



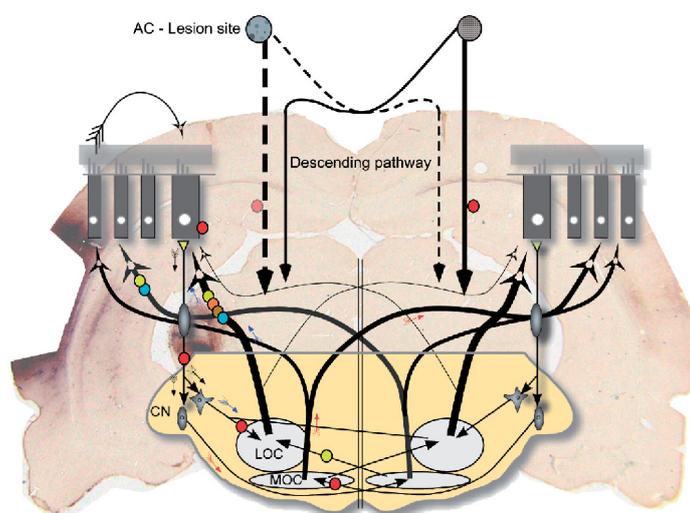
VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

Efecto de la ablación cortical auditiva sobre la actividad troncoencefálica y la regulación de la vía eferente olivo-coclear de la rata

Tesis de Doctorado



Verónica Lamas Álvarez

Salamanca | Octubre 2013



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**



**INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN**

**EFECTO DE LA ABLACIÓN CORTICAL
AUDITIVA SOBRE LA ACTIVIDAD
TRONCOENCEFÁLICA Y LA REGULACIÓN DE
LA VÍA EFERENTE OLIVO-COCLEAR DE LA
RATA**

Memoria presentada por Verónica Lamas Álvarez para
optar al grado de Doctor por la Universidad de
Salamanca

Director:

Prof. Dr. Miguel A. Merchán Cifuentes

Salamanca, 2013



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

Dr. MIGUEL MERCHÁN CIFUENTES, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA

Que la tesis doctoral titulada:

EFFECTO DE LA ABLACIÓN CORTICAL AUDITIVA SOBRE LA ACTIVIDAD TRONCOENCEFÁLICA Y LA REGULACIÓN DE LA VÍA EFERENTE OLIVO - COCLEAR DE LA RATA

Es el trabajo de investigación realizado por **Dña. Verónica Lamas Álvarez** bajo mi dirección durante los últimos cuatro años.

La memoria de este estudio recoge un análisis exhaustivo y detallado del efecto a corto y largo plazo de la ablación cortical sobre la actividad de la vía auditiva baja, así como los cambios que la lesión produce en la expresión génica del receptor auditivo.

Los datos presentados en esta memoria constituyen una aportación original y han permitido un avance significativo en el conocimiento de la plasticidad post lesional en el sistema auditivo adulto.

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 Dña. Verónica Lamas Álvarez opte a grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 07 de octubre de 2013

Prof. Miguel Merchán Cifuentes

VNIVERSITAS
STVDII
SALAMANIINI

Este trabajo ha sido financiado por el MICINN – Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-13754-C02-02) y por el MINECO – Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-39982-C02-01). Así como por una Ayuda para la Formación de Personal Investigador de la Universidad de Salamanca, financiada por el Grupo Santander (Septiembre, 2009).

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias en primer lugar a mi director de tesis, Miguel A. Merchán, porque me ha formado como investigadora y sus enseñanzas irán siempre conmigo. Gracias por confiar en mí y por la paciencia y tranquilidad mostrada sobre todo cuando los experimentos no iban del modo en que una quisiera. Gracias por enseñarme que en el camino de las Neurociencias no hay que dar nada nunca por sentado y que siempre quedan muchas cosas por aprender.

A Nacho, por ser el mejor técnico que un doctorando pueda tener, además de compañero y amigo. Gracias por enseñarme todos los pequeños trucos del laboratorio, por tu complicidad, disponibilidad y ayuda tanto en los buenos como en los malos momentos, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por ser el enlace entre maestro y aprendiz, consiguiendo consensuar, como sólo tu saber hacer, las discrepancias que han surgido a veces en el laboratorio.

Al profesor Juan Carlos Alvarado, por su enorme ayuda con parte de los experimentos de esta tesis. A los doctores Enrique López Poveda, Manuel S. Malmierca, Juan Carro y Javier Herrero, por sus recomendaciones, paciencia e inestimable ayuda profesional cada vez que lo he necesitado. Al resto de profesores del grupo de Neurobiología de la Audición: Enrique Saldaña, M^a Dolores López y Orlando Castellanos, porque todos ellos, en algún momento, han contribuido con sus consejos a mi formación.

A Dani, Yaneri y Bego, por ser “mi pequeña familia salmantina” y ayudarme en todo momento. Gracias por todo lo vivido juntos, tanto dentro como fuera del laboratorio, por vuestro apoyo y por ser a veces el paño de lágrimas. Sin vosotros estos años no hubieran sido los mismos.

A Vicente Niño y Moisés Pérez Marcos, por ser unos verdaderos amigos y estar a mi lado día y noche, todos los días de la semana. Gracias por vuestro cariño, confianza y por cuidarme cada vez que lo he necesitado. A Octavio, David Lana, Natalia, Salvador, Bea y Rodrigo, por ser el aire fresco que me recordaba que en la vida no todo es ciencia.

A “mis niñas” Leila y Judit, porque aunque la distancia nos ha impedido vernos todo lo que quisiéramos, siempre os he tenido presentes y sé que vosotras habéis estado ahí. Gracias por vuestra amistad todos estos años.

A José Alberto, que me ha ayudado a diseñar la portada de esta tesis. Gracias por estar cerca y no dudar en echarme una mano sin importar la hora que fuera.

A Auxi, Raquel y sus hermanas, por aportarme la serenidad y confianza que los últimos momentos de escritura de la tesis requerían.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis padres y mis hermanas, a quienes va dedicado este trabajo, por su apoyo incondicional durante todos estos años y porque sus esfuerzos, sacrificios, consejos y paciencia para conmigo han sido el pilar que me ha sostenido este tiempo.

INDICE

ABREVIATURAS.....	17
PREÁMBULO.....	21
INTRODUCCIÓN.....	27
CONSIDERACIONES SOBRE EL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
LESIONES BILATERALES VS UNILATERALES DE LA CORTEZA AUDITIVA.....	41
SECUENCIA TEMPORAL	41
SELECCIÓN DE GENES PARA EL ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN EN LA CÓCLEA	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
GRUPOS EXPERIMENTALES	49
PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.	50
Lesión de la corteza auditiva.....	50
ESTUDIO CITOARQUITECTURAL PARA DETERMINAR LA LOCALIZACIÓN Y EXTENSIÓN DE LAS LESIONES EN EL CÓRTEX CEREBRAL.....	52
Fijación y corte	52
Inmunocitoquímica para GAD y Pv.....	53
Tinción de Nissl.....	54
Localización de las lesiones.	54
REGISTRO DE LAS RESPUESTAS AUDITIVAS EVOCADAS DEL TRONCO DEL ENCÉFALO (Auditory Brainstem Responses – ABRs).....	57
TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR.....	61
Extracción de RNA	61
Transcripción reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa o <i>real time</i> (RT-qPCR).....	62
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
RESULTADOS.....	67
LOCALIZACIÓN Y TAMAÑO DE LAS LESIONES EN EL CÓRTEX CEREBRAL	69
REGISTRO DE LAS RESPUESTAS AUDITIVAS EVOCADAS DEL TRONCO DEL ENCÉFALO	70
Análisis de los umbrales auditivos.....	70
Análisis de las amplitudes de las ondas.....	72

RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA CÓCLEA OBTENIDOS	
MEDIANTE qPCR.....	80
Genes relacionados con la neurotransmisión excitatoria.....	80
Glutamato deshidrogenasa (glud1).....	80
Subunidades de los receptores ionotrópicos AMPA:.....	84
Subunidad GluA2	84
Subunidad GluA3	84
Subunidad gluA4	85
Genes relacionados con la neurotransmisión GABA.....	85
Subunidad α 1- receptor GABAA.....	85
Subunidad γ 2- receptor GABAA.....	87
Genes relacionados con la neurotransmisión del sistema eferente olivococlear.....	87
Sistema olivococlear lateral.....	87
Subunidad 1a del receptor de Dopamina D1 o Drd1a	87
Receptor de dopamina Drd2.....	89
Subunidad α 7- receptor acetilcolina	89
Parvalbúmina α	90
Genes afectados por la regulación del sistema olivococlear medial	90
Subunidad α 10- del receptor de acetilcolina.....	90
Prestina.....	91
<i>DISCUSIÓN</i>	93
POTENCIALES EVOCADOS DEL TRONCO DEL ENCÉFALO (ABRs)	95
Amplitudes de las ondas y umbrales.	95
Latencia de las ondas.....	99
EXPRESIÓN Y REGULACIÓN GÉNICA EN LA CÓCLEA.....	100
Cambios a corto plazo (1 día pl.).....	100
Cambios a largo plazo (7 y 15 días pl.).....	107
<i>CONCLUSIONES</i>.....	109
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	115
<i>APÉNDICE</i>.....	129

ABREVIATURAS

ABC	Complejo Avidina-Biotina
ABRs	Auditory brainstem responses
AMPA	Ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
BDA	Dextrano biotinado
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Células ciliadas internas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CGRP	Calcitonin gene related peptide
DAB	Diaminobencidina tetrahidrocloruro
dB SPL	Decibelios (en referencia al nivel de presión sonora)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Dexosinucleótidos trifosfato
F	F de Snedecor
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
gl	Grados de libertad
NMDA	N-metil-D-aspartato
NVCT	Núcleo ventral del cuerpo trapezoide
OSL	Oliva superior lateral
p	Nivel de significación
PB	Buffer fosfato
pl	post-lesión
Pv	Parvalbúmina
RT-qPCR	quantitative Reverse transcription polymerase chain reaction (PCR cuantitativa o PCR en tiempo real)
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa con transcriptasa inversa)
t	t de Student
TBS	Buffer Tris Salino
TBS-Tx	Buffer Tris Salino + Tritón
Tris-HCl	Buffer Tris + ácido clorhídrico

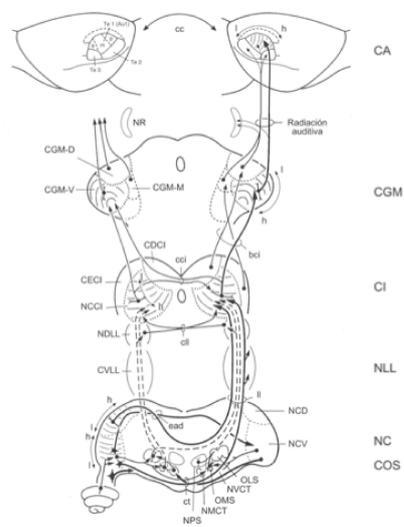
PREÁMBULO

El sistema auditivo de los mamíferos, como otros sistemas sensoriales, está organizado en estaciones o núcleos interconectados entre sí y organizados, con arreglo al sentido del flujo del procesamiento de la información, en una vía ascendente y otra descendente (Esquema 1). Tradicionalmente se ha considerado a la vía ascendente como la responsable de transmitir la información desde la cóclea hasta la corteza auditiva, y a la vía descendente como la encargada de regular y filtrar jerárquicamente la respuesta sensorial, emergiendo de este planteamiento la idea del control descendente. Sin embargo, de los planteamientos conceptuales delineados por Llinas y Ribary (2001) en su artículo sobre: "Consciousness and the brain. The thalamocortical dialogue in health and disease" se obtiene una visión distinta del funcionamiento del sistema nervioso. En esta publicación se argumenta que:

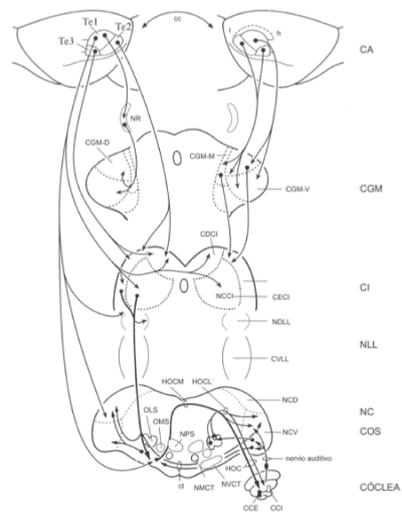
"Because the number of possible categories of perceptions is so extensive, their implementation via purely hierarchical connectivity is very unlikely, where a single "grandmother" neuron or a small group of such neurons would represent specific elements of a category. A second problem with the hierarchical proposal is sampling size, that is, a very large number of specific elements in a very large number of categories would make the retrieval problem immense. Thus, even considering that neuronal elements transduce and transmit signals at millisecond rate from the onset of sensory primitives, exhausting all sequential combinations would be awkwardly time-intensive. But at a more familiar level, it takes roughly the same amount of time to recognize that a face is familiar than that it is not. As in any sequential strategy, it takes much longer to conclude non familiarity as it would require comparing it with "all known faces" than familiarity, as in the latter the search will proceed for only as long as necessary to match. From a different perspective the grandmother-neuron hypothesis fails to explain how their unique "perceptual insights" (the specific elements in a given category) are communicated to the rest of the nervous system; that is, how do grandmother cells tell the rest of their neurons what they know, given their unique position at the top of a hierarchy?

Alternatively, since categorizations are generated by spatial mapping of the primary sensory cortex and its associated cortical structures, a more dynamic interaction, based on temporal coherence, may generate dissipative functional structures capable of as rapid a change as the perception they generate. Thus, a simultaneity mapping may be envisioned that takes advantage of the parallel and synchronous organization of the brain networks in order to generate perception."

Vía auditiva ascendente



Vía auditiva descendente



Representación esquemática de las vías auditivas ascendentes y descendentes de la rata (con el permiso del autor, Malmierca 2003)

- CA** = Corteza Auditiva
- CGM** = Cuerpo Geniculado Medial
- CI** = Colículo Inferior
- NLL** = Núcleo Lateral del Lemnisco
- NC** = Núcleos Cocleares
- COS** = Complejo Olivario Superior

Estas ideas, producto del análisis del funcionamiento del eje talamocortical, pueden ser reeditadas para el procesamiento sensorial auditivo, en el sentido de sustituir la visión jerarquizada de la vía auditiva (control descendente sobre información ascendente) por la idea de una organización en circuitos cerrados de retroalimentación (*feedback loops*). De este modo, en el sistema auditivo, es posible distinguir tres grandes sistemas de retroalimentación: el que depende de la participación de la corteza cerebral auditiva, que incluye los circuitos corticotálamicos, corticocoliculares, y corticopontinos; otro centrado en el mesencéfalo, integrado por las fibras que se originan en el colículo inferior y que constituyen las proyecciones coliculopontinas, y un tercero que constituye la vía eferente olivococlear que regula las respuestas sensoriales en el propio receptor y que es diana de todos los anteriores (Ramón y Cajal, 1911; Rasmussen 1953; Brodal 1981; Spangler y Warr, 1991).

Siguiendo el esquema canónico de conexiones de la vía auditiva (Brodal, 1981) (Esquema 1) podemos también inferir que, al existir conexiones entre el colículo inferior y el tálamo y el colículo inferior y el puente, estos circuitos de retroalimentación se encuentran también sintonizados entre sí, y por lo tanto, la respuesta del sistema auditivo contiene el efecto doble de la retroalimentación de los circuitos cerrados con participación cortical y de la retroalimentación de estos circuitos entre sí. Además, podemos inferir que los dos extremos de la vía sensorial auditiva, es decir, el receptor auditivo y la corteza, son las estaciones término en las que se concentra y se ejecuta la actividad de todos los circuitos de retroalimentación antes descritos. Esta visión no jerárquica de la organización de la vía sensorial auditiva resulta relevante a la hora de comprender los cambios inducidos por la pérdida total o parcial de las señales descendentes, en términos de reorganización plástica de las redes neuronales.

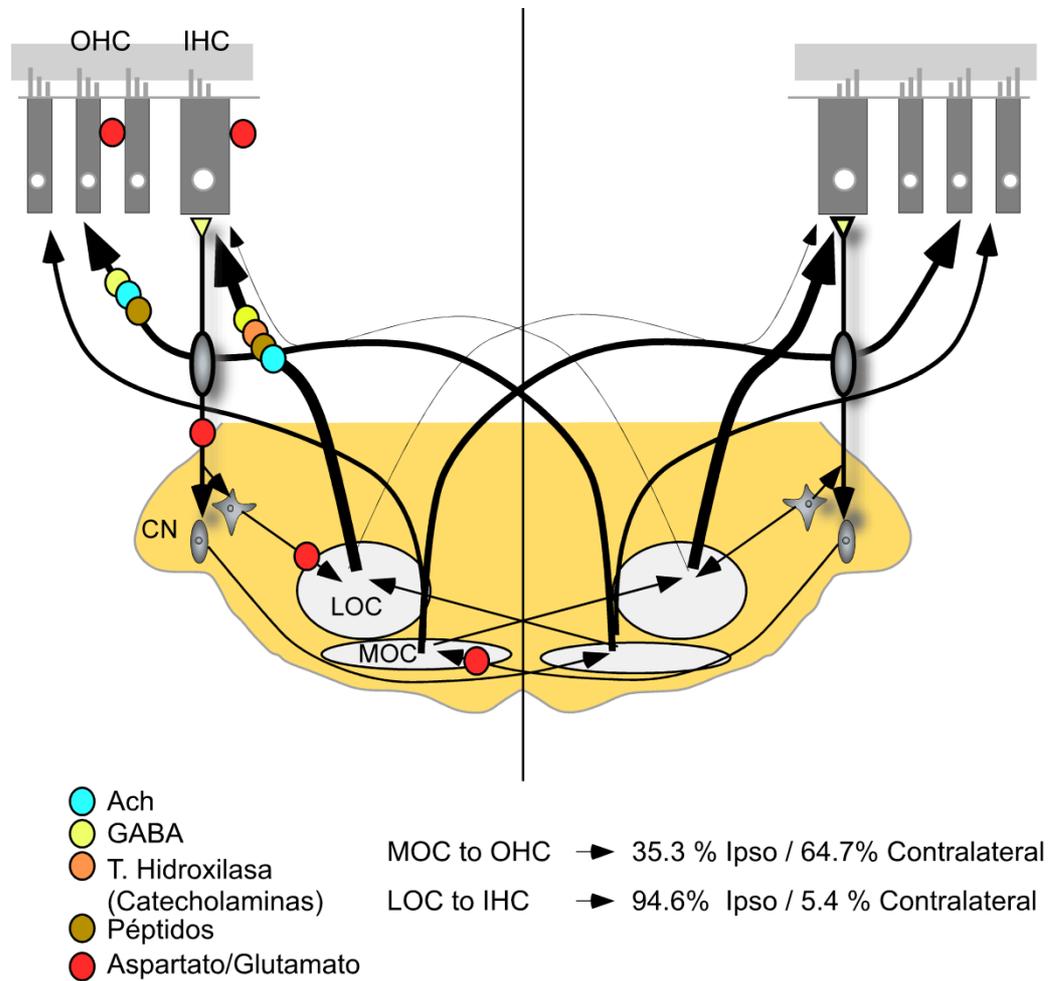
En su conjunto, las publicaciones previas de nuestro laboratorio han permitido concluir que en el colículo inferior las lesiones corticales provocan una brusca disminución reversible a largo plazo de la actividad c-fos y del tamponamiento de calcio frente a la estimulación sonora (Clarkson y cols., 2010a y b) y que los cambios en la expresión de sus genes, analizados por nosotros mediante DNA chips (Clarkson y cols.,

2012), son compatibles tanto con una reorganización plástica a nivel de circuitos (recrecimiento axonal) como con una reorganización a nivel sináptico. En este contexto, el propósito de este trabajo es analizar el efecto de la reorganización plástica de la vía sobre la actividad del receptor tras ablación cortical, medida en términos de respuesta eléctrica (potenciales evocados) o de la regulación de la expresión de sus genes. Un aspecto central de nuestro paradigma experimental, tanto en este trabajo como en otros anteriores de esta línea de investigación, es la realización de experimentos en diferentes tiempos (un día y superiores) de supervivencia tras la lesión. Por lo tanto el objeto de este diseño es tratar de comprender los principios de la reorganización de la vía auditiva como respuesta tanto a la lesión (cambios inducidos por la neurodegeneración tras las lesiones), como a la pérdida selectiva de una de las entradas a los circuitos de retroalimentación (neuroplasticidad postlesional).

INTRODUCCIÓN

Los estudios anatómicos de Rasmussen (1953) fueron los primeros en sugerir que la conexión descendente de la corteza auditiva actúa sobre una cadena de conexiones que finaliza en neuronas del puente cuya diana es el órgano de Corti. Sus descripciones anatómicas de la proyección entre las neuronas del complejo olivar superior y el receptor auditivo permitieron comprender algunos principios sobre la organización del haz olivococlear. El papel funcional de este haz se demostró en los experimentos llevados a cabo por Galambos (1956), quien encontró que la estimulación de las fibras olivococleares a su paso por el suelo del cuarto ventrículo causa una caída en la actividad eléctrica de la cóclea. Posteriormente, estudios anatómicos en los que se inyectó peroxidasa del rábano en la cóclea, demostraron la existencia de dos grupos distintos de neuronas olivococleares marcadas retrógradamente, diferentes respecto a su tamaño (pequeñas o grandes), a su localización (lateral o medial) y a su lugar de proyección predominante (ipsilateral o contralateral) (Warr, 1975 y 1980; Strutz 1981; White y Warr, 1983; Aschoff y Ostwald 1987; Vetter y Mugnaini, 1990). Estos estudios permitieron diferenciar la existencia de un haz olivococlear lateral, cuyas neuronas se encuentran en la oliva superior lateral (OSL) y la región periolivar, y otro medial, cuyas neuronas se localizan en el núcleo ventral del cuerpo trapezoide (NVCT). Más recientemente, el estudio cuantitativo del número de neuronas marcadas retrógradamente en el complejo olivar superior tras inyección en la cóclea del trazador transneuronal *Pseudorabies Virus* o inyección de peroxidasa, mostró que las neuronas del haz olivococlear lateral predominan en el lado ipsilateral en un 90.2% (experimentos-*Pseudorabies V.*) y un 94.6% (experimentos-peroxidasa), y las del medial lo hacen en el lado contralateral en un 54.7% (experimentos *Pseudorabies V.*) y un 64.7% (experimentos-peroxidasa) (Brown y cols., 2013), lo que permitió comprender en términos anatómicos la simetría de la organización bilateral de la vía eferente sobre ambos oído (Esquema 2).

Los primeros análisis para dilucidar el destino de las proyecciones olivares en el órgano de Corti se realizaron mediante inyecciones en OSL y NVCT de ³⁵S metionina guiadas fisiológicamente utilizando potenciales evocados y estimulación biaural (Warr y Guinan, 1979). En este estudio pionero se encontró que las inyecciones de este isótopo



Esquema 2. Esquema explicativo de las proyecciones del haz olivococlear lateral y medial sobre la cóclea. Los potenciales neurotransmisores que contienen cada una de las proyecciones (círculos) se han indicado de acuerdo a lo descrito en la literatura (Feliciano y Potashner, 1995; Raphael y Altschuler, 2003).

LOC = Lateral olivocochlear system; MOC = medial olivocochlear system; CN = cochlear nuclei; IHC = inner hair cells; OHC = outer hair cells

en la región lateral del complejo olivar superior, originan marcas (gránulos de plata tras revelado autoradiográfico) localizadas en la región de las células ciliadas internas (CCI), mientras que las inyecciones en la región medial producen marcas en la región de las células ciliadas externas (CCE) (Warr y Guinan, 1979). Posteriormente, experimentos con trazadores (Liberman 1980; Brown 1987; Simmons y cols., 1996) o con microscopía electrónica (Eybalin y Pujol, 1987; Liberman 1990; Satake y Liberman, 1996) confirmaron que las neuronas olivococleares laterales envían eferencias sobre las CCI y sobre las expansiones distales de las neuronas ganglionares de tipo I, y las olivococleares mediales lo hacen sobre las CCE (Esquema 2).

Para comprender el efecto del haz olivococlear sobre el órgano de Corti, es necesario conocer previamente los neurotransmisores que utiliza y su efecto en la respuesta fisiológica coclear. Por ello, y dado que la función y neuroquímica de los haces lateral y medial son diferentes, a continuación analizaremos por separado cada uno de ellos.

La naturaleza colinérgica del haz olivococlear lateral se demostró en los primeros estudios de Warr (1975), Eybalin y Pujol (1987) y Vetter (1991). No obstante, estudios inmunocitoquímicos posteriores revelaron que las neuronas olivococleares laterales generan en la región de las CCI una de las sinapsis neuroquímicas más complejas, puesto que, además de acetilcolina, contiene otros neurotransmisores y neuromoduladores, tales como encefalina, dinorfina, dopamina, GABA y CGRP (para una revisión, ver Eybalin 1993; Puel 1995; Gil-Loyzaga, 1995; Safieddine y cols., 1997) (Esquema 2). El análisis de los efectos de estos neurotransmisores ha generado muchos estudios experimentales en los que se han aplicado tanto técnicas de electrofisiología, como neuroquímicas o neurofarmacológicas, aunque su funcionamiento es todavía materia de controversia. Los registros electrofisiológicos realizados sobre fibras del nervio auditivo tras infusión de acetilcolina en la cóclea, mostraron aumentos tanto en su disparo espontáneo como en el inducido por sonido (Felix and Ehrenberger 1992). El registro del potencial de acción compuesto tras la infusión en la cóclea de pentazocine (una droga que mimetiza el efecto de la dinorfina endógena) mostró también un aumento

de la actividad eléctrica del receptor (Sahley y Nodar, 1994). Sin embargo, el estudio de los potenciales evocados del tronco del encéfalo en ratones *knockout* para α CGRP, mostró una disminución en la amplitud de las ondas (Maison y cols., 2003). Por otra parte, la inyección en la cóclea de GABA disminuyó la actividad inducida por glutamato (Felix and Ehrenberger 1992), la de encefalina deprimió la despolarización de las fibras aferentes (Burki y cols., 1993), y la de dopamina o agonistas de dopamina disminuyó la amplitud del potencial de acción compuesto y las respuestas inducidas por glutamato del nervio auditivo (Oestreicher et al. 2002; Ruel et al. 2001; d'Aldin et al. 1995a,b). Todos estos datos sugieren un carácter potencialmente facilitador en la sinapsis en la base de las CCI para los neurotransmisores y neuromoduladores acetilcolina, dinorfina y CGRP, y un carácter potencialmente inhibitorio para los neurotransmisores y neuromoduladores GABA, encefalina y dopamina (ver revisión en Raphael y Altschuler, 2003). No obstante, el funcionamiento combinado in vivo de estos neurotransmisores sigue siendo materia de debate.

