísticamente significativo en las regiones de 8 y 32 kHz (Figura 15 E – flechas de la columna derecha). 14 días después del TA los valores de DO fueron similares a los del grupo control a pesar de persistir un ligero descenso, aunque no estadísticamente significativo, en las regiones intermedias (Figura 15 F).



**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE TAMAÑO Y DENSIDAD ÓPTICA SOBRE LOS DATOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES PARA CADA FRECUENCIA**

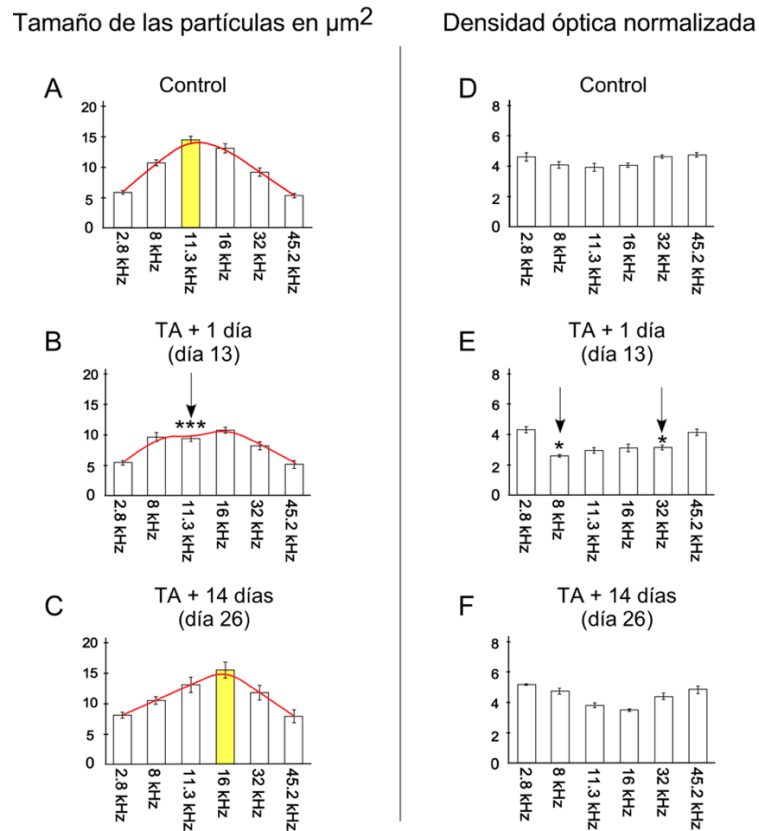
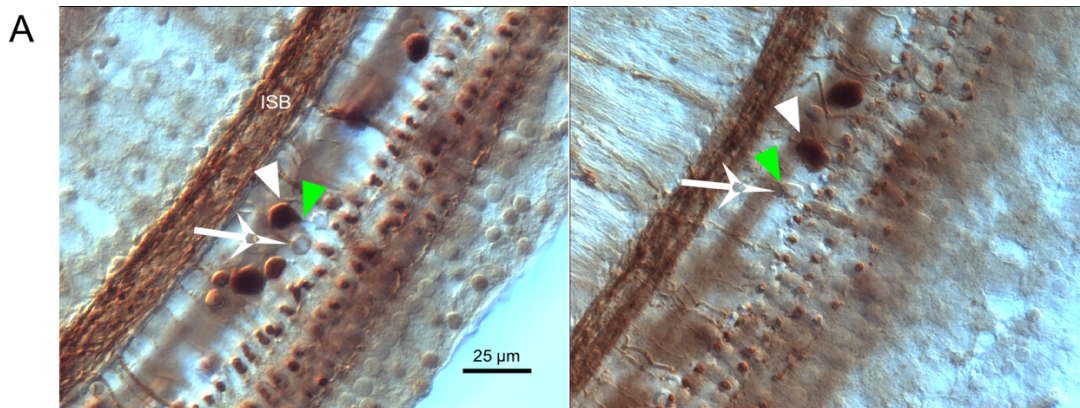


Figura 15. Gráficas del tamaño y DO normalizada de los análisis de los botones colinérgicos realizados en las distintas frecuencias a lo largo de la cóclea. (A-C) Tamaño de los botones en los grupos control (A), TA + 1 día (B) y TA + 14 días (C). La línea roja trazada en la gráfica de la figura 10 muestra una distribución gaussiana de los valores del tamaño de los botones inmunorreactivos desde el ápex hasta la base de la cóclea. La barra amarilla indica la frecuencia en la que los botones colinérgicos son de mayor tamaño. (D-F) Densidad óptica normalizada de los botones en los grupos control (D), TA + 1 día (E) y TA + 14 días (F). Las flechas indican las diferencias estadísticamente significativas para cada frecuencia comparadas con la correspondiente del grupo control. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA CÓCLEA

El uso de ChAT para la inmunocitoquímica de las cócleas mostró la existencia de células libres inmunopositivas pero también inmunonegativas (observadas por contraste interferencial) localizadas a lo largo del órgano de Corti. Se encontraron células tanto a nivel de la membrana basilar como en la base de las CCE. La mayor parte de ellas se observaron en el túnel de Corti (figura 16 A). Ambos tipos de células (inmunorreactivas y no inmunorreactivas a ChAT) tienen aspecto esférico con expansiones filamentosas citoplasmáticas o filopodios (figura 16 A – puntas de flecha verdes). Las células libres inmunorreactivas a ChAT poseían un tamaño de entre 5 y 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (figura 16 A – puntas de flecha blancas). Las células no inmunorreactivas fueron generalmente más pequeñas con tamaños de entre 5 y 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (figura 16 A – flechas blancas). Tras realizar un conteo global de ambos tipos de células, se observó que 1 día después del TA se produce un aumento en el número total de células mientras que 14 días después del TA los valores disminuyeron hasta valores próximos al control.