Por otra parte, tal como se ha dicho anteriormente, el haz olivococlear medial inerva a las CCE (Warr y Guinan, 1979; Liberman 1980; Brown 1987; Simmons y cols., 1996). Estudios combinados de inmunocitoquímica y trazadores inyectados en la cóclea demostraron que, tanto las neuronas que originan el haz medial, como sus campos terminales sobre la región de las CCE, son inmunorreactivos para colinesterasa y acetilcolintransferasa (Warr, 1975; Altschuler y cols 1985; Vetter y cols., 1991). Así mismo, también se ha demostrado que las fibras olivococleares mediales contienen, además, otros neurotransmisores como GABA (Fex y cols 1986; Eybalin y cols., 1988; Schrott-Fischer y cols., 2002) y CGRP, aunque la presencia de éste último es aun materia de debate (Lu y cols., 1987; Sliwinska-Kowalska 1989; Vetter y cols., 1991; Cabanillas y cols., 2002) (Equema 2). El efecto de la acetilcolina sobre las CCE ha sido explorado mediante técnicas de *patch clamp*, habiéndose demostrado que la aplicación en cultivo de este neurotransmisor o agonistas de su receptor produce la hiperpolarización de las CCE (Housley 1991; Nenov y cols., 1996a y b; Erostequi y cols., 1994), lo que desplaza el equilibrio de su balance de actividad o *set point* del amplificador coclear (membrana basilar), al modificar las propiedades electromecánicas

de las CCE. El uso de sistemas óptico - electrónicos en micro cámaras de cultivo permitió demostrar, además, cambios en la electromotilidad de las CCE asociados a variaciones en la rigidez de su membrana, tras la infusión de acetilcolina (Sziklai y cols., 1996; Dallos y cols, 1997; He y cols, 2003). Por otra parte, experimentos de *patch clamp* han demostrado que el neurotransmisor GABA también hiperpolariza a las CCE (Gitter y Zenner, 1992; Batta y cols., 2004), aunque estudios recientes relacionan el GABA con el control presináptico de la neurotransmisión colinérgica de las fibras eferentes mediales (Wedemeyer y cols., 2013). Trabajos previos en los que se llevó a cabo la estimulación de las fibras olivococleares mediales a su paso por el suelo del cuarto ventrículo, junto con la medición por interferometría del movimiento evocado por sonido de la membrana basilar, mostraron una supresión de su movimiento vibratorio para la región de frecuencia característica correspondiente al sonido de estimulación (Murugasu y Russel, 1996; Russel y Murugasu, 1997). Estos datos demostraron que las fibras olivococleares mediales ejercen un efecto de regulación mecánica del fenómeno de amplificación y ganancia coclear. Por lo tanto, y en resumen, tanto la acetilcolina como el GABA liberado por las fibras olivococleares mediales produce básicamente la regulación selectiva de la vibración de la membrana basilar que conduce a generar fenómenos de ganancia y amplificación, cuyo resultado es el procesamiento fino de las propiedades espectrales del sonido. Los cambios en el estado vibratorio de la membrana reticular inducidos por la regulación eferente de las CCE, afectan a su vez a la deflexión ciliar de las CCI y en consecuencia a su neurotransmisión y a la actividad del nervio auditivo. Por ello, concluimos que el sistema olivococlear puede regular la actividad del receptor auditivo, bien modificando la respuesta excitatoria de la sinapsis entre las CCI y las neuronas ganglionares a través del sistema olivococlear lateral, o bien modificando la contractilidad de las CCE a través del sistema olivococlear medial, si bien los efectos combinados de ambos determinan un balance finalmente regulado por la interacción micromecánica en la actividad de las CCE sobre las CCI.

En el órgano de Corti, las CCI los procesos periféricos de las neuronas ganglionares de tipo I constituyen el 90-95% de las fibras del nervio auditivo (Spendlin, 1967 y 1972). Las expansiones proximales de estas neuronas (rama auditiva del VIII par)

penetran en los núcleos cocleares, y se bifurcan dando lugar a una rama descendente que inerva el núcleo coclear posteroventral y el tubérculo acústico y una rama ascendente que inerva el núcleo coclear anteroventral (Lorente de Nó, 1981 y 1933a y b; Merchán y cols., 1985). Durante su trayecto dentro de los núcleos cocleares, los aferentes primarios contactan con la mayoría de sus neuronas (Moore y Osen, 1979; Webster y Tune, 1982; Hackney y cols., 1990), iniciando así el primer procesamiento central de las señales auditivas. Desde estos núcleos, las neuronas de relevo de los núcleos cocleares envían proyecciones, por un lado al mesencéfalo y al tálamo a través del lemnisco lateral, y por otro al tronco del encéfalo caudal, donde se encuentra el complejo olivar superior (ver una revisión en Malmierca y Merchán 2004). Estas conexiones entre los núcleos cocleares y el puente tienen como funciones principales la interacción baural para la localización del sonido y la activación del sistema de retroalimentación eferente olivococlear.

La inyección de Fluorogold[®] en el núcleo coclear dorsal (que marca colaterales axónicas de las neuronas del núcleo coclear ventral que proyectan al complejo olivar) junto con inyecciones de este mismo trazador en la cóclea, permitieron conocer que el principal tipo celular de los núcleos cocleares que inerva a las neuronas olivococleares mediales (predominantemente del lado contralateral) son las neuronas multipolares planares (Darrow y cols., 2012). Por otro lado, inyecciones en la cóclea del trazador transneuronal *Pseudorabies Virus*, que permiten distinguir bien los árboles dendríticos, confirmaron esta idea y permitieron comprobar que las neuronas multipolares planares también inervan a las neuronas olivococleares laterales del lado ipsilateral (Horvath y cols., 2003; Brown y cols., 2013). De este modo, estas particulares neuronas de los núcleos cocleares cierran un circuito (receptor – nervio auditivo- núcleos cocleares- neuronas olivococleares- receptor) que regula la actividad de las neuronas olivococleares como respuesta a la actividad del receptor. Como todos los circuitos de retroalimentación del sistema auditivo (ver comentarios en el preámbulo), este circuito se regula mediante las proyecciones descendentes de la vía auditiva (*i.e.* corticopontinas y coliculopontinas), bien caracterizadas previamente mediante técnicas de trazado neuroanatómico (Feliciano y cols., 1995; Weedman y cols 1996; Coomes y Schofield

2004; Schofield y Coomes 2006). Así, la inyección combinada de BDA en la corteza y de Fluorogold en la cóclea demostró la existencia de proyecciones corticales directas sobre las neuronas olivococleares mediales del NVCT (Mulders and Robertson 2000). Asimismo, la inyección de trazadores anterógrados en la corteza también mostró campos terminales corticales en la OSL y la región periolivar, donde se localizan las neuronas olivococleares laterales. Estos estudios, junto con el carácter excitatorio de la proyección corticofuga (Feliciano y Potashner 1995), sugieren que la corteza auditiva puede activar tanto a las neuronas olivococleares mediales como a las laterales, (aunque de este último extremo no hay evidencias anatómicas firmes), y, en consecuencia, a sus respectivos circuitos olivococleares.

El efecto fisiológico del control descendente de la corteza sobre las respuestas de la cóclea y los núcleos cocleares ha sido analizado previamente en experimentos tanto de estimulación como de inhibición de la corteza auditiva (Luo y cols., 2008; Liu y cols. 2010; Xiao and Suga, 2002; Perrot et al., 2006, León y cols., 2012). La estimulación eléctrica de la corteza auditiva en regiones sintonizadas a una frecuencia característica conocida, produce en los núcleos cocleares aumentos en la magnitud de la respuesta de neuronas sintonizadas a la misma frecuencia, mientras que disminuye la magnitud de la respuesta de neuronas sintonizadas a frecuencias adyacentes (inhibición lateral), demostrándose para esta proyección un papel de ganancia en el procesamiento neural de las propiedades espectrales del sonido (Luo y cols., 2008; Liu y cols. 2010). La activación eléctrica tonotópica de la corteza también tiene un efecto de mejora del procesamiento espectral del sonido en la cóclea, demostrado por un aumento de los microfónicos cocleares (que reflejan la actividad de las CCE) para tonos puros coincidentes con la frecuencia de estimulación (Xiao and Suga, 2002), y por cambios en las emisiones otoacústicas (Perrot et al., 2006). Asimismo, la inhibición cortical por medios químicos (bloqueantes) o físicos (enfriamiento) disminuye la amplitud de los microfónicos cocleares (Xiao y Suga, 2002; León y cols., 2012) y altera el potencial de acción compuesto coclear (León y cols., 2012), lo que refuerza el papel potenciador de la corteza auditiva sobre las respuestas de la cóclea.

Un estudio previo de ablación bilateral de la corteza auditiva mostró un descenso en los umbrales y amplitudes de las ondas de los potenciales evocados de latencia corta y de las respuestas mioclónicas del reflejo de sobresalto 1 día después de la cirugía (Hunter y Willot, 1993). En estos experimentos, 30 días después de la lesión, todos los parámetros se estabilizaron hasta los niveles controles, sugiriendo la existencia de fenómenos de reparación espontánea (Hunter y Willot, 1993). Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado un efecto similar de la ablación cortical unilateral sobre los potenciales evocados de latencia corta (Clarkson y cols., 2010c) y también la capacidad de recuperación de la actividad c-fos y el tamponamiento de calcio a largo plazo en el colículo inferior (Clarkson y cols., 2010a y b). Sin embargo, ni los resultados de Hunter y Willot (1993), ni nuestros propios estudios previos (Clarkson y cols., 2010a, b y c), han analizado en detalle los efectos de la deprivación cortical sobre la actividad troncoencefálica.

El registro del potencial eléctrico evocado del tronco del encéfalo (a partir de ahora utilizaremos el término abreviado en lengua inglesa consagrado por el uso "Auditory brainstem responses" – ABRs) es una técnica no invasiva que permite evaluar globalmente el estado funcional del nervio auditivo y de los núcleos de la vía auditiva baja. Dependiendo de la especie, el espectrograma de los ABRs está constituido por cinco o siete ondas que aparecen dentro de los 10 milisegundos posteriores a la estimulación auditiva (Shaw, 1988; Chen y Chen, 1991; Parkkonen y cols., 2009). Durante años el origen anatómico de las ondas ha sido objeto de debate (Simpson y cols., 1985; Shaw, 1988; Kuwada y cols., 1986; Church y Kaltenbach 1993; Newton y cols., 1992). Sin embargo, gracias a estudios de lesión con ácido kaínico en gato (Melcher y cols 1996a y b.; Melcher y Kiang, 1996), un estudio similar de lesión por radiofrecuencia en rata (Chen y Chen, 1991) y un estudio por magnetoencefalografía en humanos, se ha podido establecer, de forma general para la mayoría de mamíferos, que las ondas I (P1), II (P2), III (P3), IV (P4) y V (P5) se corresponden respectivamente con la actividad de las regiones del nervio auditivo, de los núcleos cocleares, el complejo olivar superior, el lemnisco lateral y el colículo inferior. Por todo ello consideramos para este estudio que los ABRs son una buena herramienta para evaluar globalmente el

efecto que la deprivación cortical produce sobre la actividad evocada del nervio auditivo y de los núcleos de la vía auditiva baja.

Como se dijo anteriormente, análisis previos de nuestro laboratorio, en los que se aplicaron técnicas de chip DNA microarrays, mostraron cambios en la regulación génica del colículo inferior a diferentes tiempos tras la ablación cortical que se interpretaron como el efecto de una reorganización plástica post lesional de la vía auditiva a largo plazo (Clarkson y cols., 2012). A la vista de estos datos y de lo anteriormente explicado sobre la organización y función de las proyecciones en la vía auditiva, nuestra hipótesis de trabajo es que la degeneración de la proyección corticofuga excitatoria sobre las neuronas olivococleares causa cambios en la actividad de la vía eferente que revierten en la regulación de la expresión de genes en el oído interno. El estudio de estos cambios podría explicar tanto el efecto de la deprivación cortical sobre el haz lateral o el medial, como los fenómenos de auto reparación o los resultados obtenidos mediante ABRs. Por ello, un segundo objetivo de esta tesis es analizar, a diferentes tiempos de supervivencia tras ablación de la corteza auditiva, los cambios en la expresión de genes relacionados con la regulación eferente lateral o medial, así como de la actividad de la cóclea.

CONSIDERACIONES SOBRE EL DISEÑO EXPERIMENTAL

LESIONES BILATERALES VS UNILATERALES DE LA CORTEZA AUDITIVA

Estudios previos han demostrado que la proyección corticopontina es bilateral y simétrica, pero con una mayor densidad de conexiones en el lado ipsilateral (Feliciano y cols., 1995; Coomes y Schofield, 2004; Schofield y Coomes, 2005 y 2006). Por ello, la ablación de la corteza auditiva de un solo lado del cerebro debe inducir un efecto diferente en las neuronas del tronco del encéfalo auditivo del lado ipsilateral a la lesión respecto a las del lado contralateral. En este trabajo se ha pretendido aprovechar esta circunstancia para comprender mejor los efectos de la pérdida del control descendente tanto sobre la actividad de la vía auditiva baja, como en la regulación de la expresión génica en el receptor auditivo.

Las lesiones bilaterales permitieron analizar el efecto que la pérdida total de la proyección corticofuga produce sobre la cóclea y los núcleos del tronco del encéfalo auditivo. Su comparación con el efecto producido por lesiones unilaterales permite evaluar las diferencias entre la pérdida total y la parcial del control cortical, además de la existencia de posibles fenómenos de compensación llevados a cabo por la corteza intacta.

SECUENCIA TEMPORAL

En este trabajo se ha tomado en consideración la necesidad de explorar la evolución en el tiempo de los cambios post lesión. El diseño experimental, costoso en tiempo por el número de grupos experimentales objeto de estudio, ofrece, a diferencia de los análisis instantáneos, una visión más completa de los efectos de la corteza auditiva sobre la plasticidad, tanto de la actividad del conjunto del sistema auditivo como de la regulación de la respuesta del receptor y de la vía troncoencefálica caudal. Los grupos experimentales post lesión (pl.) se analizaron en los días 1, 7, 15 y 30 tras la cirugía. Los periodos de supervivencia se basaron en estudios previos del laboratorio (Clarkson y cols., 2010 y 2012) y en un principio de economía de tiempo que permitiera el mejor desarrollo de esta tesis doctoral.

SELECCIÓN DE GENES PARA EL ANÁLISIS DE SU EXPRESIÓN EN LA CÓCLEA

En la cóclea, se acepta que el neurotransmisor Glutamato/Aspartato es el responsable de la neurotransmisión entre las células ciliadas y las aferencias de las neuronas ganglionares (ver una revisión en Klinke 1986; Eybalin 1993; Puel 1995; Ottersen y cols., 1998). La combinación de técnicas de RT-PCR e hibridación in situ con técnicas inmunohistoquímicas, demostró que las neuronas ganglionares poseen todos los tipos de receptores ionotrópicos de glutamato: AMPA, NMDA y kainato (Niedzielski y cols., 1995 y 1997). Sin embargo, la perfusión en la cóclea de antagonistas específicos para cada tipo de receptor mostró una disminución en el potencial de acción compuesto y una reducción o supresión de la velocidad de descarga espontánea de las fibras del nervio auditivo sólo para los antagonistas de los receptores AMPA (Ruel y cols, 2000), sugiriendo que éstos son los encargados de la neurotransmisión aferente rápida (ionotrópica) en la cóclea. Esta idea se apoya también en el estudio del bloqueo de las corrientes excitatorias post sinápticas registradas en botones aferentes localizados bajo las CCI tras la aplicación de un antagonista de los receptores AMPA/kainato (Glowatzki y Fuchs, 2002). Considerando estos datos, para explorar los cambios que la ablación cortical pueda tener sobre genes relacionados con la neurotransmisión sináptica entre las células ciliadas y las fibras de las neuronas ganglionares, se estudió la expresión del gen de la glutamato deshidrogenasa (enzima relacionada con la degradación del glutamato) y de las subunidades GluA2, GluA3 y GluA4 de los receptores AMPA de glutamato. La ausencia de GluA1 en la cóclea de la rata adulta comprobada previamente por Kuriyama y cols. (1994) y por Niedzielski y cols. (1995) excluyó esta subunidad de nuestro diseño experimental.

Para explorar el balance de excitación-inhibición en el oído interno, se estudió también la expresión de genes de las subunidades de los receptores GABA. El estudio microiontoforético en la cóclea con agonistas y antagonistas de los receptores GABAA y GABAB, demostró que los GABAA son los que modulan la actividad de las fibras aferentes en la cóclea (Arnold y cols., 1998). Por ello, para nuestro estudio, nos centramos en el análisis de los receptores GABAA. Experimentos previos realizados con RT-PCR para el estudio de la expresión de las subunidades del receptor GABAA en la

cóclea, mostraron un resultado positivo para las subunidades α 1-6, β 1-3 y γ 2 (Drescher y cols., 1993). El estudio mediante técnicas inmunocitoquímicas de la localización de estas subunidades, reveló la presencia de las mismas tanto en neuronas ganglionares como en las regiones cercanas a las CCI y las CCE (Yamamoto y cols., 2002). Dado que este trabajo también mostró la colocalización de las subunidades α y β en la cóclea, en esta tesis se estudió la expresión génica de las subunidades α 1 y γ 2 de los receptores GABAA tras lesión de la corteza auditiva.

Por otra parte, para estudiar el efecto que la ablación cortical provoca en la regulación eferente sobre la actividad del nervio auditivo, se analizó la expresión de los receptores de acetilcolina y dopamina presentes en las neuronas ganglionares. El estudio de la expresión de las subunidades de los receptores de acetilcolina en la cóclea mostró, mediante las técnicas de qPCR e hibridación in situ, resultados positivos para las subunidades α 6, α 7 y β 2 (Morley y cols., 1998). Los autores de este trabajo sugirieron que la acetilcolina liberada por las fibras olivococleares laterales actúa principalmente sobre receptores formados por la subunidad α 7, puesto que no se ha identificado previamente la existencia de un receptor compuesto por el conjunto de las subunidades α 6, α 7 y β 2, y estudios previos han demostrado que receptores formados por las subunidades α 6 y β 2 no son funcionales (ver discusión Morley y cols., 1998). De acuerdo con esto, nosotros seleccionamos el gen de la subunidad α 7 para analizar indirectamente el efecto que la ablación cortical produce sobre la regulación colinérgica llevada a cabo por el sistema eferente lateral.

En cuanto a los receptores de dopamina, un estudio inmunocitoquímico en cobayas mostró la presencia de terminales inmunopositivos para los receptores D1 en la región de las CCI (Beaulieu y Gainetdinov, 2011), mientras que en el ratón, técnicas inmunocitoquímicas similares, mostraron terminales inmunopositivos tanto para el receptor D1 como para el D2 (Maison y cols., 2012). Por otra parte, los estudios en los que se combinó la técnica de RT-PCR con inmunohistoquímica, demostraron la presencia de los cinco tipos de receptores de dopamina (D1-5) en las neuronas ganglionares de la rata (Inoue y cols., 2006), y de todos excepto D3 en el ratón (Maison

y cols., 2012). El estudio de la función coclear utilizando ABRs y emisiones otoacústicas en ratones transgénicos (*knockout*) para cada uno de los receptores de dopamina, mostró cambios en las respuestas cocleares de los mutantes para D1 y D2, pero no en los mutantes para D3, D4 o D5 (Maison y cols., 2012), sugiriendo que sólo los receptores D1 y D2 están relacionados con la función coclear. Los cambios producidos en el potencial de acción compuesto tras inyectar en la cóclea agonistas o antagonistas de D1 y D2 (d'Aldin y cols., 1995b; Ruel y cols., 2001; Niu y Canlon, 2006; Garret y cols., 2011), apoyaron la idea de que son estos dos tipos de receptores los que median la actuación de la dopamina en la cóclea. Por ello, para nuestro estudio de expresión génica seleccionamos los genes que codifican subunidades para los receptores D1 (*Drd1a*) y D2 (*Drd2*).

En la región de las CCI, también se exploraron los cambios en la actividad inducida por calcio mediante el estudio de la expresión génica de la parvalbúmina α , que específicamente se expresa en esta región (Soto-Prior y cols., 1995; Yang y cols., 2004).

Para analizar el efecto que la ablación de la corteza auditiva provoca en la regulación eferente sobre las CCE, se analizó la expresión del receptor de acetilcolina presente en estas células. Los primeros estudios que permitieron determinar su composición se llevaron a cabo mediante inyecciones de ácido ribonucleico (a partir de ahora utilizaremos el término abreviado en lengua inglesa consagrado por el uso- RNA) de las distintas subunidades del receptor de acetilcolina en oocitos de *Xenopus* Levai (Elgoyhen y cols., 1994 y 2001). En estos estudios se mostró que la inyección del RNA de la subunidad $\alpha 10$ en solitario o junto con las subunidades $\alpha 2-6$ ó $\beta 2-4$ no provoca cambios en las corrientes evocadas por acetilcolina. Sin embargo, su inyección junto con la subunidad $\alpha 9$, genera cambios de corriente mayores que los obtenidos con la inyección de la subunidad $\alpha 9$ en solitario y similares a los observados en el receptor endógeno de acetilcolina en las CCE (Elgoyhen y cols., 1994 y 2001). Estos datos llevaron a sus autores a sugerir que la combinación de ambas subunidades ($\alpha 9$ y $\alpha 10$) es la que conforma el receptor de acetilcolina de las CCE, y que la subunidad $\alpha 10$ es la que determina las propiedades del receptor. Por otra parte, la estimulación eléctrica de

las fibras eferentes en ratones transgénicos (knockout) para las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ no mostró la disminución en la amplitud del potencial de acción compuesto o las emisiones otoacústicas que se produce en ratones control (Vetter y cols., 1999, 2007). Además, el registro de las CCE de estos ratones tampoco mostró respuesta alguna frente a la aplicación de acetilcolina (Vetter y cols., 2007). Todo lo cual confirma la idea de que ambas subunidades son las que conforman el receptor de acetilcolina en la región externa del órgano de Corti. Teniendo en cuenta estos estudios, para evaluar el efecto que la ablación cortical produce sobre la regulación eferente del sistema olivococlear medial sobre las CCE, en nuestro estudio analizamos los cambios en la expresión de la subunidad $\alpha 10$ del receptor de acetilcolina.

Por último, la estimulación eléctrica de las fibras olivococleares mediales no sólo produce la hiperpolarización de las CCE a través del receptor de acetilcolina (Housley y Ashmore 1991; Fuchs y Murrow 1992), sino que también reduce la actividad de las fibras aferentes mediante la supresión del movimiento de la membrana basilar (Sridhar y cols., 1997; Murugasu y Russel, 1996; Russel y Murugasu, 1997). Este último efecto se atribuye a cambios en las propiedades electromotrices de las CCE (Dallos y cols, 1997; He y cols., 2003), asociados principalmente a cambios en la proteína motora prestina (Zheng y cols., 2000; Liberman y cols., 2002). Debido a esto, se analizaron también los cambios en la expresión génica de prestina tras ablación cortical, para comprobar el potencial efecto de los cambios en la expresión de los receptores $\alpha 9-10$ sobre la actividad de las CCE.

En resumen, el estudio de los cambios que se producen en la expresión génica de la cóclea tras ablación de la corteza auditiva incluyó genes relacionados con la neurotransmisión excitatoria (glud1, GluA2, GluA3, GluA4 y parvalbúmina α), genes relacionados con la inhibición por GABA ($\alpha 1$ y $\gamma 2$), genes relacionados con la regulación del sistema olivococlear lateral ($\alpha 7$ acetilcolina, Drd1a y Drd2) y genes relacionados con la regulación del sistema olivococlear medial ($\alpha 10$ - acetilcolina y prestina).

MATERIALES Y MÉTODOS

GRUPOS EXPERIMENTALES

En este trabajo se utilizaron 70 ratas Wistar macho, con un peso inicial de 250-300 g. y 12 a 14 semanas de edad. Los estudios se llevaron a cabo cumpliendo las normas y recomendaciones que aparecen en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Gobierno de España (Real Decreto 53/2013 – Ley 32/2007) y de la Unión Europea (Directiva 2010/63/EU) para el Uso de Animales en Investigación en Neurociencias. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron bajo anestesia profunda, minimizando así el sufrimiento de los animales.

De acuerdo con los objetivos planteados en esta tesis, se diseñaron dos abordajes experimentales diferentes basados en el análisis de los efectos de la ablación restringida de las cortezas auditivas. De este modo, por una parte, se analizó el efecto de la ablación cortical sobre la actividad eléctrica evocada del tronco del encéfalo auditivo (mediante el registro de ABRs), y, por otra, se estudiaron los cambios en la expresión de genes relacionados con la regulación cortical en la cóclea (Tabla nº 1). En el primer grupo de experimentos, registro de ABRs, se realizaron diferentes lesiones unilaterales y bilaterales de la corteza auditiva, y se registraron por separado las respuestas auditivas evocadas en ambos oídos. En el segundo grupo de experimentos, dirigidos al estudio de los cambios de expresión génica, se lesionó la corteza auditiva de forma unilateral, y se extrajeron ambas cócleas para analizar, mediante el estudio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa-cuantitativa en tiempo real (utilizaremos desde ahora la abreviatura en lengua inglesa consagrada por el uso - qPCR), los cambios en la expresión de genes relacionados con: la neurotransmisión excitatoria (genes en relación con el metabolismo del glutamato y sus receptores postsinápticos), la neurotransmisión inhibitoria (genes vinculados con los receptores GABA) y genes relacionados con la neurotransmisión del sistema olivococlear eferente (tanto lateral como medial).

Para analizar la evolución temporal de los cambios producidos por las ablaciones corticales (tercer objetivo de esta tesis), cada paradigma de lesión fue analizado en

distintos tiempos de supervivencia post lesión (pl). En el caso de los ABRs, los experimentos se realizaron sobre dos grupos de estudio diferentes: a corto plazo (1 y 7 días pl.) y a largo plazo (15 y 30 días pl.) (Tabla nº 1), para evitar el efecto que pudieran tener múltiples dosis de anestesia sobre los valores de las ondas de los potenciales evocados. Como control de los resultados obtenidos en todos los animales lesionados, esta técnica (ABR) también se aplicó en dichos animales previamente a realizarse la lesión quirúrgica (día 0 Tabla nº 1). En el caso del segundo grupo de experimentos, el análisis de qPCR se llevó a cabo en los días 1, 7 y 15 pl. (Tabla nº 1).

PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.

Lesión de la corteza auditiva.

Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con una mezcla de clorhidrato de Ketamina (30 mg/kg, Imalgene 1000, Rhone Mérieux, Lyon, Francia) y clorhidrato de xilacina (5 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Alemania), y se colocaron sobre una manta térmica con el fin de mantener una temperatura corporal constante. A continuación, se fijaron en un aparato estereotáctico (#900, David Kopf Ins., Tujinga, California, EEUU), manteniendo la posición del cráneo según las indicaciones de Paxinos y Watson (2005), con el fin de situar el punto de referencia interaural y así poder localizar sobre el hueso (*vi*) las coordenadas estereotácticas de la corteza auditiva.

Tras desinfectar el campo quirúrgico con povidona yodada, se expuso la superficie del cráneo realizando una incisión en la piel sobre la línea media. Se retiró el tejido fibroso subyacente y se desinsertó el músculo temporal, del lado izquierdo en el caso de las lesiones unilaterales, y de ambos lados en el caso de las lesiones bilaterales.

A continuación, con la ayuda de un micromanipulador (SM 11, Narishige, Tokio, Japón), se trasladaron a la superficie del hueso temporal 4 coordenadas estereotácticas (dos anteroposteriores y dos laterales), para enmarcar los límites de la corteza auditiva según el atlas de Paxinos y Watson (2005). De acuerdo a estos puntos de referencia, se dibujó en la superficie del hueso un rectángulo que sirvió de guía para la apertura de una ventana ósea con la ayuda de una microfresa. Una vez retirado el hueso, se apartaron

con delicadeza las meninges y se procedió a la aspiración suave y controlada de la corteza auditiva. Terminada la aspiración, se cubrió el trépanos con el hueso extraído, el cual se mantuvo en suero salino frío estéril durante la intervención, se aplicó un hemostático absorbible en la zona lesionada y se procedió a unir los bordes de incisión de la piel con puntos de sutura, colocando sobre la herida un microbicida antiséptico.

Tabla nº 1. Grupos experimentales (n = 70).

Grupo	n	Lesión CA	Supervivencia (días)	Metodología/ Técnica	Fecha Registro (días)	Método de Análisis
1	7	Bilateral	7	ABRs	0, 1 y 7	ANOVA medidas repetidas Pos hoc: Bonferroni y Fisher
2	7	Bilateral	30	ABRs	0, 15 y 30	ANOVA medidas repetidas Pos hoc: Bonferroni y Fisher
3	7	Unilateral	7	ABRs	0, 1 y 7	ANOVA medidas repetidas Pos hoc: Bonferroni y Fisher
4	7	Unilateral	30	ABRs	0, 15 y 30	ANOVA medidas repetidas Pos hoc: Bonferroni y Fisher
5	7	Control anestesia	7	ABRs	0, 1 y 7	ANOVA medidas repetidas Pos hoc: Bonferroni y Fisher
6	7	Control anestesia	30	ABRs	0, 15 y 30	ANOVA medidas repetidas Pos hoc: Bonferroni y Fisher
7	7	Control	----	qPCR	----	ANOVA Pos hoc: Bonferroni y Schefé
8	7	Unilateral	1	qPCR	----	ANOVA Pos hoc: Bonferroni y Schefé
9	7	Unilateral	7	qPCR	----	ANOVA Pos hoc: Bonferroni y Schefé
10	7	Unilateral	15	qPCR	----	ANOVA Pos hoc: Bonferroni y Schefé

ABRs: Respuestas Auditivas evocadas del Tronco del Encéfalo; **CA:** Corteza auditiva; **qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa-cuantitativa en tiempo real.

Tras la cirugía, los animales se colocaron de nuevo en sus jaulas y se monitorizó su proceso de recuperación, permitiendo el acceso libre a agua y comida. Durante todo el tiempo de supervivencia se comprobó periódicamente el estado de salud de los animales y su estabulación, siguiendo las normas dictadas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, acordes a la normativa de la Unión Europea en esta materia.

ESTUDIO CITOARQUITECTURAL PARA DETERMINAR LA LOCALIZACIÓN Y EXTENSIÓN DE LAS LESIONES EN EL CÓRTEX CEREBRAL.

Fijación y corte

En los animales en los que se realizó el estudio electrofisiológico, tras inyectar una sobredosis por vía intraperitoneal de Pentobarbital sódico al 6% (60 mg/kg) como anestesia, se procedió a la apertura de la caja torácica para llevar a cabo la perfusión transcardíaca (vía aorta) de 300 ml de una solución buffer de lavado (Ringer con pH 6.9 a 36°C que contenía heparina 0.01%), seguido de la perfusión de 1 litro de paraformaldehído al 4%. Una vez finalizada la perfusión, se extrajeron los cerebros del cráneo y se sumergieron en la misma solución fijadora durante dos horas, antes de ser crioprotectados por inmersión en sacarosa al 30% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4° C durante 48 horas.

En el caso de los animales destinados al análisis de la expresión génica (qPCR), tras inyectar una sobredosis por vía intraperitoneal de Pentobarbital sódico al 6% (60 mg/kg), se procedió a la decapitación y extracción de ambas cócleas, siendo congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas hasta su uso a -81°C. Seguidamente, los cerebros fueron extraídos cuidadosamente del cráneo y sumergidos en paraformaldehído al 4% para su ulterior estudio histológico.

En ambos abordajes experimentales los cerebros fueron tallados en un molde coronal con ranuras de 1 mm (69026-Coronal RBM, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, EEUU), para definir planos de corte semejantes en todos los casos experimentales. Después se realizaron secciones en serie de 40 µm con un

micrótopo de congelación (HM 430 Sliding, MICROM International, Walldorf, Alemania), recogiendo secuencialmente los cortes obtenidos en diez pocillos que contenían una solución de PB 0.1 M, pH 7.4, para facilitar el posterior montaje de las secciones en los portaobjetos de forma ordenada en sentido rostro caudal.

Los pocillos con las muestras fueron seleccionados de forma alterna para realizar inmunocitoquímica para Glutamato decarboxilasa (abreviatura en inglés consagrada por el uso – GAD), Parvalbúmina (abreviatura en inglés consagrada por el uso – Pv) o ser teñidos con violeta de cresilo.

Inmunocitoquímica para GAD y Pv.

Tras lavar las secciones con TBS 0.05 M pH 7.6, se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena mediante la incubación con Metanol al 10% más H₂O₂ al 3% en tampón fosfato; posteriormente se realizaron 3 lavados de 15 min con TBS-Tx pH 7.6 en agitación continua, y se bloqueó el marcaje no específico con suero bovino fetal (10%) en el caso de la Pv, y con suero de caballo (3%) en el caso de GAD.

Posteriormente, las secciones se incubaron a 4°C durante 48 horas con el correspondiente anticuerpo primario, monoclonal obtenido en conejo contra glutamato descarboxilasa GAD-67 (AB-108, Chemicon/Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU) a una concentración 1:1000 en TBS-Tx, y el anticuerpo policlonal, también obtenido en conejo, anti Parvalbumina (PV28, Swant Antibodies, Marly, Suiza), a concentración 1:5000 en TBS-Tx. Nuevamente se lavaron los cortes con TBS-Tx pH 7.6 (3 x 10 min.) y, a continuación, para ambos casos, se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado anticonejo (Biotinylated anti-rabbit IgG H+L, BA-1000; Vector Labs., Burlingame, CA, EEUU) a una concentración 1:200 en TBS-Tx durante 120 min a temperatura ambiente. Después se lavaron de nuevo con TBS-Tx, y se incubaron en el complejo avidina-biotina (ABC, Vector-Vectastain Standard Kit PK 4000) durante 90 min a temperatura ambiente.

Finalmente, la reacción de la peroxidasa se hizo visible con DAB en Tris-HCl 0.05M a pH 7.6. Como control negativo, se incubaron secciones sin anticuerpos primarios para comprobar la especificidad de los sistemas de detección.

Tinción de Nissl

Tal y como se ha mencionado anteriormente, se seleccionó uno de cada tres pocillos para teñir las muestras con violeta de cresilo al 1% (C-1791; Sigma-Aldrich) durante 10 min. Los cortes se diferenciaron con alcohol 96°+ácido acético, se deshidrataron en un gradiente creciente de alcoholes (de 50° a 100°) y fueron aclarados con xileno. A continuación se montaron en portaobjetos gelatinizados 0.2%.

Localización de las lesiones.

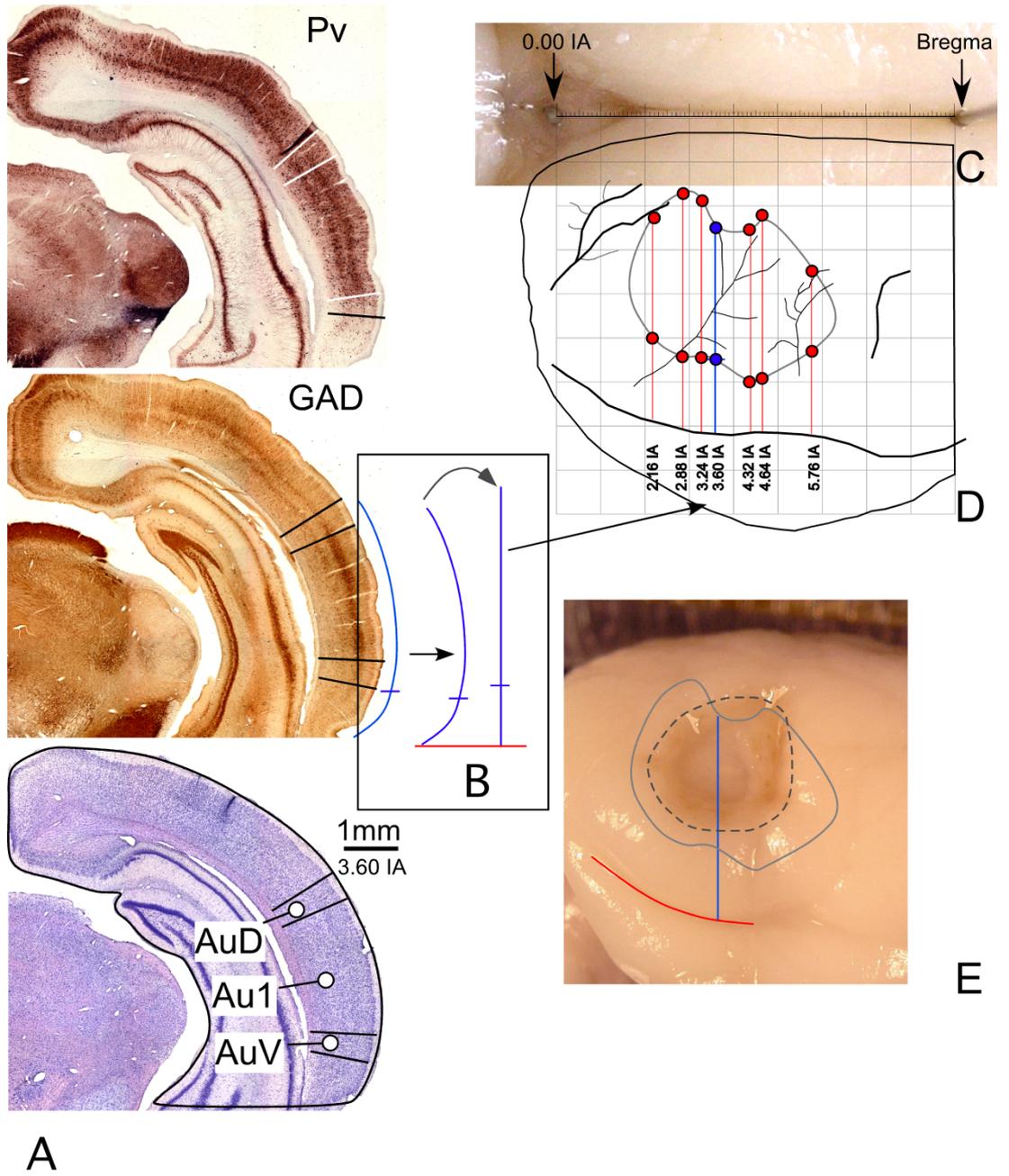
Para determinar el índice de retracción de los cerebros lesionados tras la fijación y el corte, se utilizaron dos animales control adicionales en los que, siguiendo el mismo procedimiento quirúrgico descrito para las lesiones, se abrió una ventana longitudinal en la línea media de la superficie del cráneo, con el objeto de insertar en el cerebro, con la ayuda del micromanipulador, dos agujas separadas por un milímetro de distancia. Asimismo, se colocaron sendas agujas en los puntos de referencia bregma e interaural 0 siguiendo las coordenadas de Paxinos y Watson (2005) (Fig. 1C), para la posterior verificación de las coordenadas en los mapas de las lesiones. A continuación, se extrajo cuidadosamente del cráneo el cerebro con las agujas, y se fijó uno de los animales por perfusión y el otro por inmersión, ambos con paraformaldehído al 4%, según los protocolos establecidos en el epígrafe de fijación y corte (vs).

Una vez fijados, la superficie lateral de los cerebros fue fotografiada con una cámara Nikon situada a 21 cm de altura. La fotografía fue superpuesta sobre una gradilla de 9x9 mm utilizando el programa Canvas X, al efecto de analizar las coordenadas de referencia (Bregma e interaural 0) en la superficie del cerebro (Fig. 1C y D).

Se analizaron con microscopía óptica las secciones de los controles de coordenadas inmunoteñidas para GAD y Pv, y las teñidas con el método de Nissl, para determinar los patrones citoarquitecturales característicos de la corteza auditiva, contrastándolos con los propuestos en el atlas de Paxinos y Watson (2005). Con el objeto de construir mosaicos de alta definición, las secciones correspondientes a los

Figura 1. Procedimiento de localización de las lesiones en el cerebro de la rata. **A.** Secciones coronales del mismo nivel rostro-caudal (similar al 3.60 de Paxinos y Watson, 2005) teñidas para Parvalbúmina (Pv), Glutamato Descarboxilasa (GAD) y Nissl. En las secciones inmunoteñidas, las células piramidales positivas para la inmunotinción y el neuropilo de las capas III y V permitieron definir los límites de la Corteza Auditiva (indicados con líneas en las imágenes de los cortes). **B.** Dibujo del contorno de la sección con los límites de la Corteza Auditiva marcados. A la derecha, una línea recta con el mismo perímetro que la línea curva. Tras escalar la línea para compensar la contracción de la sección, las coordenadas fueron transferidas a la imagen macroscópica del cerebro. **C.** Imagen de la línea media del cerebro con las agujas implantadas en las coordenadas estereotácticas interaural 0 y bregma. **D.** Mapa de la corteza auditiva una vez trasladados los límites de las coordenadas de siete niveles rostrocaudales. **E.** Superposición del mapa de coordenadas de la corteza auditiva con la imagen de un cerebro lesionado, para calcular la extensión y localización de la superficie lesionada.

AuD: Corteza Auditiva Dorsal; **Au1:** Corteza Auditiva Primaria; **AuV:** Corteza Auditiva Ventral



niveles interaurales 2.16, 2.88, 3.24, 3.60, 4.32, 4.64 y 5.76 (Paxinos y Watson, 2005) fueron fotografiadas con el objetivo de 10x/0.40 en un microscopio Leika DMRB, que cuenta con una platina motorizada Märzhäuser SCAN-series XYZ controlada por el programa Neurolucida (Microbrightfield Inc., Williston, VT, EEUU). Sobre las imágenes panorámicas así obtenidas, se identificaron con claridad los cambios citoarquitecturales que permiten establecer los límites de las cortezas auditivas (Fig. 1A).

Usando la fisura rinal como referencia, se trasladaron las distancias entre los límites de la corteza auditiva a la imagen de la superficie del cerebro según el procedimiento resumido gráficamente en la Fig. 1D y E. Se utilizó la herramienta *dimensioning perimeter* del programa Canvas X para compensar el error de la curvatura del cerebro y así poder superponer con precisión los límites a la gradilla con el fin de configurar un mapa citoarquitectural de superficie de las cortezas auditivas (Fig. 1B).

El mapa resultante (Fig. 1D) se superpuso con las fotografías de la superficie lateral de los cerebros lesionados (Fig. 1E), y se calculó el porcentaje de lesión respecto al área ocupada por la corteza auditiva.

REGISTRO DE LAS RESPUESTAS AUDITIVAS EVOCADAS DEL TRONCO DEL ENCÉFALO (Auditory Brainstem Responses – ABRs)

La estimulación sonora para la inducción de los potenciales evocados se llevó a cabo en un campo cerrado, creado mediante la colocación de un tubo de vinilo dentro del conducto auditivo acoplado a un altavoz (Tucker-Davis Technologies [TDT], Alachua, Florida, EEUU), y situándolo a una distancia de 1mm de la superficie del tímpano con la ayuda de una pieza de metacrilato hueca diseñada por nuestro laboratorio (Fig. 2).

El registro de los potenciales evocados se llevó a cabo utilizando un equipo para el procesamiento de señal en tiempo real TDT system 3 (Tucker-Davis Technologies [TDT], Alachua, Florida, EEUU). Para los experimentos, los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con una mezcla de clorhidrato de ketamina (30 mg/kg, Imalgene 1000, Rhone Méreuse, Lyon, Francia) y clorhidrato de xilacina (5 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen,

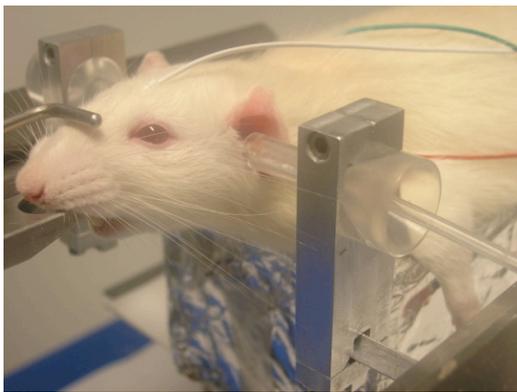


Fig. 2. Fotografías que muestran la disposición del animal sobre el aparato estereotáctico con la ayuda de las barras de metacrilato, durante los registros de potenciales evocados. Las barras huecas permiten introducir el tubo de PVC, que está acoplado al altavoz, hasta una distancia de 1 milímetro de la membrana timpánica, sin dañarla, creando así un ambiente de campo cerrado.

Alemania), y colocados en un aparato estereotáctico usando dos barras huecas de metacrilato (Fig. 2). A continuación, se colocaron subcutáneamente los electrodos de registro activo, referencia y tierra, en el vértex, la mastoides ipsolateral y la mastoides contralateral al oído estimulado (respectivamente), siguiendo las indicaciones de Cediell y cols (2006).

El estímulo se construyó sobre una ventana temporal de 5 milisegundos, con un período pre-estímulo de 1 milisegundo, y consistió en un sonido click de polaridad alternante de 0.1 milisegundos, a una velocidad de repetición de 11 veces por segundo, presentado gradualmente en pasos ascendentes de diez decibelios, desde una intensidad de 10 dB SPL hasta una de 90 dB SPL.

Finalmente, las respuestas fueron amplificadas y digitalizadas usando el pre-amplificador Medusa RA16PA y el amplificador RA4LI (Tucker-Davis Technologies, Alachua, Florida, EEUU), y la señal final fue filtrada con un filtro de paso alto de 500 Hz y otro de paso de bajo de 3000 Hz. Se presenta un ejemplo de uno de los registros obtenidos en la Figura 3.

Para el análisis de los potenciales evocados, se determinaron los siguientes parámetros: umbral de la respuesta evocada al sonido, amplitud de cada una de las cuatro ondas reconocibles en el registro (en microvoltios), latencia de la onda I respecto al comienzo del estímulo (en milisegundos) y latencias entre las cuatro ondas (en milisegundos). El umbral detectable por ABRs se valoró como la intensidad sonora capaz de evocar una amplitud mayor a la del ruido de fondo + 2 veces la desviación estándar de la media, en milivoltios. La amplitud de onda se consideró como la suma del valor del pico positivo y el valor del pico negativo. Las latencias entre las ondas fueron determinadas como la distancia entre los picos positivos de las distintas ondas (I-II, II-III, III-IV y I-IV). Los valores de amplitud y latencia fueron calculados de los registros obtenidos a la intensidad de 80 dB SPL.

En el cálculo de las latencias se tuvo en cuenta que la velocidad del sonido para que el estímulo llegue hasta la membrana timpánica en un tubo de vinilo de 24 cm de longitud como el usado, es de 0.75 milisegundos. Este retraso fue añadido al

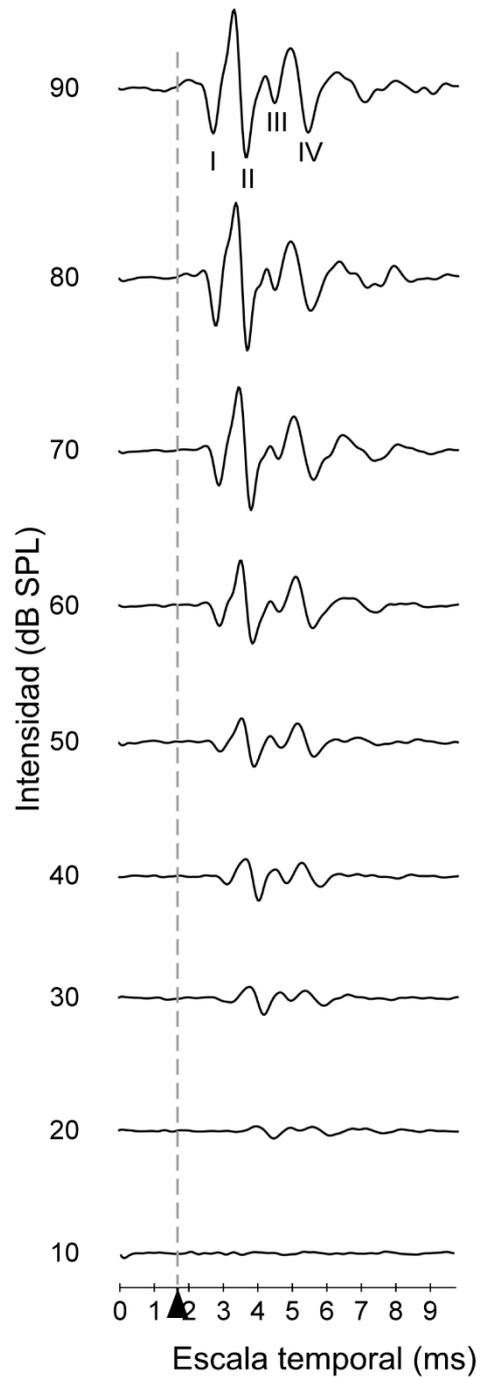


Figura 3. Ejemplo de la morfología de las ondas obtenidas en los registros de potenciales evocados desde de 10 dB SPL hasta 90 dB SPL para los primeros 10 ms de registro. El comienzo del estímulo se sitúa en los 1.7 ms, y las ondas comienzan a ser visibles entre los 20 y 30 dB SPL, lo normal en las ratas. Nótese, que de acuerdo a la literatura (Alvarado et al., 2012), la onda II es las más grande, mientras que la III es la más pequeña.

milisegundo del período pre-estímulo para determinar el comienzo del estímulo (1.75 milisegundos), y poder calcular las latencias después.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR

Extracción de RNA

La purificación del ácido ribonucleico (RNA) total de las cócleas congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -81°C se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIZOL[®] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EEUU) y una columna del mini kit RNeasy (Qiagen, Valencia, EEUU). Para ello, se añadieron 1 ml de Trizol a cada una de las cócleas y se homogeneizaron utilizando un Brinkman Polytron. Tras incubarlo durante 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol y se centrifugó a 12000 xg durante 15 min a 4°C . Se extrajo cuidadosamente la fase acuosa superior del producto obtenido tras la centrifugación y se le añadió 0.5 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol usado en el primer paso. Seguidamente, la mezcla se homogeneizó, se centrifugó a 12000 xg durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado resultante se le añadió 1 ml de etanol (almacenado a -20°C) al 75% y se centrifugó a 7500 xg durante 5 min a 4°C . A continuación, se eliminó de nuevo el sobrenadante y se dejó secar el precipitado de RNA durante unos minutos. Finalmente, el RNA fue resuspendido en 20 μl de agua MilliQ libre de RNasas e incubado a 60°C durante 10 min para favorecer su disolución.

La concentración de RNA purificado se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, EEUU). Cada muestra de RNA fue evaluada tres veces, de modo que el valor de la concentración se estableció con el promedio de las mismas. Por su parte, la "calidad" del RNA fue evaluada en un RNA 6000 NanoLabChip (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU), usando un Agilent 2100 Bioanalyzer, para comprobar la integridad de las bandas de RNA ribosómico 18S y 28S, y un número de integridad (RIN), el cual el significado con valor 0 correspondería a un RNA totalmente degradado y el valor 10 a un RNA íntegro. Las muestras utilizadas en este estudio tuvieron un valor de RIN de al menos 8.0, cumpliendo así uno de los

requisitos indispensables para que un experimento de qPCR sea satisfactorio (Fleige y cols., 2006).