Al contar por separado, células libres inmunorreactivas y no inmurreactivas, se comprobó que el número de las segundas duplicó al de las primeras en el grupo control (Figura 16 B). Sin embargo, 1 día después del TA aumentaron hasta 11 y 4 veces el número de células inmunopositivas e inmunonegativas respectivamente. 14 días después del TA el número de células inmunorreactivas es 7 veces mayor mientras que las no inmunorreactivas fueron la mitad, en comparación con el grupo control (figura 16 B).



### Células inflamatorias

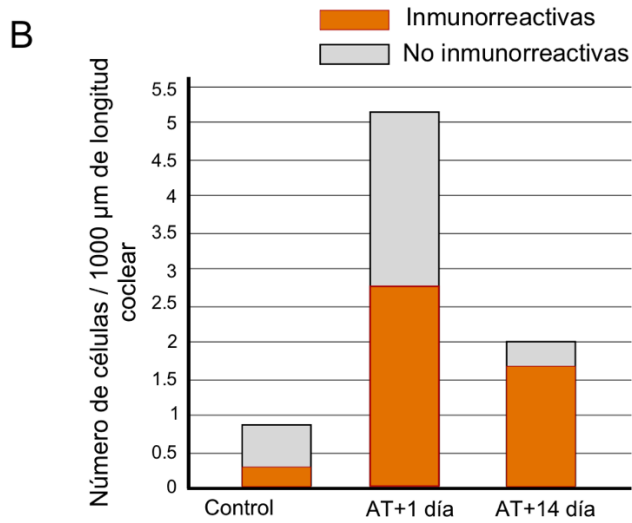


Figura 16. (A) Microfotografías donde se pueden observar células libres inmunorreactivas (puntas de flecha blancas) y no inmunorreactivas (flechas) a ChAT en el órgano de Corti. (B) Resultado del conteo de estas células antes y después del TA.



# DISCUSIÓN



En este trabajo de tesis doctoral se ha estudiado la evolución temporal de los cambios anatómicos producidos sobre los botones colinérgicos del MOC inducidos por un TA producido tras la exposición a un ruido de banda (8-16 kHz) de alta intensidad (107 dB SPL) durante 90 minutos. Los registros de ABR mostraron una subida sustancial de umbral auditivo 24 horas después del TA que se recuperó 14 días después. Los análisis morfométricos y densitométricos realizados sobre las preparaciones de superficie del órgano de Corti inmunoteñidas con ChAT mostraron una reducción en los valores de tamaño y de DO de los botones colinérgicos un día después del TA mostrando valores normales el grupo analizado a 14 días. Al evaluar estas variaciones por áreas de diferente tonotopía, los resultados mostraron que los cambios producidos en el tamaño de los botones y la DO se produjeron sobre todo en las regiones de frecuencias intermedias.

## **VALIDACIÓN DEL MODELO DE TTS**

El protocolo de sobreestimulación acústica utilizado por nosotros (ruido de entre 8-16 kHz a 107 dB SPL durante 90 min) generó un cambio de umbral auditivo 1 día después del TA detectándose aumentos significativos de 20 dB. Posteriormente, a los 2 días, los umbrales siguieron una tendencia a recuperarse y a los 14 se observaron unos umbrales auditivos normales indicando, por ello, que se trata de un modelo de TTS. Nuestros resultados son compatibles con los observados en ratas sometidas a un ruido de banda de entre 8 y 16 kHz, a 106 dB SPL durante dos horas, donde se encontró un aumento de umbral de entre 20 y 25 dB un día después, en frecuencias superiores a 16 kHz y una recuperación total de umbrales a las 2 semanas

(Lobarinas et al., 2017). Salvando las diferencias entre especies, nuestros datos también son compatibles con registros en ratones a los que se sobreexpuso a un ruido de 8-16 kHz, a 100 dB SPL durante dos horas, en los que se producía, dentro del rango de frecuencias que componen el ruido, un aumento de umbral de 20 dB un día después y una recuperación a los 14 días (Kujawa y Liberman, 2009).

## **INMUNOCITOQUÍMICA CUANTITATIVA PARA CHAT EN LOS TERMINALES COLINÉRGICOS DEL MOC**

En nuestros resultados se observa un descenso en el tamaño y la DO de los botones colinérgicos al cuantificar morfométrica y densitométricamente los terminales inmunorreactivos a ChAT en todas las regiones cocleotópicas un día después de la exposición al ruido. En estudios inmunocitoquímicos realizados por otros autores tras someter a los animales a una sobreexposición acústica, se mostró un descenso agudo en la actividad de la AChE en la región de las células CCE en cócleas de cobayas (Mounier-Kuhn y Haguenauer, 1967) y chinchillas (Kokko-Cunningham y Ades, 1976). Las variaciones morfométricas observadas por nosotros se podrían, por lo tanto, interpretar como el efecto de una depleción de los botones colinérgicos consecuente con la sobreestimulación acústica. Varios autores han demostrado previamente que las neuronas que forman el MOC se activan por el ruido (Brown et al., 2003; Brown, 2009; Miranda y Aguilar-Vidal, 2021), y en consecuencia la actividad colinérgica en sus terminales se vería incrementada.



Para la síntesis de ACh en los terminales presinápticos por parte de la ChAT, se requiere de la recaptación de la colina, generada tras la hidroxilación de la ACh por parte de la AChE, un proceso que demora la nueva síntesis del neurotransmisor (Leventer y Rowell, 1984). En resumen, con la sobreexposición acústica se incrementa la liberación de ACh por parte de las neuronas MOC. De esta manera, la sobreexposición al ruido genera un mayor flujo de ACh al espacio sináptico actuando sobre los receptores colinérgicos de las CCE. La ACh restante es hidrolizada por la AChE, rompiendo la molécula en colina y acetato. La colina es devuelta al terminal sináptico gracias a los transportadores de colina CHT1, situados en la membrana del terminal presináptico, para su reciclaje (Misawa et al., 2001; Lips et al., 2002; Bergeron et al., 2005). Debido a que ChAT interviene en la síntesis de ACh a través de la unión de la colina reciclada y el acetil-CoA procedente del ciclo de Krebs. Los resultados observados 1 día después de la sobreexposición acústica sugieren un desequilibrio en el balance de síntesis y liberación de ACh que se ve reflejado en una disminución de la enzima y, por tanto, del tamaño de los botones, así como una menor densidad del producto de reacción a consecuencia de un retraso para compensar las demandas en la síntesis de ChAT. Esta idea se apoyaría en trabajos publicados por otros autores donde se estableció una alta correlación entre los niveles de ChAT y ACh en en diferentes zonas del sistema nervioso (Mitchell y Silver, 1963; Fonnum y Malthe-Sørenssen, 1972). 14 días después de la exposición al ruido, cuando los umbrales se recuperaron por completo, los valores, tanto de tamaño como de DO, volvieron a ser similares a los del grupo control, lo que

sugiere, además, una recuperación de la actividad sináptica colinérgica del MOC.

## **ANÁLISIS COCLEOTÓPICO**

Al realizar un análisis cocleotópico, los resultados morfométricos mostraron un descenso en el tamaño de los botones colinérgicos 1 día después del TA en las regiones intermedias del caracol membranoso. El ruido que se ha utilizado en este estudio para provocar un TTS comprende las frecuencias 8-16 kHz a una intensidad de 107 dB SPL. Este mismo rango de frecuencias fue el que usaron Lobarinas et al. (2017) para su modelo de TTS sobre el que se produjo una recuperación de umbrales en las frecuencias que componen el estímulo acústico del TA. En nuestro estudio, la recuperación del tamaño de los botones 14 días después del TA fue notable para las frecuencias de 16, 32 y 45,2 kHz, con valores incluso superiores, aunque no significativamente, a los de las cócleas control. Si en el grupo control los botones sinápticos tenían un mayor tamaño en la frecuencia de 11 kHz, 14 días después de la sobreexposición acústica, los botones más grandes se encontraron en la frecuencia de 16 kHz. Estas variaciones pueden deberse al origen de un efecto residual que repercute en el sistema tonotópico de la cóclea.

En cuanto al análisis densitométrico, los resultados muestran un descenso en la inmunorreactividad a ChAT 24 horas después del TA en regiones cocleotópicas intermedias. Las medidas de DO óptica registradas indican la cantidad de ChAT en los terminales eferentes. Indirectamente,

también nos aporta información acerca del balance de síntesis y liberación de ACh en cada región analizada. La disminución de la DO en TA + 1 día en las regiones intermedias de la cóclea es significativa para las frecuencias de 8 y 32 kHz.

El TA utilizado en nuestro estudio es bilateral por lo que estas fibras fueron activadas para ambas cócleas. Según un estudio realizado en gatos, las fibras cruzadas del MOC actúan sobre las regiones cocleotópicas que comprenden la banda del ruido usada para el TA, mejorando la sensibilidad auditiva para esas frecuencias en el TTS y empeorando en las regiones situadas por encima de ellas (Rajan, 2001). Al predominar la inervación cruzada sobre la no cruzada del MOC (Guinan et al., 1983), la disminución de la DO obtenida en nuestro análisis cocleotópico, en el cual se vieron afectadas las regiones intermedias 1 día después del TA, puede ser explicada por una sobreactivación del MOC cruzado como consecuencia de la sobreexposición acústica. Esta sobreactivación produciría mayor actividad colinérgica en las regiones cocleotópicas intermedias, que componen la banda del ruido (8 - 16 kHz). En los resultados mostrados 1 día después del TA, tanto el tamaño de los botones como los valores de DO, disminuyen sobretodo en los niveles cocleotópicos intermedios, lo que sugiere una mayor liberación de ACh en estas regiones cocleares. 14 días después del TA, la actividad colinérgica volvió a su estado normal con los umbrales auditivos recuperados. Este efecto refleja una recuperación del ritmo de reciclado de ACh con valores de DO normales en los terminales del MOC.