Transcripción reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa o *real time* (RT-qPCR)

Para llevar a cabo la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) a partir del RNA purificado, se utilizó el kit ImProm-II (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente se desnaturalizó a 70°C un volumen de hasta 10.1 µl de RNA total (dependiendo de la concentración de cada muestra) y 1 µl de oligo-dT durante 5 min, tras lo cual se enfrió a 4°C durante 10 min. Seguidamente, se añadió una mezcla que contenía 4 µl de 5x Buffer, 1 µl de la enzima transcriptasa inversa ImProm-IITM, 2.4 µl de MgCl₂ 1 mM, 1 µl de una mezcla de dNTP (dexosinucleótidos trifosfato) 0.5 mM, 0.5 µl del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNasin[®] y agua MilliQ libre de RNasas hasta un volumen final de 20 µl. A continuación, la reacción se sometió a tres pasos: (i) 5 min a 25°C para que el oligo-dT se anille con el RNA molde, (ii) 60 min a 42°C para que la retrotranscriptasa sintetice el cDNA, y (iii), 15 min a 70°C para que los heteroduplex RNA-cDNA que pudieran quedar se desnaturalicen. En todas las retrotranscripciones se incluyeron los correspondientes controles negativos como por ejemplo una reacción sin RNA molde u otra sin la propia retrotranscriptasa.

Por su parte, la PCR cuantitativa se llevo a cabo según el método de SYBR-Green con un 2xMáster Mix (Applied Biosystems). Cada reacción contuvo 10 µl del propio Máster Mix, 0.8 µl de cada pareja de cebadores a una concentración de 10 mM (tabla 2), 3 µl de cada muestra de cDNA a la concentración adecuada para cada gen estudiado, y agua MilliQ hasta completar un volumen de 20 µl. La reacción de amplificación tuvo lugar en el equipo ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 10 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C, ésta última temperatura podrá variar ligeramente dependiendo de cada pareja de cebadores. Cada experimento se llevo a cabo dos veces, y en cada placa se realizaron

triplicados para cada muestra. El gen endógeno β -actina se utilizó como gen *housekeeping*.

Para representar los datos de forma cuantitativa, se utilizó el método comparativo del ciclo umbral (Ct) (Schmittgen y Livak, 2008). Tras la eliminación de los valores atípicos, los datos en bruto de fluorescencia se utilizaron para determinar la eficiencia (E) de la amplificación de la PCR de acuerdo a la fórmula $E = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] * 100$. Todas las amplificaciones tuvieron un valor E de $100 \pm 10\%$, donde el valor E cercano al 100% es un indicador de la eficiencia de la amplificación. El valor de expresión génica relativa (*fold change*) para cada transcrito, fue calculado de acuerdo a la ecuación $E^{-(\Delta Ct \text{ "condición 1"} - \Delta Ct \text{ "condición 2"})}$, donde "condición 1" corresponde a las muestras experimentales (1,7 y 15 días post lesión), "condición 2" a las muestras de los animales control, y ΔCt de cada "condición" es $Ct_{\text{"gen experimental"}} - Ct_{\text{"gen endogeno"}}$ (Schmittgen y Livak, 2008; Livak y Schmittgen, 2001). Además se calculó el desviación estándar para cada valor de expresión génica relativa, como medida de la variación de los datos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el programa SPSS-IBM, versión 20 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos de América). En el caso de los registros de los potenciales evocados, las diferencias entre los grupos fueron examinadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas, usando el test de Levene para el análisis de homogeneidad de la varianza, seguido del test Fisher's Least Significant Difference (LSD) para la comparación post hoc, cuando fue necesario, o el test de Greenhouse-Geisser (no homogeneidad de varianzas) y el test de Bonferroni (comparación dos a dos). Todos los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media (SEM). El porcentaje de cambio de amplitud y latencia (Alvarado et al., 2007) se calculó usando la fórmula: $[(\text{Valor post lesión} - \text{Valor pre lesión}) / \text{Valor pre lesión}] * 100$. La onda V fue excluida de este estudio porque no fue encontrada en ninguno de los registros de potenciales evocados. La comparación ipsilateral versus contralateral para un mismo grupo experimental se analizó con un test t de Student.

En el caso de los datos de la Transcripción reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa o *real time* (qPCR), las diferencias fueron examinadas mediante un ANOVA de una vía y los test de Scheffe y Bonferroni como post hoc. Los datos se mostraron como media \pm desviación estándar de la media.

En ambos abordajes experimentales, las diferencias fueron consideradas significativas para un valor de $p < 0.05$.

Tabla nº 2. Cebadores de RT- qPCR para los genes estudiados

Gen Diana	Numero GenBank	Cebador Forward	cDNA Forward*	Cebador Reverse	cDNA Reverse*	Tamaño productos	pendiente	E**	R ²
B-act	NM_031144	AGCCATGTACGTAGCCATCC	468-488	ACCCTCATAGATGGGCACAG	563-582	115	-3.15	107.4	0.996
Chrna10	NM_022639	CCTCACCTATGGCTGCTGCT	702-721	GCCAGCAGGGAGATGAACAC	805-824	123	-3.03	113.8	0.993
Prestina	NM_030840	GATTGGAGGTGTGGCCTGTCC	429-448	ACGGACATGGCGACTTTGAC	526-545	117	-3.11	109.6	0.995
GluA2	NM_017261	CGGCAGCTCAGCTAAAAACT	173-192	TTGTAGCTGGTGGCTGTTGA	243-262	90	-3.11	109.4	0.997
GluA3	NM_032990	ATTGCTGATGGTGCAATGAC	2834-2853	TTTGCATTGTCGCAAGTCTC	2909-2928	95	-3.07	111.5	0.994
GluA4	NM_017263.2	GGCAGAGCCGTCTGTGTTCA	2255-2275	CAGGGCTTTCGCTGCTCAAT	2361-2380	126	-3.13	108.2	0.997
Glud1	NM_012570	AATTCTGGGCTTCCCCAAAG	1131-1151	CTGGGTGCATTGGA TTTGGT	1225-1244	114	-3.23	103.7	0.997
Pvalb	BC126090	TGCAGACTCCTTCGACCACA	75-94	AATGGACCCCAGCTCATCCT	194-213	139	-3.13	108.5	0.999
Chrna7	NM_012832.3	ACAGTAACCATGCGCCGTA	283-302	TGCAGGCAGCAAGAATACCA	364-383	101	-3.20	105.2	0.994
Drd1a	NM_012546	GTGCTCTACGGCGTCCATTC	371-392	TGGGGGTCATCTTCCTCTCA	449-468	98	-3.18	106.1	0.984
Drd2	NM_012547.1	TGATTGCAACATCCCACCAG	1546-1565	GCGGAACTCGATGTTGAAGG	1651-1632	87	-3.01	114.7	0.981

(*)Localización del cebador en las secuencias para la rata del GenBank

RESULTADOS

LOCALIZACIÓN Y TAMAÑO DE LAS LESIONES EN EL CÓRTEX CEREBRAL

El área de lesión de los animales con ablación de la Corteza auditiva (Tabla nº 1), fue analizada siguiendo un método de superposición de imágenes macroscópicas de los cerebros con un mapa de coordenadas diseñado a partir de secciones histológicas inmunotefidas para Pv, GAD y Nissl, y con la ayuda del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2005) (ver Material y Métodos y Fig. 1). Como condiciones previas para incluir un experimento en este estudio se consideraron válidos para el análisis solamente aquellos casos en los que, como mínimo, el 50% de la Corteza auditiva fuera lesionada y no se viera afectada la sustancia blanca subyacente a la zona de aspiración. Se observó que las lesiones de los casos seleccionados para el análisis afectaban más del 60% del área total de las cortezas auditivas (Tabla nº 3).

Tabla nº 3. Resultados de los porcentajes de Corteza auditiva (CA) afectados por la lesión en los grupos experimentales 1 a 4 y 8 a 10.

Grupo	n	Lesión CA	Super- vivencia (días)	Grupo Corto/largo Plazo pl.	Metodología/ Técnica	% lesión CA izquierda	% lesión CA derecha
1	7	Bilateral	7	Corto	ABRs	75.39 ± 10.50	75.00 ± 06.88
2	7	Bilateral	30	Largo	ABRs	73.80 ± 08.42	70.34 ± 15.04
3	7	Unilateral	7	Corto	ABRs	84.37 ± 04.99	-----
4	7	Unilateral	30	Largo	ABRs	75.36 ± 10.39	-----
8	7	Unilateral	1	Corto	qPCR	71.79± 08.33	-----
9	7	Unilateral	7	Corto	qPCR	76.81 ± 09.24	-----
10	7	Unilateral	15	Largo	qPCR	72.99 ± 05.27	-----

CA: Corteza auditiva; **ABRs:** Respuestas Auditivas evocadas del Tronco del Encéfalo; **qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa-cuantitativa o real time; **pl:** post lesión.

Histológicamente, se apreciaron escasos infiltrados inflamatorios en los bordes de las zonas de lesión y una reacción glial en los márgenes de una extensión de entorno a 200 a 300 micras (Fig. 4). Aunque la mayor parte de lesión en todos los casos estuvo circunscrita a los límites de la Corteza auditiva, también se afectaron levemente las cortezas adyacentes, fundamentalmente somato-sensorial y visual (Fig. 4).

REGISTRO DE LAS RESPUESTAS AUDITIVAS EVOCADAS DEL TRONCO DEL ENCÉFALO

El estudio de los potenciales evocados se llevó a cabo para evaluar el estado funcional de los núcleos de la vía auditiva baja, a diferentes tiempos (corto y largo plazo) post-lesión (pl.) (Tabla nº 1), después de lesionar bilateral o unilateralmente la Corteza auditiva. Se midió el umbral, las amplitudes y latencias de las ondas evocadas tras estimular con un sonido según el protocolo descrito en el apartado de material y métodos.

Análisis de los umbrales auditivos

Antes de la cirugía, la media de los umbrales de los potenciales evocados de los animales que posteriormente se lesionaron bilateralmente fue de 11.29 ± 1.23 dB SPL en el grupo de corto plazo pl. (grupo 1), y 15.97 ± 1.49 dB SPL en el grupo de largo plazo pl. (grupo 2). Tras la cirugía, el umbral de los animales del grupo a corto plazo aumentó a 14.50 ± 1.00 dB SPL en el día 1 pl., y a 16.93 ± 1.73 dB SPL en el día 7 pl.; mientras que los animales del grupo a largo plazo mostraron unos umbrales similares a los de la condición pre lesión tanto a 15 como a 30 días pl. (14.70 ± 0.95 y 14.78 ± 0.86 dB SPL respectivamente). El aumento porcentual en el umbral de un 28.43% y un 49.95% en los días 1 y 7 días pl., respectivamente, fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$, $F = 3.660$, $gl = 2$) respecto a la condición pre-lesión, mientras que los cambios en el umbral a 15 y 30 días pl., no fueron significativos.

En el caso de los animales lesionados unilateralmente, los registros se dividieron en aquellos en los que se estimuló el oído ipsilateral a la lesión y aquellos en los que se estimuló el oído contralateral a la lesión. Cuando el oído ipsilateral fue estimulado, los animales del grupo a corto plazo pl. mostraron un umbral antes de la cirugía de 19.72 ± 1.23 dB SPL, y los

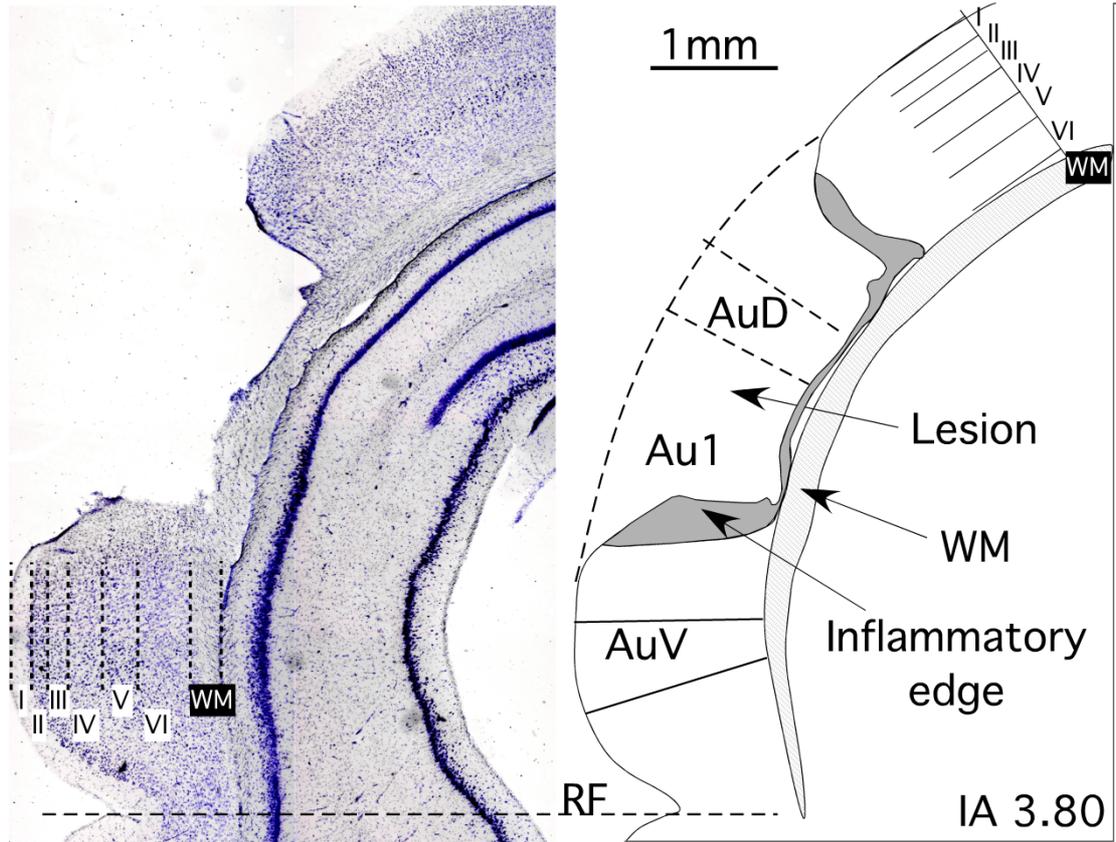


Figura 4. Ejemplo de sección procedente uno de los animales que recibieron lesiones en la Corteza Auditiva. A la izquierda, imagen pocedente de una sección histológica teñida con Nissl que muestra el área de lesión y las distintas capas corticales del área subyacente. A la derecha, un dibujo correspondiente al área interaural de la sección (IA. 3.80, Paxino y Watson, 2005), que muestra las distintas subdivisiones corticales afectadas por la lesión. Nótese que la lesión abarca todas las capas de la corteza pero no la sutancia subyacente.

RF: Fisura rhinal; **WM:** sustancia blanca; **AuD:** Aorteza Auditiva Dorsal; **Au1:** Corteza Auditiva primaria; **AuV:** Corteza Auditiva Ventral; **IA:** Inter Aural.

animales del grupo de largo plazo pl. de 18.47 ± 2.28 dB SPL. Tras la lesión, los umbrales fueron de 14.53 ± 2.72 dB SPL en el día 1 pl., de 14.01 ± 1.29 dB SPL en el día 7 pl., de 19.46 ± 3.85 dB SPL en el día 15 pl., y de 17.62 ± 2.41 dB SPL en el día 30 pl. La estimulación en el oído contralateral a la lesión mostró un umbral antes de la lesión de 12.61 ± 1.73 dB SPL en los animales del grupo corto plazo pl. y de 13.13 ± 1.64 dB SPL en los animales del grupo a largo plazo pl. Tras la cirugía, los umbrales fueron de 14.63 ± 2.57 dB SPL en el día 1 pl., de 14.47 ± 0.87 dB SPL en el día 7 pl., de 13.31 ± 0.76 dB SPL en el día 15 pl., y de 15.54 ± 0.78 dB SPL en el día 30 pl. Cuando se evaluaron estadísticamente los datos, no se encontraron diferencias significativas a ningún tiempo post lesión, independientemente del oído usado para la estimulación.

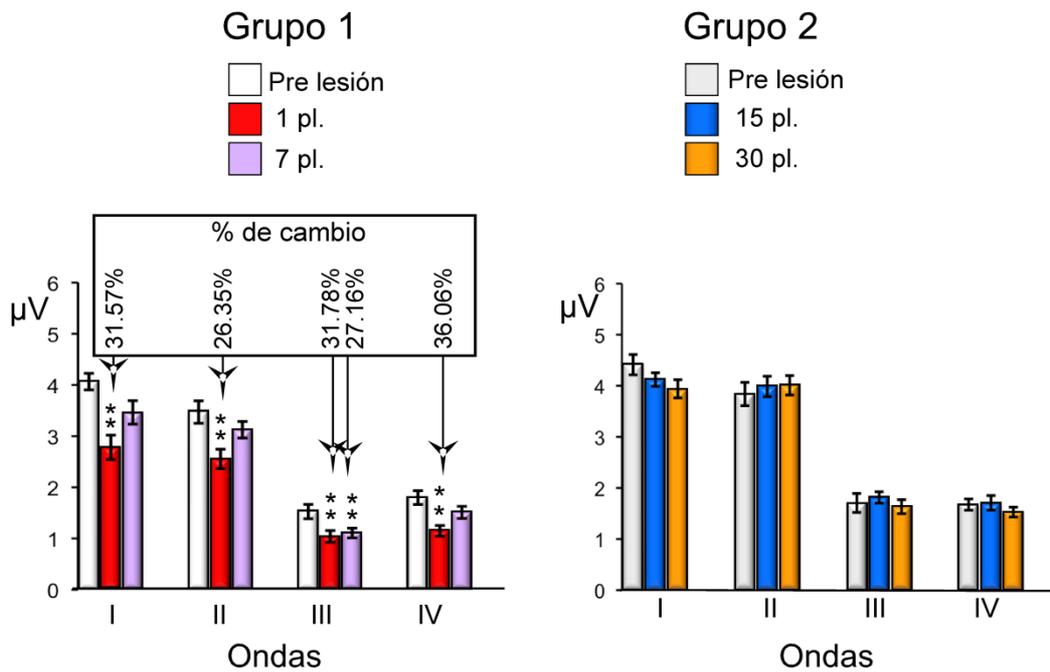
Análisis de las amplitudes de las ondas

Cuando se evaluaron los datos de amplitud de las ondas en los animales lesionados bilateralmente, se observó un descenso significativo en el día 1 pl. en todas las ondas de los potenciales evocados (I a IV) del grupo de animales lesionados a corto plazo (grupo 1) ($p < 0.01$). La onda I mostró un descenso del 31.57% ($gl = 2$; $F = 13.842$), la onda II del 26.35% ($gl = 2$; $F = 9.216$), la onda III de 31.78% ($gl = 2$; $F = 21.097$) y la onda IV del 36.06% ($gl = 1.359$; $F = 14.015$) (Fig. 5). La onda III también mostró un descenso estadísticamente significativo del 27.16% siete días después de la lesión, mientras que los cambios de las ondas I, II y IV para esta condición experimental no fueron significativos. Cuando se evaluaron los datos de amplitud de las ondas del grupo a largo plazo (grupo 2), se observó que presentaban unos valores tras la cirugía similares a los de la condición pre lesión, y no se encontraron cambios significativos respecto al control ni a 15 ni a 30 días pl. (Fig. 5).

En los animales lesionados unilateralmente, tras estimular el oído ipsilateral, el grupo a corto plazo (grupo 3) mostró un descenso en la amplitud de las ondas en el día 1 pl. (Fig. 6A). Esta condición experimental mostró un descenso significativo para la onda I del 34% ($p < 0.05$; $gl = 2$; $F = 6.759$), para la Onda II del 37.57% ($p < 0.01$; $gl = 2$; $F = 17.294$), para la onda III del 37.57% ($p < 0.05$; $gl = 2$; $F = 5.565$) (Fig. 6A). Sin embargo, el descenso de amplitud de la onda IV no fue estadísticamente significativo (Fig. 6A). En el grupo a largo plazo (grupo 4), no se encontraron cambios significativos respecto al control ni a 15 ni a 30 días post-lesión (Fig. 6A).

Lesionados Bilateralmente

Amplitudes de las ondas del ABR (μV)



Lesiones Unilaterales

Amplitudes de las ondas del ABR (μV)

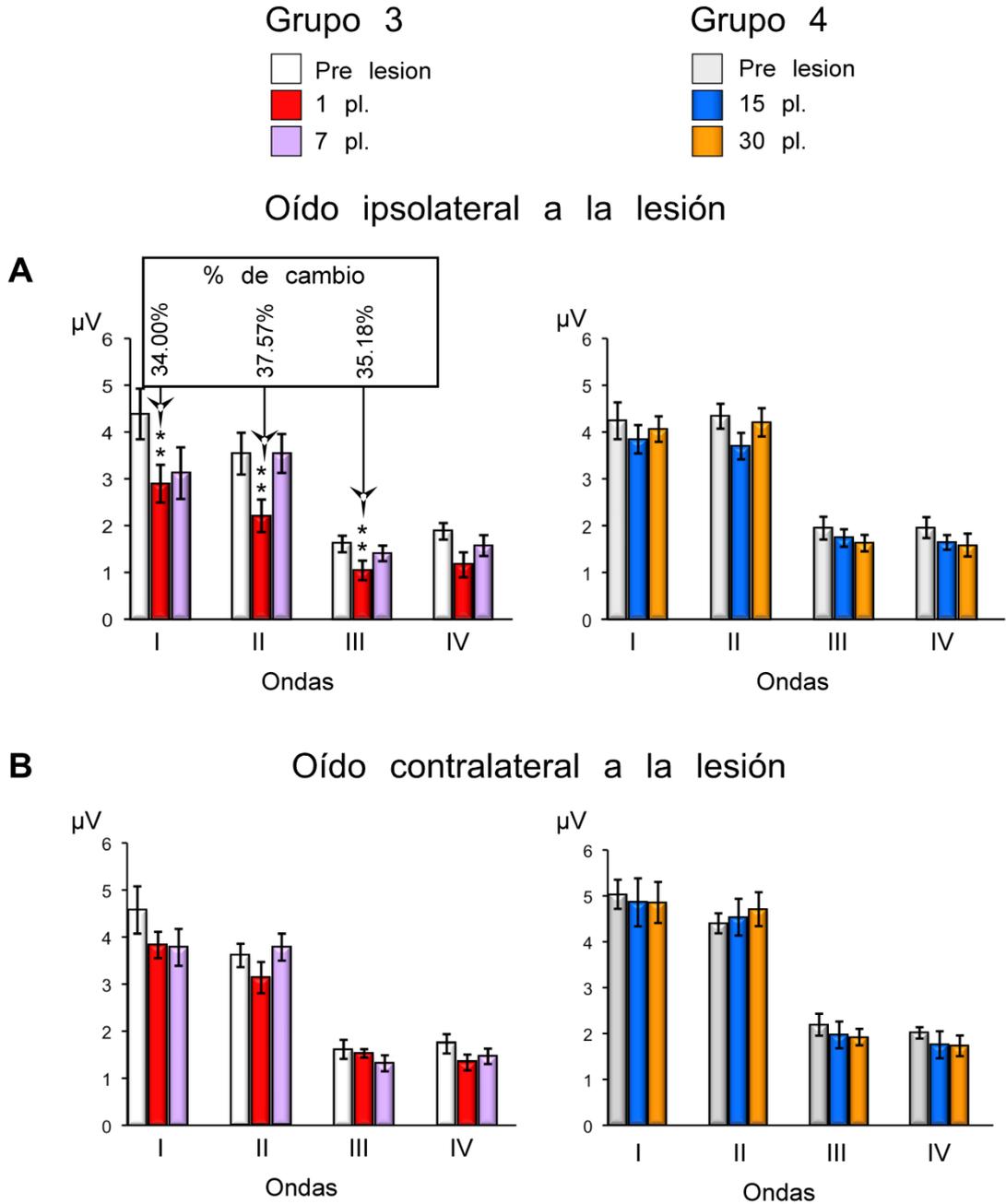


Fig. 6. Cambios en las amplitudes de los ABRs de los grupos 3 y 4 de los animales lesionados unilateralmente. A. Amplitudes correspondientes al oído ipsilateral a la lesión. **B.** Amplitudes correspondientes al oído contralateral a la lesión. En los gráficos se representa la media \pm SEM en microvoltios (μV). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. Nótese que todos los valores de amplitudes descienden respecto a la condición pre lesión en el grupo a corto plazo post lesión (días 1 y 7), y que no hay cambios en el grupo a largo plazo post lesión (días 15 y 30). En el recuadro se indica el porcentaje de cambio respecto al control (Alvarado y cols., 2007).

Cuando se evaluaron los datos de amplitud de las ondas del oído contralateral a la lesión, se observó que los valores tras la cirugía eran similares a los de la condición pre lesión, no encontrándose por tanto cambios significativos a ningún tiempo pl. (Fig. 6B).

Análisis de los tiempos de latencia de las ondas

Cuando se evaluaron los datos de latencia de onda I y latencia entre ondas I-II, II-III, III-IV y I-IV en el grupo a corto plazo de los animales lesionados bilateralmente (grupo 1), tras la cirugía no se encontraron diferencias significativas respecto a la condición pre lesión a ningún tiempo pl. (Fig. 7). Sin embargo, se observó un acortamiento de latencias en los animales del grupo a largo plazo (15 y 30 días) (Fig. 7). Esta condición experimental mostró un descenso significativo en la latencia de la onda I del 4.09% en el día 15 pl. y del 4.67%, en el día 30 pl. ($p < 0.01$; $gl = 2$; $F = 10.458$); y un acortamiento significativo del 6.49% en la latencia de las ondas I-II en el día 15 pl., y del 4.56 % en el día 30 pl. ($p < 0.05$; $gl = 2$; $F = 8.100$) (Fig. 7). Además, las latencias entre las ondas II-III y I-IV fueron también más cortas en el día 30 pl. siendo el acortamiento de un 6.20% para las ondas II-III ($p < 0.05$; $gl = 2$; $F = 4.683$), y de un 6.63% para las ondas I-IV ($p < 0.05$; $gl = 2$; $F = 10.81$) (Fig. 7). Por el contrario, la latencia entre las ondas III-IV no mostró ningún cambio significativo en los días 15 y 30 pl. (Fig. 7).