## **RESPUESTA INFLAMATORIA DE LA CÓCLEA**

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral mostraron una respuesta inflamatoria tanto en el grupo control como en los de TA + 1 día y TA + 14 días. En estos grupos se encontraron células libres inflamatorias, inmunopositivas e inmunonegativas a ChAT. La respuesta inflamatoria en el órgano de Corti tras un TA ya se había descrito tanto para modelos de TTS (Frye et al., 2018; Shin et al., 2019) como de PTS (Hirose et al., 2005; Tan et al., 2008). En nuestro trabajo, encontramos que el número de células libres incrementó en el grupo de TA + 1 día. Este aumento coincidió con la subida de umbrales tras la exposición acústica. En el grupo de TA + 14 días se produce una recuperación total de umbrales mientras que el número de células se recupera parcialmente.

Ya en estudios clásicos se describieron los monocitos como células migratorias inmaduras de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, de origen es vascular y que, en respuesta a un estímulo inflamatorio, atraviesan las paredes capilares para entrar en el tejido dando lugar a la formación de macrófagos, más grandes (de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro) y de forma más compleja que los monocitos (Ebert y Florey, 1939; Bennett y Cohn, 1966). Esto nos permitió catalogar a las células más pequeñas y no inmunorreactivas a ChAT como monocitos y las más grandes e inmunorreactivas como macrófagos. Tras exponer a un grupo de cobayos a un ruido de 120 dB durante más de 20 minutos, se encontraron macrófagos fagocíticos en las regiones de las CCE y el túnel de Corti donde se produjo una mayor lesión de tejido coclear (Fredelius y Rask-Andersen, 1990). En este mismo estudio también se encontraron monocitos cerca del vaso espiral junto a la escala timpánica

(Fredelius y Rask-Andersen, 1990). Los autores sugieren que los monocitos se comportan como células residentes en la membrana basilar que migran hacia el epitelio sensorial tras producirse un daño coclear. Por tanto, la aparición de monocitos en nuestro trabajo nos estaría indicando el estado de la respuesta inflamatoria.

Los macrófagos encontrados en nuestro trabajo eran inmunorreactivos a ChAT y poseían un tamaño de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro. De ellos se podían diferenciar unas prolongaciones citoplasmáticas filamentosas semejantes a filopodios. La posición de estas células dentro de un eje z se determinó gracias al empleo de la técnica de Deep Focus para la captura de imágenes. Fueron observados a nivel de los axones colinérgicos que atraviesan el túnel de Corti y de los botones terminales que contactan con la base de las CCE. Debido a que los macrófagos actúan en procesos metabólicos y apoptóticos (Yang et al., 2015, 2016), relacionamos a estas células con la limpieza de desechos sinápticos y la pérdida de inmunoreactividad en los terminales colinérgicos.

Lo que encontramos en TA + 1 día es un aumento en el número de monocitos y de macrófagos en la cóclea, lo que nos indica el desarrollo de una respuesta inflamatoria inducida por el ruido. Esta reacción venía acompañada de una reducción en el área sináptica eferente de las CCE, determinada por el tamaño de los botones, y de la inmunorreactividad para ChAT. Esto nos sugirió la aparición de un fenómeno de ablación de botones terminales. Apoyándonos en estudios publicados por otros autores, este fenómeno, realizado también por células microgliales, es considerado como

un mecanismo de plasticidad y de regulación de las conexiones sinápticas (Andoh et al., 2019). Se ha descrito que este tipo de amputación de botones terminales ocurre en diferentes enfermedades neurológicas como el Parkinson, el Alzheimer (Hong et al., 2016) o la esquizofrenia (Sellgren et al., 2019). En TA + 14 días, el número de macrófagos es menor con respecto a TA + 1 día mientras que los botones volvieron a tener un tamaño semejante a los del grupo control. El número de monocitos es menor sustancialmente, llegando incluso a valores por debajo del grupo control, lo que nos sugiere el final del proceso inflamatorio