En el caso de los animales lesionados unilateralmente, tras estimular el oído ipsilateral a la lesión, los valores de latencias que se encontraron tras la cirugía fueron similares a los de la condición pre lesión en ambos grupos a corto y largo plazo pl., excepto para la latencia entre las ondas I-II, que se encontró incrementada un 8.67% en el día 1 pl. ($p < 0.05$; $gl = 2$; $F = 4.252$) (Fig. 8).

Cuando se evaluaron los datos de latencias de las ondas tras estimular el oído contralateral a la lesión, no se encontraron cambios significativos a ningún tiempo pl. (Fig. 9).

Lesión Bilateral

Latencias de ondas (ms.)

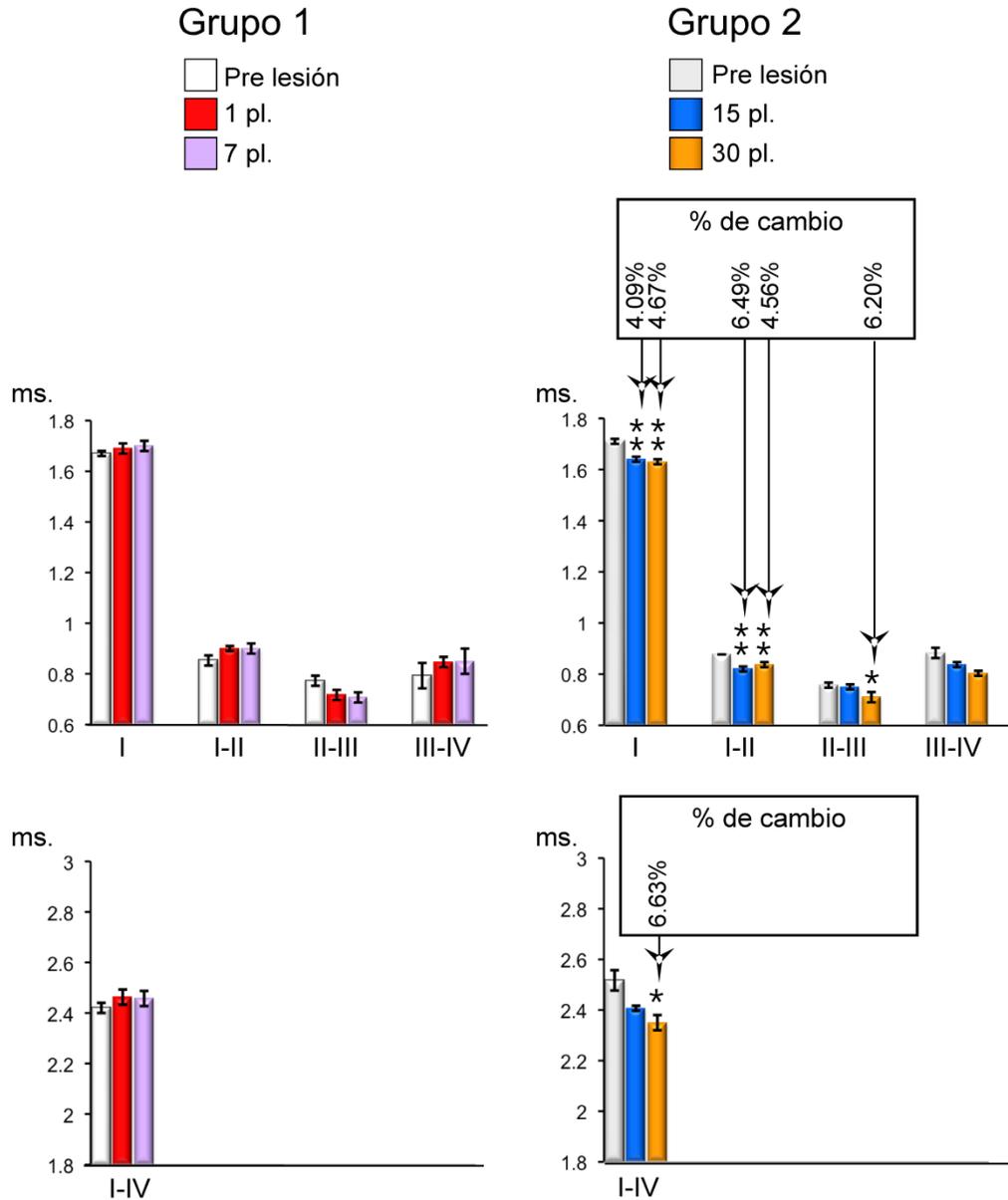


Fig. 7. Cambios en las latencias de los animales lesionados bilateralmente (grupos 1 y 2). Los gráficos representan los valores de media SEM de todos los intervalos de ondas en milisegundos (ms). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. Se observa que las latencias están acortadas en los registros a largo plazo (15 y 30 días pl.). En el recuadro se indica el porcentaje de cambio respecto al control (Alvarado y cols., 2007).

Lesión Unilateral

Oído Ipsolateral a la lesión

Latencias de ondas (ms.)

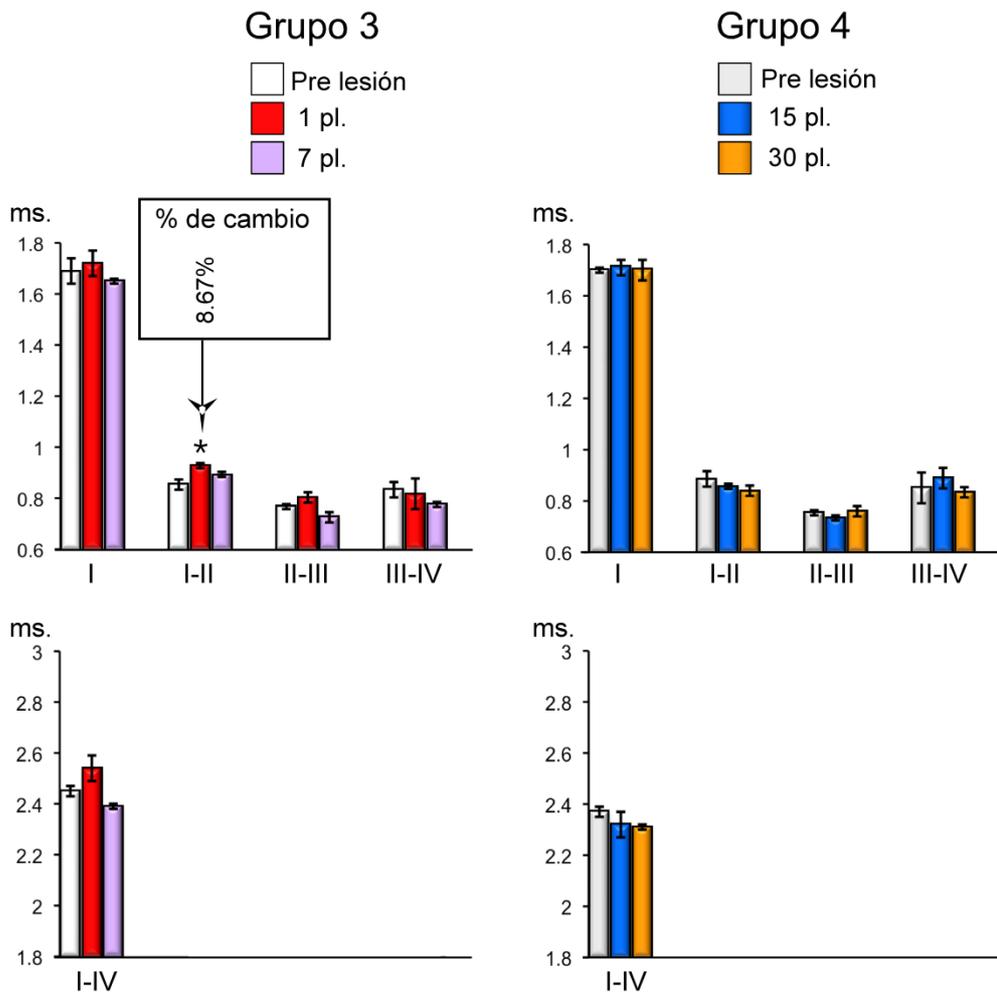


Fig. 8. Cambios en las latencias del oído ipsolateral a la lesión de los animales lesionados unilateralmente (grupos 3 y 4). Los gráficos representan los valores de la media \pm SEM de todos los intervalos de ondas en milisegundos (ms). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. En el recuadro se indica el porcentaje de cambio respecto al control (Alvarado y cols., 2007).

Lesión Unilateral

Oído contralateral a la lesión

Latencias de ondas (ms.)

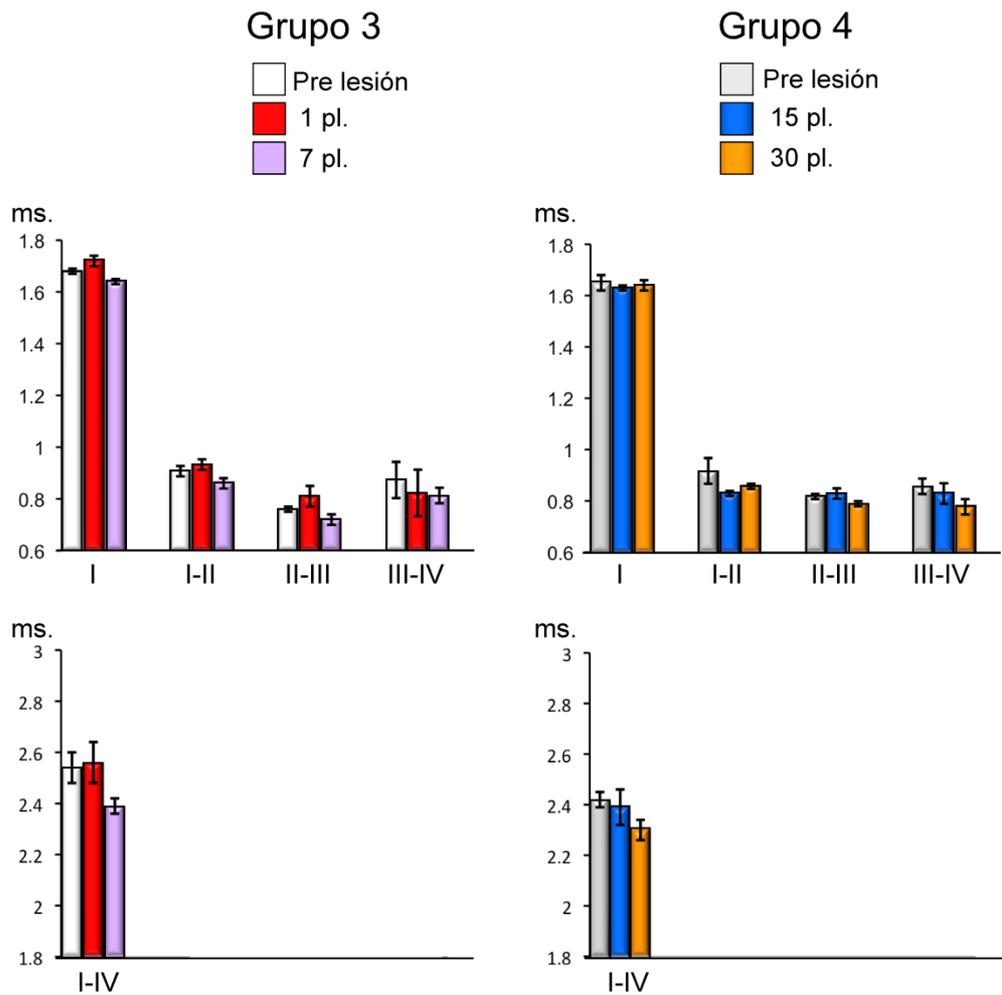


Fig. 8. Cambios en las latencias del oído contralateral a la lesión de los animales lesionados unilateralmente (grupos 3 y 4). Los gráficos representan los valores de la media \pm SEM de todos los intervalos de ondas en milisegundos (ms). * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$.

RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA CÓCLEA OBTENIDOS MEDIANTE qPCR

Los cambios más significativos encontrados en el estudio electrofisiológico de los potenciales evocados, descritos en el epígrafe anterior, se pueden deber al efecto de la des-aférentación de la conexión corticofuga con una de las principales dianas del córtex auditivo, *i.e.* el haz olivococlear. La degeneración de las conexiones corticopontinas debe repercutir en el procesamiento del oído interno, y, en consecuencia, en la respuesta del nervio auditivo, manifestándose en los términos observados por nosotros de bajada de amplitud de la onda I de los potenciales evocados.

Para intentar comprender los mecanismos implicados en este efecto se llevó a cabo el estudio en la cóclea de la expresión de genes específicos (ver apartado Consideraciones sobre el diseño experimental) relacionados con la actividad del oído interno.

Genes relacionados con la neurotransmisión excitatoria.

Glutamato deshidrogenasa (glud1)

En el grupo experimental analizado un día después de la lesión, la expresión de *glud1* en la cóclea ipsilateral a la lesión mostró un descenso estadísticamente significativo del 49.64% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 27.448$), mientras que en la cóclea contralateral presentó un incremento del 41.48% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 13.432$) (Fig. 10 y Tabla 4).

Siete días después de la lesión, en la cóclea ipsilateral los valores se mantuvieron significativamente inferiores respecto a la condición control por un 36.74% ($p < 0.001$), mientras que en la cóclea contralateral, la expresión descendió hasta valores no significativos respecto al control (Fig. 10 y Tabla 4).

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (15 días pl.), la expresión de *glud1* subió a valores significativamente superiores a los del control de forma bilateral ($p < 0.001$), con un aumento del 29.13% en la cóclea ipsilateral, y del 47.76% en la cóclea contralateral (Fig. 10).

GENES RELACIONADOS CON LA NEUROTRANSMISIÓN DEL GLUTAMATO

■ Ipsilateral
■ Contralateral

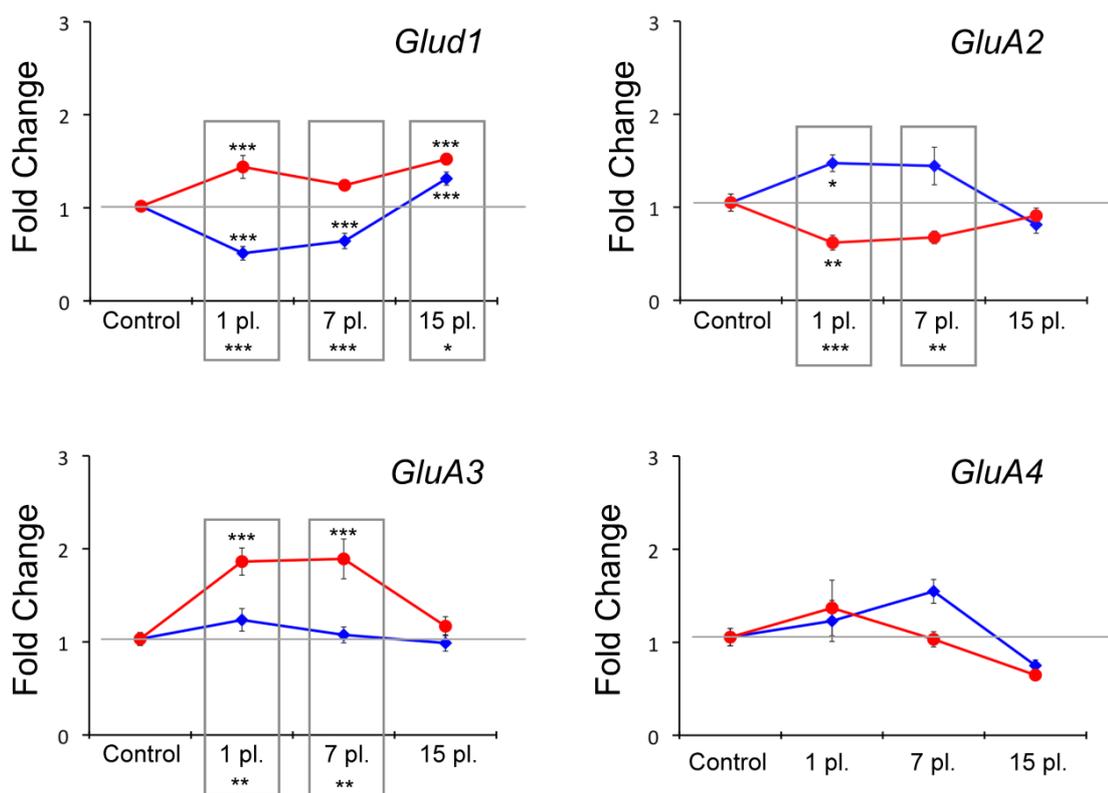


Fig. 10. Cambios en los genes relacionados con la neurotransmisión del glutamato (grupos 7 al 10). Los gráficos representan los valores de la media \pm SD del fold change para las distintas condiciones experimentales en la cóclea ipsilateral y contralateral a la lesión. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. La comparación ipsilateral versus contralateral para cada tiempo post lesión, y su significación estadística, está indicada dentro del recuadro gris.

Tabla 4. % DE VARIACIÓN RESPECTO A LA CONDICIÓN CONTROL

		Oído Ipsolateral			Oído Contralateral		
		1 pl.	7 pl.	15 pl.	1 pl.	7 pl.	15 pl.
Regulación por MOC	<i>α10 Ach</i>	—	—	↑ 235.81	—	↑ 338.43	↑ 266.54
	<i>Prestina</i>	—	—	↑ 249.95	—	↑ 499.14	↑ 466.18
Neurotransmisión excitatoria	<i>GluA2</i>	↑ 40.40	—	—	↓ 40.98	—	—
	<i>GluA3</i>	—	—	—	↑ 80.58	↑ 83.38	—
	<i>GluA4</i>	—	—	—	—	—	—
	<i>Glud1</i>	↓ 49.64	↓ 36.74	↑ 29.13	↑ 41.48	—	↑ 49.76
	<i>Pvalb</i>	↑ 248.41	—	↑ 70.23	—	—	↑ 123.02
Inhibición GABA	<i>GABA α-1</i>	↑ 24172.32	↑ 38313.16	—	↑ 38459.21	↑ 28475	—
	<i>GABA γ-2</i>	—	—	—	↑ 105.12	—	—
Regulación por LOC	<i>α 7 Ach</i>	↑ 56637.54	↑ 68849.65	—	↑ 61372.60	↑ 77487.65	—
	<i>Drd1a</i>	↑ 503579.28	↑ 720824.20	—	↑ 685539.15	↑ 870324.12	—
	<i>Drd2</i>	↑ 505.68	↑ 340.07	↑ 451.32	↑ 183.06	↑ 154.72	↑ 355.47

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión mostraron diferencias significativas en todos los grupos experimentales (los valores de p se muestran en la figura 10).

Subunidades de los receptores ionotrópicos AMPA:

Subunidad GluA2

Cuando se evaluaron los datos de la expresión del gen *GluA2* un día después de la lesión, la cóclea ipsilateral mostró un aumento estadísticamente significativo del 40.40% ($p < 0.05$; $gl = 3$; $F = 9.095$), mientras que la cóclea contralateral mostró un descenso del 40.98% ($p < 0.01$; $gl = 3$; $F = 4.942$) (Fig. 10 y Tabla 4).

Siete días después de la lesión, la cóclea ipsilateral mostró un ligero descenso respecto al día 1 pl., mientras que la cóclea contralateral presentó un pequeño aumento. Sin embargo, los valores no fueron significativos respecto a la condición control (Fig. 10).

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (15 días pl.), los valores de expresión de *GluA2* se aproximaron a los de la condición pre lesión, tanto en la cóclea ipsilateral como en la contralateral a la lesión (Fig. 10).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión mostró diferencias significativas en los grupos experimentales de los días 1 ($p < 0.001$; $gl = 23$; $t = 4.647$) y 7 pl. ($p < 0.01$; $gl = 14$; $t = 3.579$) pero no en los del día 15 pl. (Fig.10).

Subunidad GluA3

Los valores de expresión del gen *GluA3* en la cóclea ipsilateral a la lesión fueron similares a los del grupo control, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los días pl. (Fig. 10.) Sin embargo, en la cóclea contralateral a la lesión se detectó un aumento significativo respecto a la condición control del 80.58% en el día 1 pl., y del 83.38% en el día 7 pl. ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 0.649$) (Fig. 10 y Tabla 4).

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (15 días pl.), los valores de expresión de *GluA3* se aproximaron a los de la condición pre lesión tanto en la cóclea ipsilateral como en el contralateral a la lesión (Fig. 10).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión mostró diferencias significativas en los grupos experimentales de los días 1 ($p < 0.01$; $gl = 15$; $t = -3.313$) y 7 pl. ($p < 0.01$; $gl = 14$; $t = -4.134$) pero no en los del día 15 (Fig. 10).

Subunidad gluA4

Cuando se evaluaron los datos de la expresión del gen *GluA4*, ambas cócleas mostraron valores similares a los de la condición pre lesión en todas las condiciones experimentales (días 1, 7 y 15 pl.), de modo que no se encontraron diferencias significativas respecto al control en ninguna de ellas (Fig. 10).

Sin embargo, la comparación de los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales del día 7 pl. ($p < 0.01$; $gl = 13$; $t = 3.273$) (Fig. 10).

Genes relacionados con la neurotransmisión GABA

Subunidad $\alpha 1$ - receptor GABAA

En el grupo experimental analizado un día después de la lesión, la expresión de $\alpha 1$ mostró un aumento significativo en ambas cócleas respecto a la lesión. Siendo el aumento en la cóclea ipsilateral del 24.172.32% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 101.93$), mientras que el de la cóclea contralateral del 38.459.21% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 21.116$) (Fig. 11 y Tabla 4).

Siete días después de la lesión, los valores se mantuvieron significativamente superiores respecto a la condición control, tanto en la cóclea ipsilateral como en la contralateral a la lesión ($p < 0.001$), siendo el aumento en el cóclea ipsilateral de un 38.313.16%, mientras que en el cóclea contralateral de un 28.475% (Fig. 11 y Tabla 4).

GENES RELACIONADOS CON LA INHIBICIÓN POR GABA

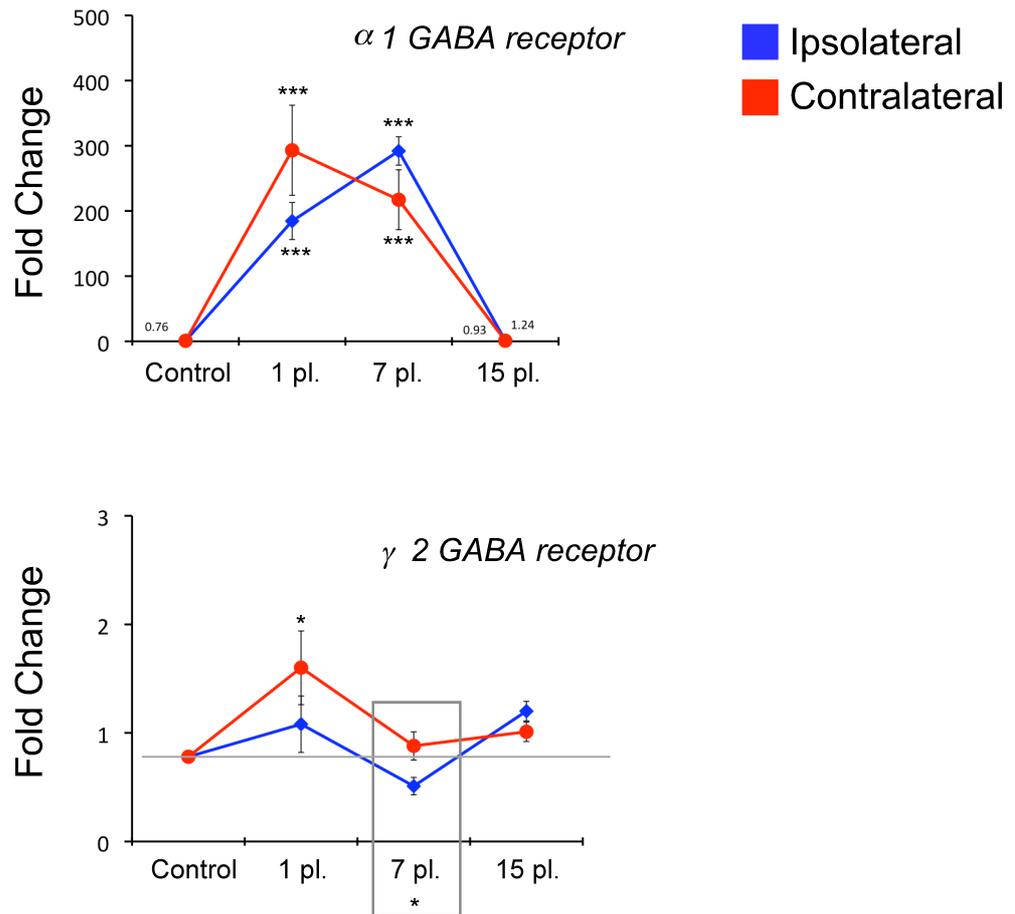


Fig. 11. Cambios en los genes relacionados con la neurotransmisión del GABA (grupos 7 al 10). Los gráficos representan los valores de la media \pm SD del fold change para las distintas condiciones experimentales en la cóclea ipsilateral y contralateral a la lesión. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. La comparación ipsilateral versus contralateral para cada tiempo post lesión, y su significación estadística, está indicada dentro del recuadro gris.

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (15 días pl.), los valores de expresión de $\alpha 1$ se aproximaron a los de la condición pre-lesión tanto en la cóclea ipsilateral como en la contralateral a la lesión (Fig. 11).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión no mostró diferencias significativas para ningún grupo experimental (Fig. 11).

Subunidad $\gamma 2$ - receptor GABAA

Cuando se evaluaron los datos de la expresión génica de la subunidad $\gamma 2$ del receptor GABAA, ambas cócleas mostraron un incremento respecto a la condición pre lesión en el día 1 pl. Sin embargo, sólo el aumento del 105.12% en la cóclea contralateral fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$; $gl = 3$; $F = 5.981$) (Fig. 11 y tabla 4).

En los días 7 y 15 pl., ambas cócleas, ipsilateral y contralateral, no mostraron diferencias significativas respecto a la condición pre-lesión (Fig.11).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión, solamente mostró diferencias significativas para el grupo analizado en el día 7 pl. ($p < 0.05$; $gl = 25$; $t = -2.181$) (Fig. 11 y Tabla 4).

Genes relacionados con la neurotransmisión del sistema eferente olivococlear

Sistema olivococlear lateral

Subunidad 1a del receptor de Dopamina D1 o $Drd1a$

La expresión génica de $Drd1a$ mostró en ambas cócleas un incremento significativo respecto a la condición pre lesión en los días 1 y 7 pl. (Fig. 12). Los valores de *fold change* observados para estas condiciones experimentales (1 y 7 pl.) fueron de hasta 10000 veces por superiores al control. En este sentido, en el día 1 pl, el aumento en la cóclea ipsilateral fue de un 503579.28% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 205.105$), mientras que en la cóclea contralateral fue de un 685.539.15% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 413.308$). Siete días después de la lesión, el incremento

GENES RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN DEL SISTEMA OLIVOCOCLEAR LATERAL

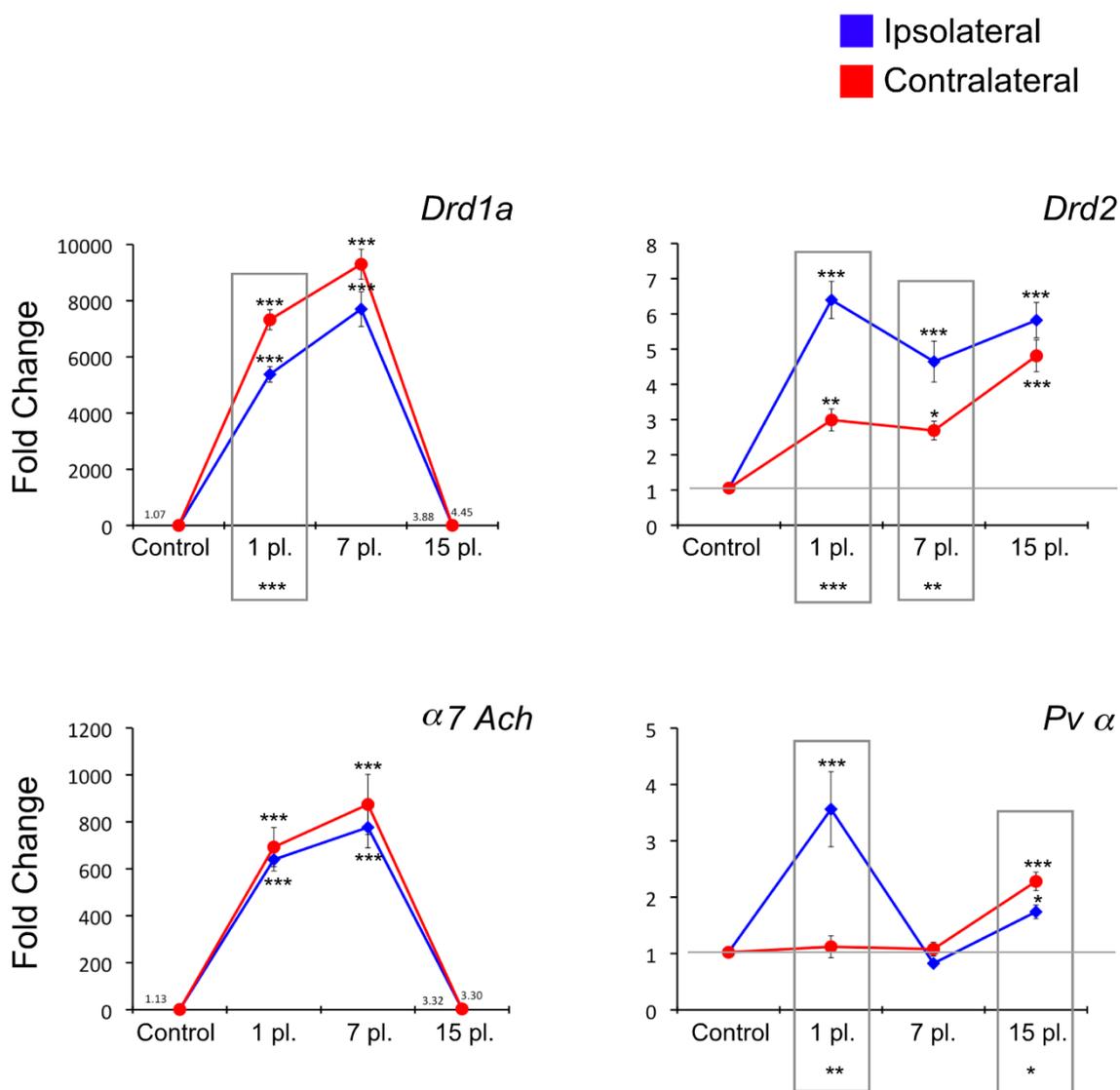


Fig. 12. Cambios en los genes relacionados con la modulación eferente del sistema olivococlear lateral (grupos 7 al 10). Los gráficos representan los valores de la media \pm SD del fold change para las distintas condiciones experimentales en la cóclea ipsilateral y contralateral a la lesión. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. La comparación ipsilateral versus contralateral para cada tiempo post lesión, y su significación estadística, está indicada dentro del recuadro gris.

respecto al control fue aún mayor que en el día 1 pl., siendo de un 720824.2% en la cóclea ipsilateral y de un 870324.12% en la contralateral (Fig. 12 y Tabla 4).

A pesar de los fuertes incrementos observados en los días 1 y 7 pl., los valores de expresión de ambas cócleas en el grupo analizado en el día 15 pl. fueron similares a los de la condición control, no encontrándose diferencias significativas entre ellos.

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión mostró diferencias significativas solamente en el día 1 pl. ($p < 0.01$; $gl = 11$; $t = -3.828$) (Fig.12).

Receptor de dopamina Drd2

En el grupo experimental analizado un día después de la lesión, la expresión génica de *Drd2* mostró un incremento significativo respecto a la condición control en ambas cócleas (Fig. 12 y Tabla 4), aunque el aumento en la cóclea ipsilateral de un 505.68% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 23.487$) fue mayor que el de la contralateral, de un 183.06% ($p < 0.01$; $gl = 3$; $F = 20.298$).

Siete días después de la lesión, el valor de expresión génica de *Drd2* en ambas cócleas aumentó respecto al control, siendo el incremento de un 340.07% en la cóclea ipsilateral ($p < 0.001$), y de un 154.72% en la cóclea contralateral ($p < 0.05$) (Fig. 12 y Tabla 4).

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (día 15 pl.), los valores de expresión génica mostraron un aumento significativo respecto al control ($p < 0.001$) similar en la cóclea ipsilateral (451.32%) y en la contralateral (355.47%) a la lesión (Fig. 12 y Tabla 4).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión mostró diferencias significativas en los grupos experimentales analizados en los días 1 ($p < 0.001$; $gl = 18$; $t = 5.225$) y 7 ($p < 0.01$; $gl = 13$; $t = 3.196$) pl., pero no para el grupo analizado en el día 15 pl. (Fig. 12).

Subunidad $\alpha 7$ - receptor acetilcolina

En el grupo experimental analizado un día después de la lesión, la expresión de $\alpha 7$ mostró un aumento significativo similar en ambas cócleas respecto a la lesión, siendo el aumento en la cóclea ipsilateral del 56637.54% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 140.222$), mientras que

el de la cóclea contralateral del 61372.60% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 83.296$) (Fig. 12). Siete días después de la lesión, el incremento en ambas cócleas respecto al control fue aún mayor que en el día 1 pl., de un 68849.65% en la cóclea ipsilateral y de un 77487.65% en la contralateral ($p < 0.001$) (Fig. 12 y Tabla 4).

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (día 15 pl.), ambas cócleas, ipsilateral y contralateral a la lesión, mostraron valores de expresión génica similares a los de la condición control, no encontrándose diferencias significativas en el análisis estadístico (Fig.12).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión no mostró diferencias significativas a ningún tiempo pl. (Fig. 12).

Parvalbúmina α

En el grupo experimental analizado un día después de la lesión, la expresión de *parvalbúmina α* en la cóclea ipsilateral mostró un aumento estadísticamente significativo respecto al control de 248.41% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 24.206$), mientras que la cóclea contralateral no presentó diferencias significativas (Fig. 12 y Tabla 4). Siete días después de la lesión, no se observaron cambios significativos respecto a la condición pre lesión ni en la cóclea ipsilateral, ni en la contralateral a la lesión.

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (15 días pl.), se observó un incremento significativo respecto al control tanto en la cóclea ipsilateral (70.23%, $p < 0.05$), como en la contralateral (123.02%, $p < 0.001$) (Fig. 12 y Tabla 4).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral versus contralateral a la lesión mostró diferencias significativas en los grupos experimentales analizados en los días 1 ($p < 0.01$; $gl = 13$; $t = 4.163$) y 15 ($p < 0.05$; $gl = 36$; $t = -2.585$) pl., pero no en el día 7 pl. (Fig. 12).

Genes afectados por la regulación del sistema olivococlear medial

Subunidad $\alpha 10$ - del receptor de acetilcolina.

La expresión génica de $\alpha 10$ 1 día después de lesión no mostró cambios significativos en la cóclea ipsilateral ni en la contralateral a la lesión. Sin embargo, siete días después de la

cirugía se observó un incremento significativo del 338.41% en la cóclea contralateral a la lesión ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 14.340$) (Fig. 13 y Tabla 4).

Cuando se analizó el grupo experimental a largo plazo (15 días pl.), los valores de expresión génica de $\alpha 10$ mostraron un aumento significativo respecto al control en ambas cócleas. Siendo el aumento en la cóclea ipsilateral de un 235.81% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 10.180$), y en la contralateral de un 266.54% (Fig. 13 y Tabla 4).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral y contralateral a la lesión mostró diferencias significativas en el grupo experimental analizado en el día 7 pl ($p < 0.01$; $gl = 9$; $t = -4.232$) (Fig. 13).

Prestina

Cuando se evaluaron los datos de la expresión génica para *prestina* 1 día después de lesión, no se encontraron cambios significativos ni en la cóclea ipsilateral ni en la contralateral a la lesión. Siete días después de la cirugía, tampoco se observaron cambios significativos respecto a la condición pre lesión en la cóclea ipsilateral. Sin embargo, en este momento pl. la cóclea contralateral mostró un incremento significativo del 499.14% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 6.995$) (Fig. 13 y Tabla 4).

En el grupo experimental a largo plazo (15 días pl.), los valores de expresión génica de *prestina* mostraron un aumento significativo respecto al control en ambas cócleas ipsilateral y contralateral a la lesión, siendo el aumento en la cóclea ipsilateral de un 249.95% ($p < 0.001$; $gl = 3$; $F = 6.995$), y el de la contralateral un 466.18% (Fig. 13 y Tabla 4).

La comparación entre los valores de la cóclea ipsilateral y contralateral a la lesión mostró diferencias significativas en los grupos experimentales analizados en los días 7 ($p < 0.001$; $gl = 23$; $t = -4.385$) y 15 ($p < 0.05$; $gl = 31$; $t = -2.656$) pl. (Fig. 13).

GENES RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN OLIVOCOCLEAR MEDIAL

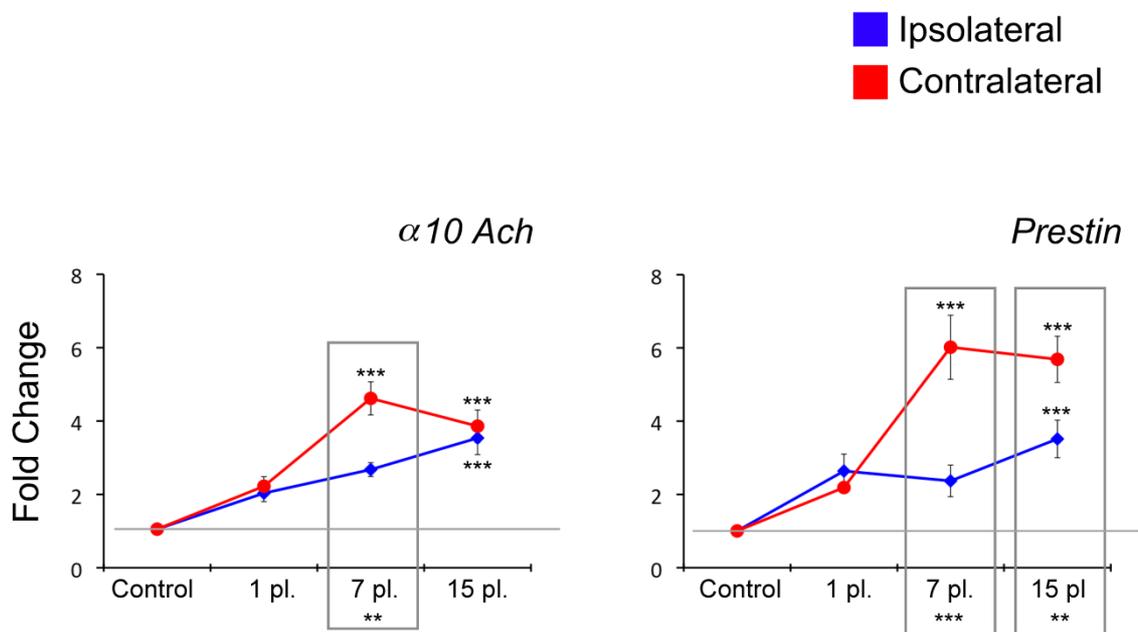


Fig. 13. Cambios en los genes relacionados con la modulación eferente del sistema olivococlear medial (grupos 7 al 10). Los gráficos representan los valores de la media \pm SD del fold change para las distintas condiciones experimentales en la cóclea ipsilateral y contralateral a la lesión. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. La comparación ipsilateral versus contralateral para cada tiempo post lesión, y su significación estadística, está indicada dentro del recuadro gris.

DISCUSIÓN

POTENCIALES EVOCADOS DEL TRONCO DEL ENCÉFALO (ABRs)

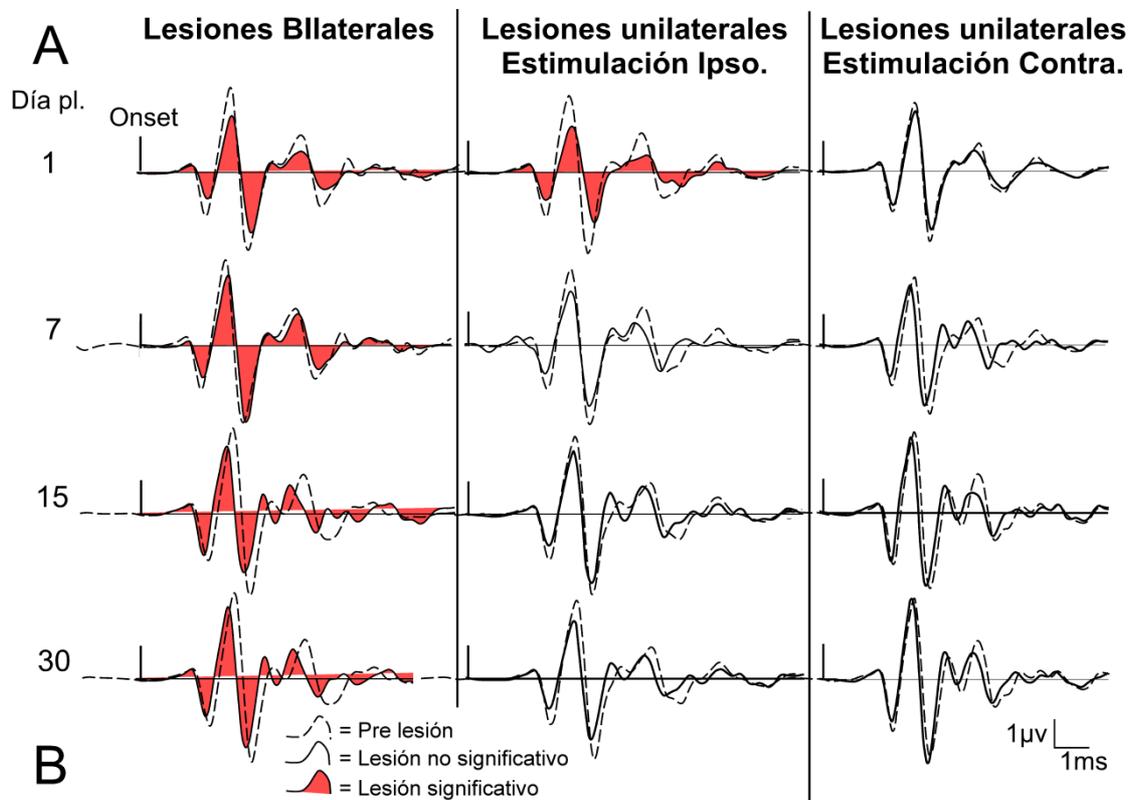
Los potenciales evocados de latencia corta analizados antes y después de realizar ablaciones restringidas a la corteza auditiva, mostraron cambios que dependieron tanto del tipo de lesión (unilateral o bilateral), como del tiempo de supervivencia de los animales. De acuerdo con esto, exclusivamente las lesiones bilaterales, provocaron un aumento significativo de los umbrales de los ABRs a 1 y 7 días pl. Así mismo, las amplitudes de las ondas disminuyeron significativamente en estos mismos tiempos pl. tras lesión bilateral. Sin embargo, el descenso de amplitudes en los animales lesionados unilateralmente sólo se produjo en el día 1 pl., y exclusivamente tras estimulación del oído ipsilateral. Finalmente, en el día 1 pl. se observó un aumento en la latencia de las ondas I-II en el oído ipsilateral a la lesión de los animales con ablación unilateral. Por el contrario, se observó un acortamiento en las latencias a largo plazo (15 y 30 pl.) en los registros de los animales lesionados bilateralmente (resumen en la Fig. 14).

Amplitudes de las ondas y umbrales.

La disminución en la actividad evocada observada por nosotros un día después de la ablación cortical, se debe al efecto de la degeneración de la proyección descendente, potencialmente excitadora (Feliciano y Potasner, 1995), sobre las neuronas del sistema eferente olivococlear.

La regulación de la respuesta del receptor auditivo por la proyección descendente se analizó previamente mediante estudios tanto de estimulación eléctrica como de inhibición o bloqueo de la corteza auditiva (León y cols., 2012, Xiao y Suga, 2002; Perrot y cols., 2006). De acuerdo con estos trabajos, el descenso en la amplitud del potencial de acción compuesto tras el bloqueo por frío o mediante la infusión de lidocaína en la corteza auditiva, sugiere un control efectivo de la corteza sobre la actividad del nervio auditivo (León y cols., 2012). Así mismo, los cambios en los potenciales microfónicos cocleares tras experimentos de inhibición de la corteza, indican un posible efecto de la regulación corticofuga sobre la actividad de las CCE (Xiao y Suga, 2002; León y cols., 2012). Por otra parte, las modificaciones tanto en la amplitud de los microfónicos cocleares como en las emisiones otoacústicas tras estimulación eléctrica de la corteza auditiva, también se correlacionan con un efecto de regulación de la micromecánica de las CCE y la amplificación coclear (Xiao y Suga, 2002; Perrot y cols., 2006).

Fig. 14 Resumen de los resultados obtenidos en el registro de potenciales evocados (ABRs). **A.** Esquema representativo de la morfología de las ondas de los ABRs antes y después de las lesiones corticales, en los diferentes días post lesión (pl.) (1, 7, 15 y 30): a la izquierda están representadas las ondas obtenidas de los animales con lesiones bilaterales; en el centro, las ondas obtenidas del oído ipsilateral a la lesión de animales con ablación unilateral de la corteza auditiva; a la derecha, las ondas obtenidas del oído contralateral a la lesión de animales con ablación unilateral de la corteza auditiva. En todos los casos, las ondas representan el valor promedio de los registros obtenidos en los animales de cada condición experimental. **B.** Tabla representativa con los resultados obtenidos en el análisis estadístico para cada uno de los parámetros estudiados (Umbrales, Amplitudes y Latencias) en los diferentes días pl. (1, 7, 15 y 30), en los tres grupos experimentales: izquierda, lesionados bilateralmente; centro, lesionados unilateralmente con estimulación en el oído ipsilateral a la lesión; derecha, lesionados unilateralmente con estimulación en el oído contralateral a la lesión. W = wave (onda); Ws = waves (ondas); On. = onset.



B

		Días pl.											
		1	7	15	30	1	7	15	30	1	7	15	30
Umbrales		↑*	↑*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Amplitudes	W. I	↓**	—	—	—	↓*	—	—	—	—	—	—	—
	W. II	↓**	—	—	—	↓**	—	—	—	—	—	—	—
	W. III	↓**	↓**	—	—	↓*	—	—	—	—	—	—	—
	W. IV	↓**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Latencias	On. - W.I	—	—	↓**	↓**	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ws. I-II	—	—	↓*	↓*	↑*	—	—	—	—	—	—	—
	Ws. II-III	—	—	—	↓*	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ws. III-IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Ws. I-IV	—	—	—	↓**	—	—	—	—	—	—	—	—

Teniendo en cuenta estos datos, el descenso de amplitudes de la onda I en el día 1 pl., representa una caída en la actividad eléctrica del nervio, por lo cual es posible plantear que en condiciones fisiológicas la corteza auditiva produce un efecto de ganancia positiva sobre la respuesta tanto de la cóclea como del nervio. El aumento de umbrales observado en este mismo tiempo pl., apoya esta idea y puede correlacionarse con un efecto de disminución de la amplificación coclear. Sin embargo, estos cambios revierten a valores semejantes a la condición pre lesión en los días 15 y 30 pl. Esta recuperación de la actividad evocada sugiere la existencia de fenómenos de reparación centrales y/o periféricos que se abordarán en la segunda parte de esta tesis doctoral.

Estudios previos han demostrado que la lesión del nervio auditivo por radiofrecuencia o mediante la sección del mismo, produce la atenuación o desaparición de las ondas II a IV del ABR del lado ipsilateral a la lesión (Rosahl y cols., 2000; Chen y Chen, 1991). Sobre esta base, los descensos de actividad de los ABRs que hemos detectado a corto plazo en estas mismas ondas, pueden correlacionarse con la menor actividad del nervio auditivo. Los resultados de Rosahl y cols. (2000) y Chen y Chen (1991) sugieren además que las ondas II, III y IV del espectrograma evocado corresponden a la actividad de las regiones donde se encuentran respectivamente los núcleos cocleares, el complejo olivar superior y el lemnisco lateral. Por ello, el descenso de actividad de las ondas II a IV podría ser también la consecuencia de la pérdida global de las conexiones descendentes sobre estos núcleos del puente (Feliciano y cols., 1995; Coomes y Schofield, 2004; Schofield y Coomes, 2005).

El estudio de las lesiones unilaterales de la corteza auditiva, mostró diferencias en el lado ipso- y contralateral a la lesión. Estos resultados están de acuerdo con la pérdida de un mayor número de conexiones en un lado respecto al otro debido a que la proyección corticopontina contiene una mayor densidad de proyecciones cruzadas (Feliciano y cols., 1995; Doucet y cols., 2002 y 2003; Coomes y Schofield, 2004; Schofield y Coomes, 2005). Sin embargo, es necesario tener en cuenta, para aceptar esta idea, que las diferencias entre el lado ipsilateral y contralateral a la lesión no puedan deberse a la posición o el tamaño de las lesiones en la corteza en los diferentes especímenes experimentales. En este sentido, el estudio de la extensión y localización de las zonas de lesión cortical permitió concluir que ambos parámetros (tamaño y localización) son homogéneos para todos los grupos

experimentales y afectan en alto grado tanto a las cortezas primarias como secundarias (ver localización de las lesiones en el apartado de resultados).

Latencia de las ondas.

La ablación bilateral de la corteza auditiva provocó a largo plazo (15 y 30 días pl.) un acortamiento de latencias de los potenciales evocados. Estudios previos han demostrado que la activación de las fibras olivococleares mediales, mediante estimulación acústica contralateral, produce un acortamiento en las latencias de las emisiones otoacústicas (Berlin y cols., 1993; Giraud y cols., 1996 y 1997; Francis y Guinan, 2010). Este acortamiento se ha considerado como el efecto de una caída de la sintonía neural del receptor a consecuencia del ensanchamiento de los filtros cocleares, inducida por una modificación de la actividad del haz olivococlear medial sobre las CCE. Estudios clínicos previos también han demostrado un acortamiento de latencias en los registros de ABRs en pacientes con sordera neurosensorial que muestran caídas en la discriminación de frecuencias (Don y cols., 1998). Basándonos en estas ideas es posible plantear que una peor sintonía neural de la cóclea provocada por la alteración del filtrado coclear, puede inducir un procesamiento más rápido de las señales, y, en consecuencia, provocar un acortamiento de latencias. De acuerdo a ello, nuestros datos sobre latencias de las ondas a largo plazo, sugieren una actividad alterada de las neuronas del sistema eferente medial sobre la amplificación coclear.

El análisis de los resultados sobre los efectos de las lesiones corticales en las respuestas evocadas, genera, como hemos expuesto anteriormente, diversas preguntas tanto sobre los mecanismos que rigen los cambios de actividad en el receptor y el puente como sobre los que controlan su recuperación en el tiempo. Procede por ello responder a las dudas sobre la participación del sistema eferente lateral y/o medial en los cambios observados por nosotros mediante los registros de ABRs. Para tratar de contestar a estas preguntas, en este trabajo de tesis doctoral hemos realizado un segundo abordaje experimental basado en un paradigma similar de lesión, pero analizando la regulación de genes con función específica y bien conocida en el oído interno.