# **CONCLUSIONES**





- El trauma acústico reversible no produce pérdidas significativas de botones colinérgicos en las células ciliadas externas del órgano de Corti en la rata.
- Como consecuencia del trauma acústico reversible (TTS), se produce un aumento de liberación de acetilcolina en los terminales del haz olivococlear medial del órgano de Corti, no compensado por la síntesis. La neurotransmisión colinérgica se estabiliza tras la recuperación de los umbrales.
- El trauma acústico afecta preferentemente a los botones colinérgicos de las regiones cocleares correspondientes a la banda de frecuencias del estímulo acústico.
- La respuesta inflamatoria inducida por un trauma acústico reversible tiende a disminuir según se recuperan los umbrales auditivos.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Altschuler, R. A., Kachar, B., Rubio, J. A., Parakkal, M. H., and Fex, J. (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res.* doi:10.1016/0006-8993(85)90242-2.
- Andoh, M., Ikegaya, Y., and Koyama, R. (2019). Synaptic Pruning by Microglia in Epilepsy. *J. Clin. Med.* doi:10.3390/jcm8122170.
- Arlinger, S. (2003). Negative consequences of uncorrected hearing loss—a review. *Int. J. Audiol.* doi:10.3109/14992020309074639.
- Aschoff, A., and Ostwald, J. (1988). Distribution of cochlear efferents and olivo-collicular neurons in the brainstem of rat and guinea pig. *Exp. Brain Res.* doi:10.1007/bf00247484.
- Ashmore, J. (2008). Cochlear outer hair cell motility. *Physiol. Rev.* doi:10.1152/physrev.00044.2006.
- Basner, M., Babisch, W., Davis, A., Brink, M., Clark, C., Janssen, S., et al. (2014). Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet.* doi:10.1016/S0140-6736(13)61613-X.
- Bennett, W. E., and Cohn, Z. A. (1966). The isolation and selected properties of blood monocytes. *J. Exp. Med.* doi:10.1084/jem.123.1.145.
- Bergeron, A. L., Schrader, A., Yang, D., Osman, A. A., and Simmons, D. D. (2005). The final stage of cholinergic differentiation occurs below inner hair cells during development of the rodent cochlea. *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.* doi:10.1007/s10162-005-0018-3.
- Blanchet, C., Eróstegui, C., Sugasawa, M., and Dulon, D. (1996). Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: Its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.16-08-02574.1996.
- Boero, L. E., Castagna, V. C., Di Guilmi, M. N., Goutman, J. D., Elgoyhen, A. B., and Gómez-Casati, M. E. (2018). Enhancement of the medial olivocochlear system prevents hidden hearing loss. *J. Neurosci.* 38, 7440–7451. doi:10.1523/JNEUROSCI.0363-18.2018.
- Brown, M. C. (2009). “Auditory System: Efferent Systems to the Auditory Periphery,” in *Encyclopedia of Neuroscience* doi:10.1016/B978-008045046-9.00248-5.
- Brown, M. C., De Venecia, R. K., and Guinan, J. J. (2003). Responses of medial olivocochlear neurons: Specifying the central pathways of the medial olivocochlear reflex. *Experimental Brain Research.* doi:10.1007/s00221-003-1679-y.
- Brown, M. C., and Levine, J. L. (2008). Dendrites of medial olivocochlear

- neurons in mouse. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.12.045.
- Brown, M. C., Mukerji, S., Drottar, M., Windsor, A. M., and Lee, D. J. (2013). Identification of inputs to olivocochlear neurons using transneuronal labeling with pseudorabies virus (PRV). *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.* doi:10.1007/s10162-013-0400-5.
- Cadenas, L. T., Fischl, M. J., and Weisz, C. J. C. (2020). Synaptic inhibition of medial olivocochlear efferent neurons by neurons of the medial nucleus of the trapezoid body. *J. Neurosci.* 40, 509–525. doi:10.1523/JNEUROSCI.1288-19.2019.
- Cai, Q., Vethanayagam, R. R., Yang, S., Bard, J., Jamison, J., Cartwright, D., et al. (2014). Molecular profile of cochlear immunity in the resident cells of the organ of Corti. *J. Neuroinflammation*. doi:10.1186/s12974-014-0173-8.
- Churchill, J. A., and Schuknecht, H. F. (1959). The relationship of acetylcholinesterase in the cochlea to the olivocochlear bundle. *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* Vol. 7 : No. 3 , 202-210. Available at: <https://scholarlycommons.henryford.com/hfhmedjournal/vol7/iss3/9>
- Churchill, J. A., Schuknecht, H. F., and Doran, R. (1956). Acetylcholinesterase activity in the cochlea. *Laryngoscope*. doi:10.1288/00005537-195601000-00001.
- Cooper, N. P., and Guinan, J. J. (2006). Efferent-mediated control of basilar membrane motion. *J. Physiol.* doi:10.1113/jphysiol.2006.114991.
- Coyat, C., Cazevielle, C., Baudoux, V., Larroze-Chicot, P., Caumes, B., and Gonzalez-Gonzalez, S. (2019). Morphological consequences of acoustic trauma on cochlear hair cells and the auditory nerve. *Int. J. Neurosci.* doi:10.1080/00207454.2018.1552693.
- Dallos, P., He, D. Z. Z., Lin, X., Sziklai, I., Mehta, S., and Evans, B. N. (1997). Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.17-06-02212.1997.
- Daniel, E. (2007). Noise and hearing loss: A review. *J. Sch. Health.* doi:10.1111/j.1746-1561.2007.00197.x.
- Darrow, K. N., Benson, T. E., and Brown, M. C. (2012). Planar multipolar cells in the cochlear nucleus project to medial olivocochlear neurons in mouse. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.22797.
- Darrow, K. N., Maison, S. F., and Liberman, M. C. (2007). NIH Public Access. 9, 1474–1476.
- Delacroix, L., and Malgrange, B. (2015). Cochlear afferent innervation

- development. *Hear. Res.* 330, 157–169.  
doi:10.1016/j.heares.2015.07.015.
- Desmedt, J. E., and Monaco, P. (1961). Mode of action of the efferent olivocochlear bundle on the inner ear. *Nature*. doi:10.1038/1921263a0.
- Ebert, R. H., and Florey, H. W. (1939). The Extravascular Development of the Monocyte Observed In vivo. *Br. J. Exp. Pathol.*
- Eckenstein, F., and Sofroniew, M. V. (1983). Identification of central cholinergic neurons containing both choline acetyltransferase and acetylcholinesterase and of central neurons containing only acetylcholinesterase. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.03-11-02286.1983.
- Elgoyhen, a B., Vetter, D. E., Katz, E., Rothlin, C. V, Heinemann, S. F., and Boulter, J. (2001). Alpha10: a Determinant of Nicotinic Cholinergic Receptor Function in Mammalian Vestibular and Cochlear Mechanosensory Hair Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3501–6. doi:10.1073/pnas.051622798.
- Elgoyhen, A. B., Johnson, D. S., Boulter, J., Vetter, D. E., and Heinemann, S. (1994).  $\alpha 9$ : An acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*. doi:10.1016/0092-8674(94)90555-X.
- Elgueda, D., Delano, P. H., and Robles, L. (2011). Effects of electrical stimulation of olivocochlear fibers in cochlear potentials in the chinchilla. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 12, 317–27. doi:10.1007/s10162-011-0260-9.
- Eybalin, M., and Pujol, R. (1987). Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. *Exp. Brain Res.* doi:10.1007/BF00236298.
- Feliciano, M., Saldana, E., and Mugnaini, E. (1995). Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemniscal regions, superior olivary complex and cochlear nuclei. *Audit. Neurosci.*
- Fernandez, K. A., Guo, D., Micucci, S., De Gruttola, V., Liberman, M. C., and Kujawa, S. G. (2020). Noise-induced Cochlear Synaptopathy with and Without Sensory Cell Loss. *Neuroscience* 427, 43–57. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.11.051.
- Fonnum, F., and Malthe-Sørensen, D. (1972). Molecular Properties of Choline Acetyltransferase and Their Importance for the Compartmentation of Acetylcholine Synthesis. *Prog. Brain Res.*

- doi:10.1016/S0079-6123(08)62505-4.
- Fredelius, L., and Rask-Andersen, H. (1990). The role of macrophages in the disposal of degeneration products within the organ of corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol.* 109, 76–82.  
doi:10.3109/00016489009107417.
- Frye, M. D., Ryan, A. F., and Kurabi, A. (2019). Inflammation associated with noise-induced hearing loss. *J. Acoust. Soc. Am.* 146, 4020–4032.  
doi:10.1121/1.5132545.
- Frye, M. D., Zhang, C., and Hu, B. H. (2018). Lower level noise exposure that produces only TTS modulates the immune homeostasis of cochlear macrophages. *J. Neuroimmunol.* doi:10.1016/j.jneuroim.2018.06.019.
- Fuente, A. (2015). The olivocochlear system and protection from acoustic trauma: A mini literature review. *Front. Syst. Neurosci.* 9, 1–6.  
doi:10.3389/fnsys.2015.00094.
- Galambos, R. (1956). Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J. Neurophysiol.* 19, 424–37.
- Godfrey, D. A., Krzanowski, J. J., and Matschinsky, F. M. (1976). Activities of enzymes of the cholinergic system in the guinea pig cochlea. *J. Histochem. Cytochem.* doi:10.1177/24.2.1254944.
- Guinan, J. J. (2006). Olivocochlear efferents: Anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hear.* 27, 589–607. doi:10.1097/01.aud.0000240507.83072.e7.
- Guinan, J. J., Warr, W. B., and Norris, B. E. (1983). Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.902210310.
- Handrock, M., and Zeisberg, J. (1982). The influence of the efferent system on adaptation, temporary and permanent threshold shift. *Arch. Otorhinolaryngol.* doi:10.1007/BF00453630.
- Harris, J. P., and Ryan, A. F. (1984). Immunobiology of the inner ear. *Am. J. Otolaryngol. Neck Med. Surg.* doi:10.1016/S0196-0709(84)80059-9.
- He, W., Yu, J., Sun, Y., and Kong, W. (2020). Macrophages in noise-exposed cochlea: Changes, regulation and the potential role. *Aging Dis.* 11, 191–199. doi:10.14336/AD.2019.0723.
- Hertzano, R., Lipford, E. L., and Depireux, D. (2020). Noise: Acoustic Trauma to the Inner Ear. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 53, 531–542.  
doi:10.1016/j.otc.2020.03.008.
- Hirose, K., Discolo, C. M., Keasler, J. R., and Ransohoff, R. (2005). Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic



- trauma. *J. Comp. Neurol.* 489, 180–194. doi:10.1002/cne.20619.
- Hong, S., Dissing-Olesen, L., and Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 36, 128–134. doi:10.1016/j.conb.2015.12.004.
- Housley, G. D., Batchner, S., Kraft, M., and Ryan, A. F. (1994). Nicotinic acetylcholine receptor subunits expressed in rat cochlea detected by the polymerase chain reaction. *Hear. Res.* doi:10.1016/0378-5955(94)90054-X.
- Katz, E., and Elgoyhen, A. B. (2014). Short-term plasticity and modulation of synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear synapses. *Front. Syst. Neurosci.* doi:10.3389/fnsys.2014.00224.
- Kaur, T., Clayman, A. C., Nash, A. J., Schrader, A. D., Warchol, M. E., and Ohlemiller, K. K. (2019). Lack of fractalkine receptor on macrophages impairs spontaneous recovery of ribbon synapses after moderate noise trauma in c57bl/6 mice. *Front. Neurosci.* doi:10.3389/fnins.2019.00620.
- Kokko-Cunningham, A., and Ades, H. W. (1976). Acetylcholinesterase activity in the chinchilla organ of corti in normal and acoustically overstimulated animals. *Acta Otolaryngol.* 81, 48–56. doi:10.3109/00016487609107476.
- Kujawa, S. G., and Liberman, M. C. (2009). Adding insult to injury: Cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009.
- Kujawa, S. G., and Liberman, M. C. (2015). Synaptopathy in the noise-exposed and aging cochlea: Primary neural degeneration in acquired sensorineural hearing loss. *Hear. Res.* doi:10.1016/j.heares.2015.02.009.
- Lang, H., Ebihara, Y., Schmiedt, R. A., Minamiguchi, H., Zhou, D., Smythe, N., et al. (2006). Contribution of bone marrow hematopoietic stem cells to adult mouse inner ear: Mesenchymal cells and fibrocytes. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.20929.
- Leventer, S. M., and Rowell, P. P. (1984). Investigation of the rate-limiting step in the synthesis of acetylcholine by the human placenta. *Placenta.* doi:10.1016/S0143-4004(84)80036-3.
- Liberman, M. C., and Kujawa, S. G. (2017). Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear. Res.* doi:10.1016/j.heares.2017.01.003.
- Lin, C. H. J., and Bozovic, D. (2020). Effects of efferent activity on hair bundle mechanics. *J. Neurosci.* 40, 2390–2402.