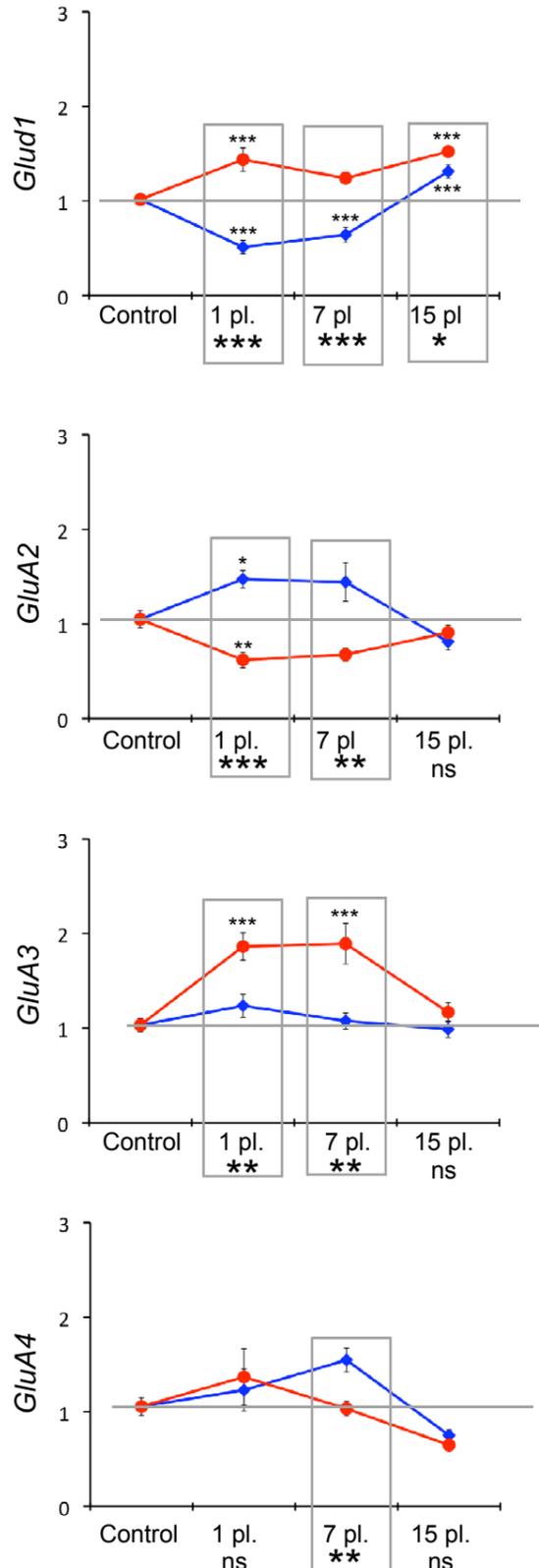
EXPRESIÓN Y REGULACIÓN GÉNICA EN LA CÓCLEA.

Las lesiones unilaterales en la corteza auditiva producen en la cóclea cambios en la expresión de genes relacionados con la neurotransmisión excitatoria, con la inhibición GABA y con la actividad del sistema olivococlear eferente, que como las respuestas eléctricas evocadas por sonido, varían dependiendo tanto del tiempo de supervivencia como del oído analizado (ipsilateral o contralateral). De acuerdo a ello, a corto plazo (1 día pl.), las lesiones unilaterales produjeron en la cóclea ipsilateral un descenso en la expresión del gen *glud1* y un aumento en el de la subunidad *GluA2* de los receptores AMPA. Sin embargo, a este mismo tiempo pl. la cóclea contralateral mostró un aumento en la expresión de *glud1* y de *GluA3*, y un descenso en la de *GluA2*. En los días 1 y 7 pl., la expresión de los genes relacionados con los receptores de GABA y los vinculados a la regulación del sistema olivococlear lateral, aumentó tanto en la cóclea ipso como en la contralateral a la lesión. Sin embargo, 15 días pl., la expresión de este grupo de genes mostró valores similares a los del control excepto en el caso de *glud1* y *drd2*, que mostraron un aumento significativo respecto a los valores control en las cócleas de ambos lados. Finalmente, la expresión de los genes relacionados con la regulación del sistema olivococlear medial aumentó a largo plazo pl. (15 días pl.) en ambas cócleas (Fig. 15, desplegable adjunto al manuscrito).

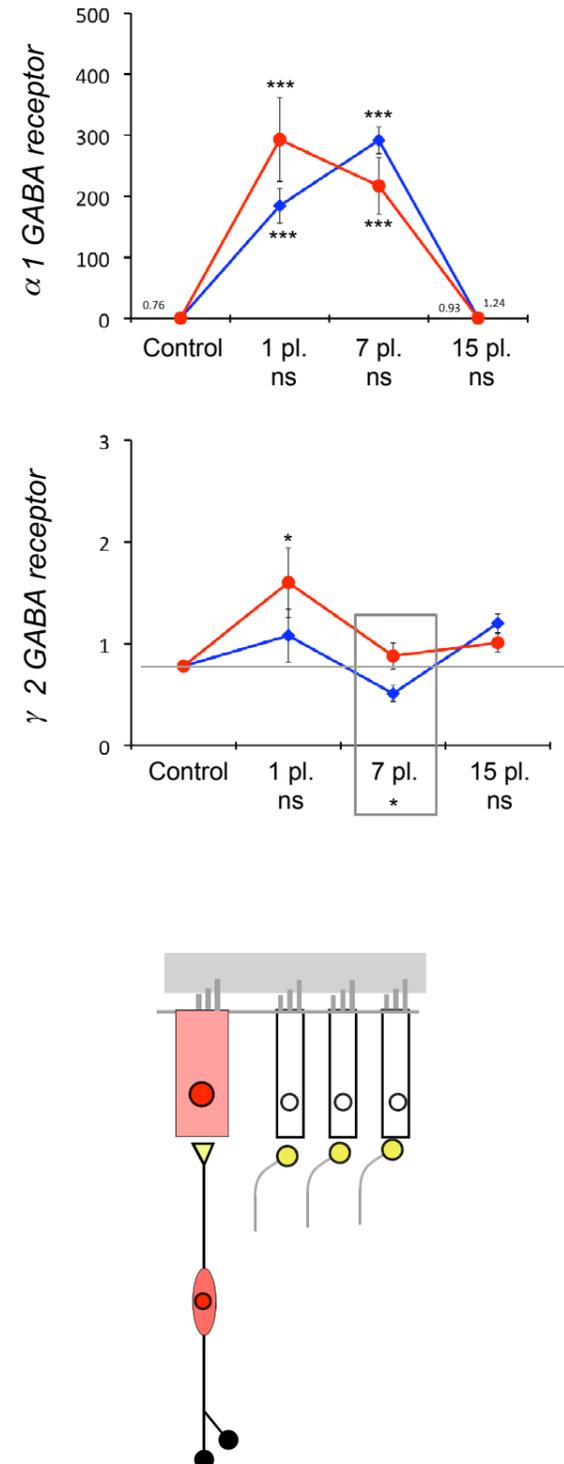
Cambios a corto plazo (1 día pl.).

La glutamato deshidrogenasa (codificada por el gen *glud1*), es la enzima responsable de la degradación del glutamato en α cetoglutarato y amonio (Cooper, 2012). En la cóclea, se ha observado que la perfusión de esta enzima produce un descenso en la amplitud y un aumento en el umbral del potencial de acción compuesto, que se asocia a la degradación del glutamato (Rebillard y Bryant, 1989). La menor expresión del gen *glud1* (detectada por nosotros en la cóclea ipsilateral a la lesión cortical en el día 1 pl.) es compatible con un descenso en el aclaramiento de glutamato como consecuencia de una menor liberación de este neurotransmisor. En apoyo de esta tesis, nuestros datos obtenidos mediante el registro de potenciales evocados en este mismo supuesto experimental (lesión cortical unilateral, 1 día pl, lado ipsilateral), muestran un descenso en la amplitud de la onda I (Fig. 6), lo que estaría de

Genes relacionados con la neurotransmisión excitatoria (Fig. 10)

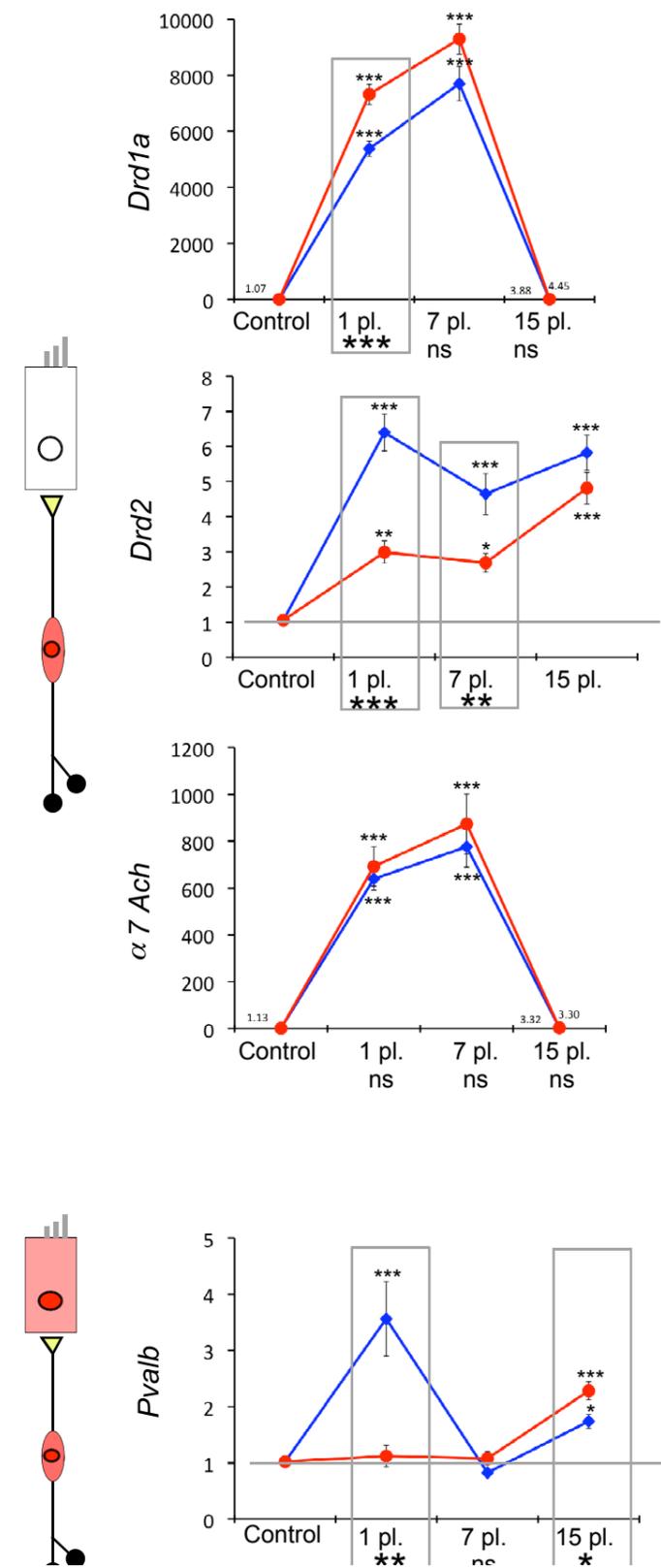


Genes relacionados con la inhibición por GABA (Fig. 11)



Genes relacionados con la modulación del sistema olivococlear eferente

Genes afectados por la regulación del sistema olivococlear lateral (Fig. 12)



Genes afectados por la regulación del sistema olivococlear medial (Fig. 13)

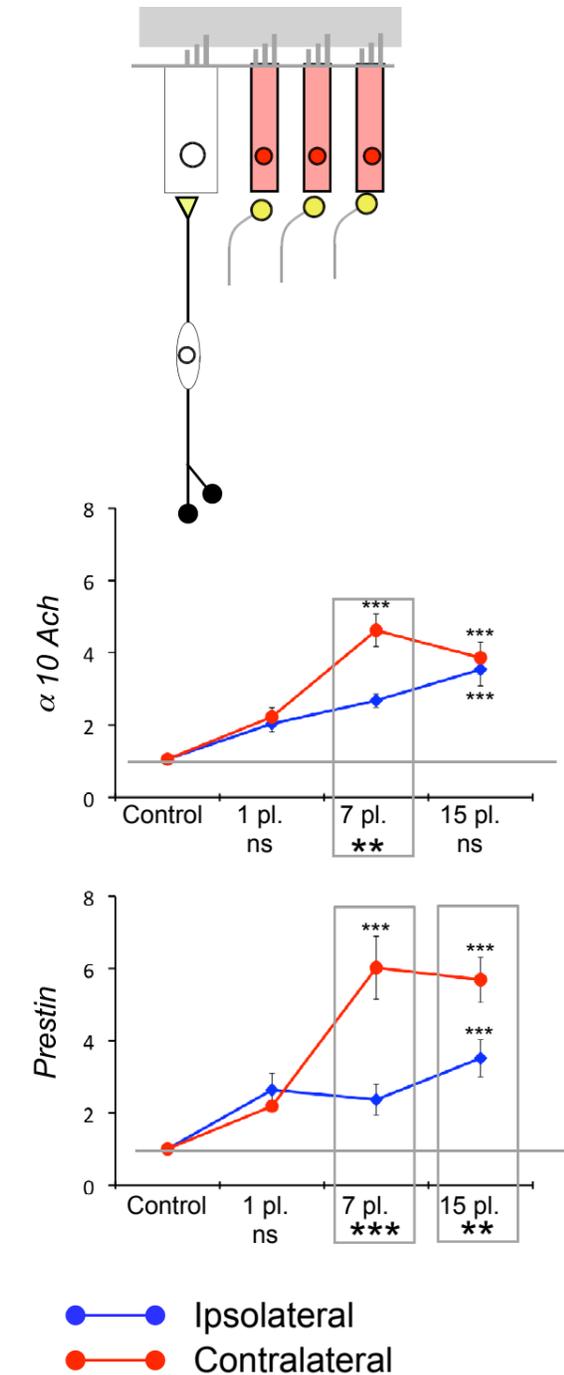


Fig. 15. Resumen de las figuras contenidas en el texto sobre los cambios en la expresión génica del receptor. Los iconos identifican las estructuras cocleares donde se localizan los genes (coloreados en rojo).
 *** p<0.001 ** p<0.01 * p<0.05

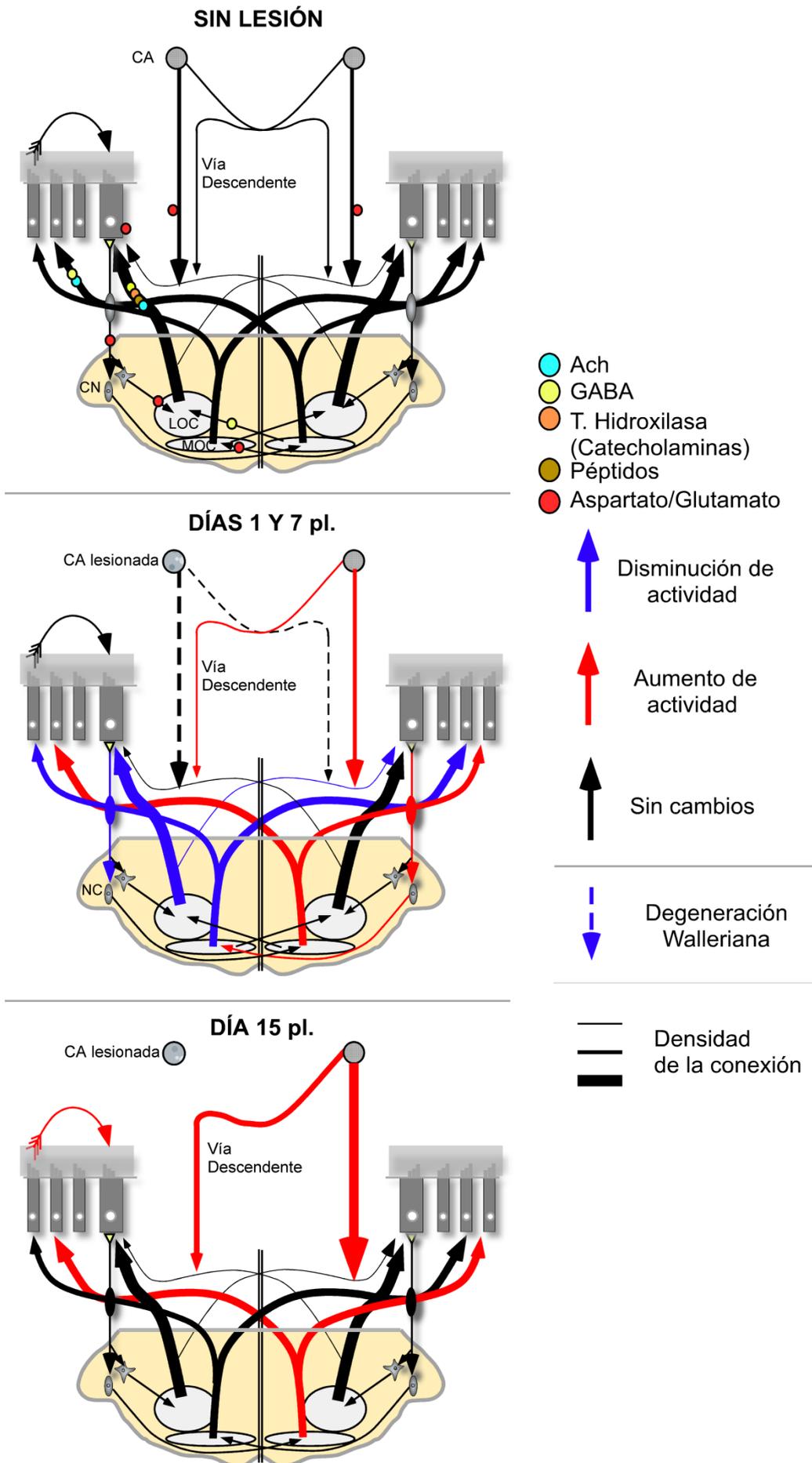
acuerdo con una menor actividad de la neurotransmisión excitatoria de las CCI sobre el nervio. Por el contrario, en la cóclea contralateral, donde observamos un aumento en la expresión de *glud1*, nuestros resultados hablarían en favor de una mayor liberación de glutamato y en consecuencia un potencial incremento en la neurotransmisión. Una explicación para estas diferencias en la regulación de la neurotransmisión excitatoria entre ambos oídos puede encontrarse en la organización bilateral de las conexiones descendentes y las del propio haz olivococlear medial. Como las conexiones descendentes son potencialmente excitatorias (Feliciano y Potashner, 1995), la lesión de un lado de la corteza auditiva debe provocar un descenso neto de la activación de las neuronas olivococleares mediales ipsolaterales, lo que repercute, en mayor medida, por la predominancia de la proyección del haz medial (Warr, 1975 y 1980; Strutz 1981; White y Warr, 1983; Aschoff y Ostwald 1987; Vetter y Mugnaini, 1990; Brown y cols., 2013) sobre el oído contralateral a la lesión (Fig. 16). El efecto de la activación del haz olivococlear medial sobre la cóclea ha sido explorado mediante el estudio conjunto de la estimulación eléctrica de las fibras mediales a su paso por el suelo del IV ventrículo, la estimulación auditiva con tonos puros y el análisis mediante interferencia láser de la vibración de la membrana basilar (Murugasu y Russel, 1996). Estos experimentos demostraron un descenso en el movimiento de la membrana basilar en la región de la frecuencia característica del tono de estimulación, apoyando la idea de una regulación inhibitoria del haz olivococlear medial sobre la amplificación de la respuesta coclear. Por ello, la degeneración de las conexiones excitatorias desde la corteza sobre las neuronas olivococleares, provocadas por ablación cortical, generaría una alteración en la amplificación coclear en el lado contralateral (por descenso de la inhibición del haz olivococlear medial) y una mayor liberación de glutamato por las CCI, lo que justificaría el aumento en la expresión de *glud1* observado por nosotros. Por el contrario, la cóclea ipsilateral, que muestra un aumento en la expresión de *glud1*, recibe la mayor parte de sus aferencias olivococleares mediales de las neuronas del lado contralateral a la lesión, que mantiene intactas sus conexiones descendentes desde la corteza (Fig. 16). Por ello, el descenso en la regulación de *glud1* en el lado ipsilateral podría ser causado una mayor actividad de las neuronas olivococleares mediales y, en consecuencia, a un mayor efecto inhibitorio, sobre las CCE por parte del sistema contralateral intacto. La ausencia de cambios significativos en la expresión de los genes activados por el haz medial en el día 1 pl., no

Fig. 16. Esquema explicativo de la hipótesis de trabajo (basada en el esquema de organización de los circuitos) sobre el efecto de las lesiones corticales según la evolución temporal post lesional. La hipótesis del esquema se basa tanto en los resultados procedentes del estudio de ABRs como los de regulación génica.

Los potenciales neurotransmisores que contienen cada una de las proyecciones (círculos) se han indicado de acuerdo a lo descrito en la literatura (Feliciano y Potashner, 1995; Raphael y Altschuler, 2003). El grosor de las líneas que representan haces fibrilares se dibujó según las estimaciones de estudios neuroanatómicos previos de otros autores (Brown y cols., 2013; Feliciano y cols., 1995; Doucet y cols., 2003; Coomes y Schofield, 2004; Schofield y Coomes, 2005). Nótese que a 1 y 7 días pl., la actividad tanto de LOC como de MOC se representa mas baja (línea azul) en el lado ipsolateral a la lesión debido a la pérdida de la proyección descendente excitatoria mas densa en este lado.

El esquema a largo plazo (15 días pl – zona inferior de la imagen) resume nuestra hipótesis sobre los efectos compensatorios de la lesión basados en la reorganización de la proyección descendente intacta y en cambios en la regulación de la amplificación coclear (CCE en color rojo).

CA = corteza auditiva; **NC** = núcleos cocleares; **LOC** = sistema olivococlear lateral; **MOC** = sistema olivococlear medial.



excluye cambios funcionales en los fenómenos de amplificación coclear, cuya detección podría requerir más tiempo de funcionamiento alterado de la cóclea tras la deaferentación. Nuestros propios datos tras el registro de ABRs y los experimentos de bloqueo de la corteza de otros autores en los que se observan cambios en los potenciales microfónicos cocleares (Xiao y Suga, 2002; León y cols., 2012), analizados anteriormente (vs) son compatibles con esta hipótesis. Sin embargo, no podemos obviar que la deaferentación unilateral provoca también cambios en la expresión de los genes regulados por el haz olivococlear lateral (receptores D1 y D2 de dopamina y $\alpha 7$ de acetilcolina tras la lesión cortical) (Fig. 12). A pesar de que no se ha demostrado de un modo incontrovertible el contacto directo entre la proyección corticofuga y las neuronas olivococleares laterales, hay evidencias anatómicas previas de la presencia de campos terminales corticales en OSL y la región periolivar, donde se encuentran localizadas las neuronas olivococleares laterales (Coomes y Schofield, 2004). Más aún, el estudio combinado de la estimulación eléctrica del colículo inferior junto con registros en la cóclea, demostró variaciones en la amplitud del potencial de acción compuesto (generado por la actividad del nervio auditivo), sin afectar a los potenciales microfónicos cocleares (generados principalmente por la actividad de las CCE) (Groff y Liberman, 2003). Dado que el haz olivococlear medial regula la actividad de las CCE y la amplificación coclear, la presencia de cambios en el potencial de acción compuesto en ausencia de cambios en los microfónicos, sugiere un efecto neto y directo de la proyección descendente sobre el haz lateral, lo que está de acuerdo con el aumento en la expresión de los genes relacionados con su actividad observado por nosotros. A la vista de estos resultados, es necesario tener en cuenta que, dada la predominancia ipsilateral de la proyección olivococlear lateral (Warr, 1975 y 1980; Strutz 1981; White y Warr, 1983; Aschoff y Ostwald 1987; Vetter y Mugnaini, 1990; Brown y cols., 2013) (Fig. 16), este haz podría explicar también el descenso observado tanto en la expresión de *glud1* como en la onda I de los potenciales evocados en el lado ipsilateral a la lesión.

Además de *glud1*, los cambios en la neurotransmisión excitatoria también afectan a la expresión génica de *GluA2* y *GluA3*. La expresión del gen de la subunidad *GluA2* aumenta en el día 1 pl. en el lado ipsilateral (lado en el que se demuestra mediante ABRS un descenso de actividad) y desciende casi en la misma proporción en el contralateral (donde no observamos cambios en los ABRs pero sí un descenso de *glud1*) (vs). Es bien conocido que *GluA2* es la

subunidad responsable de la permeabilidad al Ca^{2+} del canal iónico de los receptores AMPA, de tal modo que disminuye cuando esta subunidad está presente en el tetrámero del receptor (ver una revisión de Michaelis, 1998). Estudios recientes in vitro han demostrado que el bloqueo prolongado de la actividad de glutamato produce en las neuronas hipocámpales un fenómeno de *scaling* que favorece la aparición de receptores AMPA carentes o con una menor cantidad, de la subunidad GluA2 en el elemento post sináptico (Sutton y cols., 2006; Ju y cols., 2004). Estudios posteriores con cultivos de neuronas de hipocampo mostraron además que la entrada de calcio a través de estos receptores promueve la liberación de BDNF, que actúa a nivel presináptico aumentando el reciclado de vesículas de glutamato (Lindskog y cols., 2010). De acuerdo con estos trabajos, el aumento en la expresión de GluA3 y la disminución de GluA2 observada por nosotros tras ablación cortical en la cóclea contralateral, daría lugar a receptores más permeables al calcio que, de acuerdo al estudio de Lindskog y cols. (2010), produciría un aumento indirecto en la liberación de glutamato en las sinapsis. En sentido contrario, el aumento en la expresión de *GluA2* observado en la cóclea ipsilateral, daría lugar a receptores menos permeables al calcio, que inducirían una menor liberación de glutamato por parte de las células ciliadas, lo que también concuerda con la menor expresión de *glud1* en la cóclea y la caída de actividad de los ABRs en el lado ipsilateral a la lesión. Esta hipótesis estaría respaldada por experimentos en los que la pérdida de actividad en el receptor, producida tanto por la destrucción de la cóclea (Rubio, 2006) como por la oclusión del canal auditivo (Whitting y cols., 2009; Wang y cols., 2011), produjeron un aumento en la expresión de la subunidad GluA3 en los núcleos cocleares. Sin embargo, serán necesarios experimentos específicos para confirmarla.