- doi:10.1523/JNEUROSCI.1312-19.2020.
- Lips, K. S., Pfeil, U., Haberberger, R. V., and Kummer, W. (2002). Localisation of the high-affinity choline transporter-1 in the rat skeletal motor unit. *Cell Tissue Res.* doi:10.1007/s00441-002-0520-4.
- Lobarinas, E., Spankovich, C., and Le Prell, C. G. (2017). Evidence of “hidden hearing loss” following noise exposures that produce robust TTS and ABR wave-I amplitude reductions. *Hear. Res.* 349, 155–163. doi:10.1016/j.heares.2016.12.009.
- Maison, S. F., Pyott, S. J., Meredith, A. L., and Liberman, M. C. (2013). Olivocochlear suppression of outer hair cells in vivo: Evidence for combined action of BK and SK2 channels throughout the cochlea. *J. Neurophysiol.* 109, 1525–1534. doi:10.1152/jn.00924.2012.
- Malmierca, M. S. (2003). The structure and physiology of the rat auditory system: An overview. *Int. Rev. Neurobiol.* doi:10.1016/S0074-7742(03)56005-6.
- Matern, M., Vijayakumar, S., Margulies, Z., Milon, B., Song, Y., Elkon, R., et al. (2017). Gfi1Cre mice have early onset progressive hearing loss and induce recombination in numerous inner ear non-hair cells. *Sci. Rep.* doi:10.1038/srep42079.
- Matsuo, A., Bellier, J. P., Nishimura, M., Yasuhara, O., Saito, N., and Kimura, H. (2011). Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M110.147611.
- McCabe, B. F. (1989). Autoimmune inner ear disease: Therapy. *Am. J. Otol.* May;10(3):196-7. PMID: 2750868.
- Medina-Garin, D. R., Dia, A., Bedubourg, G., Deparis, X., Berger, F., and Michel, R. (2016). Acute acoustic trauma in the French armed forces during 2007-2014. *Noise Health.* doi:10.4103/1463-1741.195802.
- Miranda, F. A., and Aguilar-Vidal, E. (2021). Magnitude of the contralateral efferent olivocochlear effect as a function of the frequency. *J. Otol.* doi:10.1016/j.joto.2021.11.004.
- Misawa, H., Nakata, K., Matsuura, J., Nagao, M., Okuda, T., and Haga, T. (2001). Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience.* doi:10.1016/S0306-4522(01)00147-6.
- Mitchell, J. F., and Silver, A. (1963). The spontaneous release of acetylcholine from the denervated hemidiaphragm of the rat. *J. Physiol.* doi:10.1113/jphysiol.1963.sp007046.

- Mounier-Kuhn, P., and Haguenaer, J. P. (1967). Variations De L'Activité Cholinestérasique Dans Les Cellules Ciliées De L'Organe De Corti Après Exposition á Des Sons De Fréquence Basse Ou Elevée. *Acta Otolaryngol.* 63, 297–303. doi:10.3109/00016486709128763.
- Mulroy, M. J., Fromm, R. F., and Curtis, S. (1990). Changes in the synaptic region of auditory hair cells during noise-induced temporary threshold shift. *Hear. Res.* doi:10.1016/0378-5955(90)90096-8.
- Nachmansohn, D., and Machado, A. L. (1943). The formation of acetylcholine. A new enzyme: "choline acetylase." *J. Neurophysiol.* doi:10.1152/jn.1943.6.5.397.
- Oda, Y. (1999). Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol. Int.* 49, 921–937. doi:10.1046/j.1440-1827.1999.00977.x.
- Okano, T. (2014). Immune system of the inner ear as a novel therapeutic target for sensorineural hearing loss. *Front. Pharmacol.* doi:10.3389/fphar.2014.00205.
- Patuzzi, R. B., and Thompson, M. L. (1991). Cochlear efferent neurones and protection against acoustic trauma: Protection of outer hair cell receptor current and interanimal variability. *Hear. Res.* 54, 45–58. doi:10.1016/0378-5955(91)90135-V.
- Rajan, R. (2001). Cochlear outer-hair-cell efferents and complex-sound-induced hearing loss: Protective and opposing effects. *J. Neurophysiol.* 86, 3073–3076. doi:10.1152/jn.2001.86.6.3073.
- Raphael, Y., and Altschuler, R. A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res. Bull.* 60, 397–422. doi:10.1016/S0361-9230(03)00047-9.
- Rask-Andersen, H., and Stahle, J. (1979). Lymphocyte-macrophage activity in the endolymphatic sac: An ultrastructural study of the rugose endolymphatic sac in the guinea pig. *ORL.* doi:10.1159/000275458.
- Rasmussen, G. L. (1946). The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.900840204.
- Rasmussen, G. L. (1953). Further observations of the efferent cochlear bundle. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.900990105.
- Rohmann, K. N., Wersinger, E., Braude, J. P., Pyott, S. J., and Fuchs, P. A. (2015). Activation of BK and SK channels by efferent synapses on outer hair cells in high-frequency regions of the rodent cochlea. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.2790-14.2015.

- Ryan, A. F., Kujawa, S. G., Hammill, T., Le Prell, C., and Kil, J. (2016). Temporary and Permanent Noise-induced Threshold Shifts: A Review of Basic and Clinical Observations. *Otol. Neurotol.* 37, e271–e275. doi:10.1097/MAO.0000000000001071.
- Saldaña, E. (2015). All the Way from the Cortex: a Review of Auditory Corticosubcollicular Pathways. *Cerebellum* 14, 584–596. doi:10.1007/s12311-015-0694-4.
- Santos-Sacchi, J., and Dilger, J. P. (1988). Whole cell currents and mechanical responses of isolated outer hair cells. *Hear. Res.* doi:10.1016/0378-5955(88)90113-X.
- Schaette, R., and McAlpine, D. (2011). Tinnitus with a normal audiogram: Physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.2156-11.2011.
- Sellgren, C. M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J. D., Thanos, J. M., Whittredge, P. B., et al. (2019). Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/s41593-018-0334-7.
- Shin, S. A., Lyu, A. R., Jeong, S. H., Kim, T. H., Park, M. J., and Park, Y. H. (2019). Acoustic trauma modulates cochlear blood flow and vasoactive factors in a rodent model of noise-induced hearing loss. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5–7. doi:10.3390/ijms20215316.
- Simon, J. R., and Kuhar, M. J. (1976). High affinity choline uptake: ionic and energy requirements. *J. Neurochem.* doi:10.1111/j.1471-4159.1976.tb01549.x.
- Smith, D. W., and Keil, A. (2015). The biological role of the medial olivocochlear efferents in hearing: Separating evolved function from exaptation. *Front. Syst. Neurosci.* doi:10.3389/fnsys.2015.00012.
- Tan, B. T. G., Lee, M. M. G., and Ruan, R. (2008). Bone marrow-derived cells that home to acoustic deafened cochlea preserved their hematopoietic identity. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.21729.
- Vetter, D. E., Liberman, M. C., Mann, J., Barhanin, J., Boulter, J., Brown, M. C., et al. (1999). Role of  $\alpha 9$  nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(00)80756-4.
- Vetter, D. E., and 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).* doi:10.1007/BF00213596.
- Vetter, D. E., Saldaña, E., and Mugnaini, E. (1993). Input from the inferior

- colliculus to medial olivocochlear neurons in the rat: a double label study with PHA-L and cholera toxin. *Hear. Res.* 70, 173–86.  
[https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90156-U](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90156-U)
- Wainer, B. H., Levey, A. I., Mufson, E. J., and Mesulam, M. M. (1984). Cholinergic systems in mammalian brain identified with antibodies against choline acetyltransferase. *Neurochem. Int.* doi:10.1016/0197-0186(84)90089-5.
- Warr, W. B. (1975). Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: Their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.901610203.
- Warr, W. B. (1980). Efferent components of the auditory system. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.* doi:10.1177/00034894800890s527.
- Wersinger, E., McLean, W. J., Fuchs, P. A., and Pyott, S. J. (2010). BK channels mediate cholinergic inhibition of high frequency cochlear hair cells. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0013836.
- White, J. S., and Warr, B. W. (1983). The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.902190206.
- World Health Organization. (2015). Hearing loss due to recreational exposure to loud sounds: a review. Recuperado de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/154589/9789241508513\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/154589/9789241508513_eng.pdf)
- Yang, S., Cai, Q., Bard, J., Jamison, J., Wang, J., Yang, W., et al. (2015). Variation analysis of transcriptome changes reveals cochlear genes and their associated functions in cochlear susceptibility to acoustic overstimulation. *Hear. Res.* doi:10.1016/j.heares.2015.04.010.
- Yang, S., Cai, Q., Vethanayagam, R. R., Wang, J., Yang, W., and Hu, B. H. (2016). Immune defense is the primary function associated with the differentially expressed genes in the cochlea following acoustic trauma. *Hear. Res.* doi:10.1016/j.heares.2015.10.010.
- Zhang, W., Dai, M., Fridberger, A., Hassan, A., DeGagne, J., Neng, L., et al. (2012). Perivascular-resident macrophage-like melanocytes in the inner ear are essential for the integrity of the intrastrial fluid-blood barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1205210109.
- Zheng, X. Y., Henderson, D., McFadden, S. L., and Hu, B. H. (1997). The role of the cochlear efferent system in acquired resistance to noise-induced hearing loss. *Hear. Res.* 104, 191–203. doi:10.1016/S0378-5955(96)00187-6.