En resumen, tras deaferentación cortical, el aumento detectado en la expresión de los genes de los receptores post sinápticos en nuestro estudio, podrían interpretarse como una respuesta al descenso de la actividad de las neuronas olivococleares (tanto mediales como laterales), como un cambio en la actividad del receptor o como ambas cosas a la vez. Esta idea se apoyaría en los trabajos anteriormente mencionados de Rubio (2006), Whitting y cols. (2009) y Wang y cols. (2011).

Los cambios en la neurotransmisión excitatoria un día después de la ablación cortical se reflejaron, igualmente, en la cóclea ipsilateral a la lesión mediante un aumento en la

expresión génica de *parvalbúmina* α , cuya función es el tamponamiento de calcio y se expresa específicamente tanto en las neuronas ganglionares como en las CCI (Soto-Prior y cols., 1995; Hackney y cols., 2005). Este aumento podría deberse a la entrada de calcio extracelular o a la activación de mecanismos intracelulares que permitan la movilización del mismo. La entrada de calcio extracelular a través de los receptores de glutamato, no permite proponer a estos receptores, tal y como se explicó anteriormente en el análisis de la expresión del gen de la subunidad GluA2, como candidatos para desencadenar el incremento en la expresión del gen para parvalbúmina. Existen evidencias in vitro de que la activación de los receptores de dopamina D1, elevados casi 10.000 veces en nuestro estudio, inducen la movilización de calcio intracelular a través de mecanismos de señalización que involucran a la fosfolipasa C (Mahan y cols., 1990; Undie y Friedman, 1990; Wang y cols., 1995; Pacheco y Jope, 1997). Estudios posteriores demostraron que esta movilización de calcio intracelular se produce sólo en células que coexpresan tanto los receptores D1 como los D2, sugiriendo la formación de heterodímeros entre ambos tipos receptores (Chun y cols., 2013). En el sistema auditivo, la combinación de técnicas inmunohistoquímicas con RT-PCR mostró la presencia de los dos tipos de receptores, D1 y D2, tanto en el soma como en los terminales amielínicos de las neuronas ganglionares en la región de las CCI (Inoue y cols., 2006; Maison y cols., 2012). A pesar de que será necesario realizar experimentos en el futuro para comprobar esta idea, es probable que el aumento simultáneo de la expresión de genes para los receptores de dopamina D1 y D2, observado por nosotros tras ablación cortical 1 día pl., pueda contribuir a la movilización del calcio intracelular en las neuronas del ganglio espiral y, en consecuencia, a explicar el aumento en la expresión de *parvalbúmina* α como un fenómeno reactivo de la cóclea ipsilateral a la lesión. Sin embargo, no es posible formular esta hipótesis sin tener en cuenta que hay estudios inmunocitoquímicos recientes que han demostrado que el receptor D1 no sólo se encuentra en las neuronas ganglionares de tipo I (Inoue y cols., 2006; Maison y cols., 2012), sino también en otros elementos de la cóclea como la membrana de Reissner y la estría vascular (Kim y cols., 2013). Debido a ello, no es posible descartar que la elevada expresión del gen para D1 que observamos tras lesión de la corteza auditiva puede reflejar un aumento en la expresión génica en estructuras no neurales del receptor. Junto a ello no es posible obviar una segunda posibilidad para justificar la detección indirecta de un aumento del

calcio derivada de la activación de los receptores $\alpha 7$ de acetilcolina, que han sido considerados muy permeables a este catión en el cerebro de la rata (Bertrand y cols.1993; Séguéla y cols. 1993; Castro y Albuquerque, 1995; Fucile, 2004). En este sentido, estudios recientes de iontoforesis combinados con registros electrofisiológicos de *patch clamp* y técnicas de imagen de fluorescencia, mostraron que la activación de los receptores $\alpha 7$ de acetilcolina produce aumentos en la concentración de calcio intracelular tanto en el soma como en las dendritas de neuronas de hipocampo (Fayuk y Yakel, 2005 y 2007).

Cambios a largo plazo (7 y 15 días pl.).

Siete días pl., la expresión de *GluA3* y la de los genes relacionados con la regulación del sistema eferente lateral mostraron valores por encima del control. Sin embargo, la expresión de los genes *glud1* y *GluA2* mostró una tendencia al equilibrado en ambos oídos, y la de *parvalbumina α* presentó valores similares al control. Estos datos pueden estar de acuerdo con la presencia de fenómenos de recuperación parcial de la síntesis de estos receptores, generados por fenómenos de compensación o auto reparación tanto en la cóclea como a nivel central. Esta idea se apoya también en el hecho de que 15 días pl. todo este grupo de genes presentaron valores de expresión similares a los de la condición control salvo *glud1*, *parvalbúmina α* y *Drd2*, que mostraron valores por encima de los del control en ambas cócleas. No obstante, resulta muy interesante comprobar que el incremento en *glud1*, *parvalbúmina α* y *Drd2* coincide a los 15 días pl. con un aumento en la expresión de los genes relacionados con la regulación del sistema olivococlear medial (*prestina*, la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABAA y la subunidad $\alpha 10$ del receptor de acetilcolina), lo que refleja una actividad alterada del sistema medial y de la amplificación coclear, y hace pensar en la micromecánica coclear como el origen más probable de la recuperación a largo plazo de los cambios en la expresión génica observados por nosotros. Estudios previos han asociado la proteína Prestina con la actividad micromecánica de las CCE y la sintonización neural de la cóclea (Zheng y cols., 2000; Lagarde y cols., 2008). La caída de 40-60 dB de los umbrales tanto de los ABRs como de las emisiones otoacústicas en ratones knockout para *prestina* (Liberman y cols., 2002), sugirieron que esta proteína es además imprescindible en la amplificación coclear. El aumento en la expresión de *prestina* observado por nosotros tras ablación cortical podría estar de acuerdo con una

alteración en la amplificación coclear. Estos resultados concuerdan también con la hipótesis de una modificación en la sintonía neural y la amplificación coclear planteada por nosotros (Lamas y cols., 2013) para justificar el acortamiento de latencias en los registros de ABRs obtenidos 15 días pl. En resumen, a largo plazo es la reactivación de los mecanismos de amplificación coclear la que podría inducir un aumento de actividad en la amplificación coclear, cuya consecuencia sería el aumento en la expresión de *glud1* y *parvalbúmina* y la estabilización de los valores de expresión del resto de los genes. Será necesario realizar experimentos específicos con lesiones unilaterales de la corteza en animales sometidos a la pérdida de las CCE (tratamientos con antibióticos aminogluco-sídicos) para confirmar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La deaferentación cortical provoca un descenso de actividad en el receptor, el nervio y los núcleos auditivos del tronco del encéfalo, por ello se puede concluir que la proyección corticofuga ejerce un efecto neto de ganancia positiva sobre la actividad de las primeras estaciones de la vía auditiva.
2. Tras deaferentación cortical, se producen cambios en la expresión de genes en la cóclea relacionados con la regulación tanto de las neuronas del haz olivococlear lateral como del medial. Estos resultados permiten concluir que la proyección corticofuga regula la respuesta coclear a través de ambos sistemas eferentes.
3. La pérdida de actividad de la proyección corticofuga induce cambios en la expresión génica de los receptores post sinápticos, compatibles con mecanismos de plasticidad homeostática (synaptic scaling) que conducen al reequilibrado funcional del receptor.
4. La deaferentación unilateral cortical induce respuestas desiguales entre el lado ipso y contralateral a la lesión, en cuanto a la actividad eléctrica evocada y la expresión génica en la cóclea y el nervio, que tienden a desaparecer con el tiempo, indicando fenómenos de auto reparación en el receptor.
5. El acortamiento de las latencias de los potenciales evocados y los cambios en la expresión de genes que intervienen en la micromecánica y amplificación coclear (prestina y la subunidad $\alpha 10$ del receptor de acetilcolina), producidos a largo plazo tras lesión cortical, permiten concluir que su actividad es determinante para el filtrado y la sintonía neural coclear.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschuler RA, Kachar B, Rubio JA, Parakkal MH, Fex J (Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res* 338:1-11.1985).
- Alvarado JC, Vaughan JW, Stanford TR, Stein BE (Multisensory versus unisensory integration: contrasting modes in the superior colliculus. *J Neurophysiol* 97:3193-3205.2007).
- Arnold T, Oestreicher E, Ehrenberger K, Felix D (GABA(A) receptor modulates the activity of inner hair cell afferents in guinea pig cochlea. *Hear Res* 125:147-153.1998).
- Aschoff A, Ostwald J (Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats, and guinea pigs. *J Comp Neurol* 264:56-72.1987).
- Batta TJ, Panyi G, Szucs A, Sziklai I (Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. *Eur J Neurosci* 20:3364-3370.2004).
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63:182-217.2011).
- Berlin CI, Hood LJ, Wen H, Szabo P, Cecola RP, Rigby P, Jackson DF (Contralateral suppression of non-linear click-evoked otoacoustic emissions. *Hear Res* 71:1-11.1993).
- Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Bertrand S, Changeux JP (Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6971-6975.1993).
- Brodal A (1981) *Neurological anatomy in relation to clinical medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Brown MC (Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol* 260:605-618.1987).
- Brown MC, Mukerji S, Drottar M, Windsor AM, Lee DJ (Identification of Inputs to Olivocochlear Neurons Using Transneuronal Labeling with Pseudorabies Virus (PRV). *J Assoc Res Otolaryngol*.2013).
- Burki C, Felix D, Ehrenberger K (Enkephalin suppresses afferent cochlear neurotransmission. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 55:3-6.1993).
- Cabanillas LA, Luebke AE (CGRP- and cholinergic-containing fibers project to guinea pig outer hair cells. *Hear Res* 172:14-17.2002).
- Castro NG, Albuquerque EX (alpha-Bungarotoxin-sensitive hippocampal nicotinic receptor channel has a high calcium permeability. *Biophys J* 68:516-524.1995).
- Cediel R, Riquelme R, Contreras J, Diaz A, Varela-Nieto I (Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci* 23:587-590.2006).

- Chen TJ, Chen SS (Generator study of brainstem auditory evoked potentials by a radiofrequency lesion method in rats. *Exp Brain Res* 85:537-542.1991).
- Chun LS, Free RB, Doyle TB, Huang XP, Rankin ML, Sibley DR (D1-D2 dopamine receptor synergy promotes calcium signaling via multiple mechanisms. *Mol Pharmacol* 84:190-200.2013).
- Church MW, Kaltenbach JA (The hamster's auditory brain stem response as a function of stimulus intensity, tone burst frequency, and hearing loss. *Ear and hearing* 14:249-257.1993).
- Clarkson C, Herrero-Turrion MJ, Merchan MA (Cortical Auditory Deafferentation Induces Long-Term Plasticity in the Inferior Colliculus of Adult Rats: Microarray and qPCR Analysis. *Front Neural Circuits* 6:86.2012).
- Clarkson C, Juiz JM, Merchan MA (Long-term regulation in calretinin staining in the rat inferior colliculus after unilateral auditory cortical ablation. *J Comp Neurol* 518:4261-4276.2010a).
- Clarkson C, Juiz JM, Merchan MA (Transient Down-Regulation of Sound-Induced c-Fos Protein Expression in the Inferior Colliculus after Ablation of the Auditory Cortex. *Front Neuroanat* 4:141.2010b).
- Clarkson C, Lopez DE, Merchan MA (Long-term functional recovery in the rat auditory system after unilateral auditory cortex ablation. *Acta Otolaryngol* 130:326-332.2010c).
- Coomes DL, Schofield BR (Projections from the auditory cortex to the superior olivary complex in guinea pigs. *Eur J Neurosci* 19:2188-2200.2004).
- Cooper AJ (The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in cerebral ammonia homeostasis. *Neurochem Res* 37:2439-2455.2012).
- d'Aldin C, Eybalin M, Puel JL, Charachon G, Ladrech S, Renard N, Pujol R (Synaptic connections and putative functions of the dopaminergic innervation of the guinea pig cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252:270-274.1995a).
- d'Aldin C, Puel JL, Leducq R, Crambes O, Eybalin M, Pujol R (Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 90:202-211.1995b).
- Dallos P, He DZ, Lin X, Sziklai I, Mehta S, Evans BN (Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J Neurosci* 17:2212-2226.1997).
- Darrow KN, Benson TE, Brown MC (Planar multipolar cells in the cochlear nucleus project to medial olivocochlear neurons in mouse. *J Comp Neurol* 520:1365-1375.2012).
- Don M, Ponton CW, Eggermont JJ, Kwong B (The effects of sensory hearing loss on cochlear filter times estimated from auditory brainstem response latencies. *J Acoust Soc Am* 104:2280-2289.1998).

- Doucet JR, Molavi DL, Ryugo DK (The source of corticocollicular and corticobulbar projections in area Te1 of the rat. *Exp Brain Res* 153:461-466.2003).
- Doucet JR, Rose L, Ryugo DK (The cellular origin of corticofugal projections to the superior olivary complex in the rat. *Brain Res* 925:28-41.2002).
- Drescher DG, Green GE, Khan KM, Hajela K, Beisel KW, Morley BJ, Gupta AK (Analysis of gamma-aminobutyric acidA receptor subunits in the mouse cochlea by means of the polymerase chain reaction. *J Neurochem* 61:1167-1170.1993).
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705-715.1994).
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J (alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-3506.2001).
- ErosteGUI C, Norris CH, Bobbin RP (In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor on outer hair cells. *Hear Res* 74:135-147.1994).
- Eybalin M (Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309-373.1993).
- Eybalin M, Parnaud C, Geffard M, Pujol R (Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA-containing efferent synapses in the guinea-pig organ of Corti. *Neuroscience* 24:29-38.1988).
- Eybalin M, Pujol R (Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. *Exp Brain Res* 65:261-270.1987).
- Fayuk D, Yakel JL (Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal CA1 interneurons. *J Physiol* 566:759-768.2005).
- Fayuk D, Yakel JL (Dendritic Ca²⁺ signalling due to activation of alpha 7-containing nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 582:597-611.2007).
- Feliciano M, Potashner SJ (Evidence for a glutamatergic pathway from the guinea pig auditory cortex to the inferior colliculus. *J Neurochem* 65:1348-1357.1995).
- Feliciano M, Saldana E, Mugnaini E (Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemniscal regions, superior olivary complex and cochlear nuclei. *Auditory Neuroscience* 1:287-308.1995).
- Felix D, Ehrenberger K (The efferent modulation of mammalian inner hair cell afferents. *Hear Res* 64:1-5.1992).

- Fex J, Altschuler RA, Kachar B, Wenthold RJ, Zempel JM (GABA visualized by immunocytochemistry in the guinea pig cochlea in axons and endings of efferent neurons. *Brain Res* 366:106-117.1986).
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28:1601-1613.2006).
- Francis NA, Guinan JJ, Jr. (Acoustic stimulation of human medial olivocochlear efferents reduces stimulus-frequency and click-evoked otoacoustic emission delays: Implications for cochlear filter bandwidths. *Hear Res* 267:36-45.2010).
- Fuchs PA, Murrow BW (Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci* 12:800-809.1992).
- Fucile S (Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35:1-8.2004).
- Galambos R (Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 19:424-437.1956).
- Garrett AR, Robertson D, Sellick PM, Mulders WH (The actions of dopamine receptors in the guinea pig cochlea. *Audiol Neurootol* 16:145-157.2011).
- Gil-Loyzaga PE (Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. *Acta Otolaryngol* 115:222-226.1995).
- Giraud AL, Perrin E, Chery-Croze S, Chays A, Collet L (Contralateral acoustic stimulation induces a phase advance in evoked otoacoustic emissions in humans. *Hear Res* 94:54-62.1996).
- Giraud AL, Wable J, Chays A, Collet L, Chery-Croze S (Influence of contralateral noise on distortion product latency in humans: is the medial olivocochlear efferent system involved? *J Acoust Soc Am* 102:2219-2227.1997).
- Gitter AH, Zenner HP (gamma-Aminobutyric acid receptor activation of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 249:62-65.1992).
- Glowatzki E, Fuchs PA (Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147-154.2002).
- Groff JA, Liberman MC (Modulation of cochlear afferent response by the lateral olivocochlear system: activation via electrical stimulation of the inferior colliculus. *J Neurophysiol* 90:3178-3200.2003).
- Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 25:7867-7875.2005).
- He DZ, Jia S, Dallos P (Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 23:9089-9096.2003).

- Herbert H, Aschoff A, Ostwald J (Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 304:103-122.1991).
- Horvath M, Ribari O, Repassy G, Toth IE, Boldogkoi Z, Palkovits M (Intracochlear injection of pseudorabies virus labels descending auditory and monoaminergic projections to olivocochlear cells in guinea pig. *Eur J Neurosci* 18:1439-1447.2003).
- Housley GD, Ashmore JF (Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc Biol Sci* 244:161-167.1991).
- Hunter KP, Willott JF (Effects of bilateral lesions of auditory cortex in mice on the acoustic startle response. *Physiol Behav* 54:1133-1139.1993).
- Inoue T, Matsubara A, Maruya S, Yamamoto Y, Namba A, Sasaki A, Shinkawa H (Localization of dopamine receptor subtypes in the rat spiral ganglion. *Neurosci Lett* 399:226-229.2006).
- Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC (Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 7:244-253.2004).
- Kim CH, Kim HY, Lee HS, Choi BY, Chang SO, Oh SH, Lee JH (Dopamine increases Na⁺ absorption in the Reissner's membrane of the gerbil cochlea. *Auris Nasus Larynx* 40:266-272.2013).
- Klinke R (Neurotransmission in the inner ear. *Hear Res* 22:235-243.1986).
- Kuriyama H, Jenkins O, Altschuler RA (Immunocytochemical localization of AMPA selective glutamate receptor subunits in the rat cochlea. *Hear Res* 80:233-240.1994).
- Kuwada S, Batra R, Maher VL (Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude-modulated tones. *Hear Res* 21:179-192.1986).
- Lamas V, Alvarado JC, Carro J, Merchan MA (Long-term evolution of brainstem electrical evoked responses to sound after restricted ablation of the auditory cortex. *PLoS One* 8:e73585.2013).
- Leon A, Elgueda D, Silva MA, Hamame CM, Delano PH (Auditory cortex basal activity modulates cochlear responses in chinchillas. *PLoS One* 7:e36203.2012).
- Liberman MC (Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: an electron microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:189-204.1980).
- Liberman MC, Dodds LW, Pierce S (Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443-460.1990).
- Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419:300-304.2002).

- Lindskog M, Li L, Groth RD, Poburko D, Thiagarajan TC, Han X, Tsien RW (Postsynaptic GluA1 enables acute retrograde enhancement of presynaptic function to coordinate adaptation to synaptic inactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21806-21811.2010).
- Liu X, Yan Y, Wang Y, Yan J (Corticofugal modulation of initial neural processing of sound information from the ipsilateral ear in the mouse. *PLoS One* 5:e14038.2010).
- Livak KJ, Schmittgen TD (Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408.2001).
- Llinas R, Ribary U (Consciousness and the brain. The thalamocortical dialogue in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 929:166-175.2001).
- Lorente de Nó R (1933a) The central projection of the nerve endings of the internal ear. In: *Anatomy of the eighth nerve*, vol. 43, pp 1-38: Laryngoscope.
- Lorente de Nó R (1933b) General plan of structure of the primary cochlear nuclei. In: *Anatomy of the eighth nerve*, vol. 43, pp 327-350: Laryngoscope.
- Lorente de Nó R (1981) *The Primary Acoustic Nuclei*.
- Lu SM, Schweitzer L, Cant NB, Dawbarn D (Immunoreactivity to calcitonin gene-related peptide in the superior olivary complex and cochlea of cat and rat. *Hear Res* 31:137-146.1987).
- Luo F, Wang Q, Kashani A, Yan J (Corticofugal modulation of initial sound processing in the brain. *J Neurosci* 28:11615-11621.2008).
- Mahan LC, Burch RM, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca²⁺ mobilization in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2196-2200.1990).
- Maison SF, Emeson RB, Adams JC, Luebke AE, Liberman MC (Loss of alpha CGRP reduces sound-evoked activity in the cochlear nerve. *J Neurophysiol* 90:2941-2949.2003).
- Maison SF, Liu XP, Eatock RA, Sibley DR, Grandy DK, Liberman MC (Dopaminergic signaling in the cochlea: receptor expression patterns and deletion phenotypes. *J Neurosci* 32:344-355.2012).
- Malmierca MS (The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. *Int Rev Neurobiol* 56:147-211.2003).
- Melcher JR, Guinan JJ, Jr., Knudson IM, Kiang NY (Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. II. Correlating lesion sites with waveform changes. *Hear Res* 93:28-51.1996a).
- Melcher JR, Kiang NY (Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. III: Identified cell populations. *Hear Res* 93:52-71.1996).

- Melcher JR, Knudson IM, Fullerton BC, Guinan JJ, Jr., Norris BE, Kiang NY (Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. I. An experimental approach to their identification. *Hear Res* 93:1-27.1996b).
- Mellado Lagarde MM, Drexler M, Lukashkin AN, Zuo J, Russell IJ (Prestin's role in cochlear frequency tuning and transmission of mechanical responses to neural excitation. *Curr Biol* 18:200-202.2008).
- Merchan MA, Collia FP, Merchan JA, Saldana E (Distribution of primary afferent fibres in the cochlear nuclei. A silver and horseradish peroxidase (HRP) study. *J Anat* 141:121-130.1985).
- Michaelis EK (Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54:369-415.1998).
- Moore JK, Osen KK (The cochlear nuclei in man. *Am J Anat* 154:393-418.1979).
- Morley BJ, Li HS, Hiel H, Drescher DG, Elgoyhen AB (Identification of the subunits of the nicotinic cholinergic receptors in the rat cochlea using RT-PCR and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 53:78-87.1998).
- Mulders WH, Robertson D (Evidence for direct cortical innervation of medial olivocochlear neurones in rats. *Hear Res* 144:65-72.2000).
- Murugasu E, Russell IJ (The effect of efferent stimulation on basilar membrane displacement in the basal turn of the guinea pig cochlea. *J Neurosci* 16:325-332.1996).
- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. I. Properties of the response. *Hear Res* 101:132-148.1996a).
- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. II. Activation of a small conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel. *Hear Res* 101:149-172.1996b).
- Newton EH, Cooper WA, Jr., Coleman JR (Rate and frequency interactions in the auditory brainstem response of the adult rat. *Hear Res* 60:73-79.1992).
- Niedzielski AS, Safieddine S, Wenthold RJ (Molecular analysis of excitatory amino acid receptor expression in the cochlea. *Audiol Neurootol* 2:79-91.1997).
- Niedzielski AS, Wenthold RJ (Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci* 15:2338-2353.1995).
- Niu X, Canlon B (The signal transduction pathway for the dopamine D1 receptor in the guinea-pig cochlea. *Neuroscience* 137:981-990.2006).
- Oestreicher E, Wolfgang A, Felix D (Neurotransmission of the cochlear inner hair cell synapse--implications for inner ear therapy. *Adv Otorhinolaryngol* 59:131-139.2002).

- Ottersen OP, Takumi Y, Matsubara A, Landsend AS, Laake JH, Usami S (Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog Neurobiol* 54:127-148.1998).
- Pacheco MA, Jope RS (Comparison of [3H]phosphatidylinositol and [3H]phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in postmortem human brain membranes and characterization of stimulation by dopamine D1 receptors. *J Neurochem* 69:639-644.1997).
- Parkkonen L, Fujiki N, Makela JP (Sources of auditory brainstem responses revisited: contribution by magnetoencephalography. *Hum Brain Mapp* 30:1772-1782.2009).
- Paxinos G, Watson C, editors (2005) *The rat Brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Perrot X, Ryvlin P, Isnard J, Guenot M, Catenoix H, Fischer C, Mauguiere F, Collet L (Evidence for corticofugal modulation of peripheral auditory activity in humans. *Cereb Cortex* 16:941-948.2006).
- Puel JL (Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* 47:449-476.1995).
- Ramón y Cajal S (1911) *Histología del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Madrid: (reprint 2007) Ministerio de Sanidad y Consumo, CSIC.
- Raphael Y, Altschuler RA (Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 60:397-422.2003).
- Rasmussen GL (Further observations of the efferent cochlear bundle. *J Comp Neurol* 99:61-74.1953).
- Rebillard G, Bryant GM (Effects of in vivo perfusion of glutamate dehydrogenase in the guinea pig cochlea on the VIIIth nerve compound action potential. *Brain Res* 494:379-382.1989).
- Rosahl SK, Tatagiba M, Gharabaghi A, Matthies C, Samii M (Acoustic evoked response following transection of the eighth nerve in the rat. *Acta Neurochir (Wien)* 142:1037-1045.2000).
- Rubio ME (Redistribution of synaptic AMPA receptors at glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus as an early response to cochlear ablation in rats. *Hear Res* 216-217:154-167.2006).
- Ruel J, Bobbin RP, Vidal D, Pujol R, Puel JL (The selective AMPA receptor antagonist GYKI 53784 blocks action potential generation and excitotoxicity in the guinea pig cochlea. *Neuropharmacology* 39:1959-1973.2000).
- Ruel J, Nouvian R, Gervais d'Aldin C, Pujol R, Eybalin M, Puel JL (Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea. *Eur J Neurosci* 14:977-986.2001).

- Russell IJ, Murugasu E (Medial efferent inhibition suppresses basilar membrane responses to near characteristic frequency tones of moderate to high intensities. *J Acoust Soc Am* 102:1734-1738.1997).
- Safieddine S, Prior AM, Eybalin M (Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase, tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea-pig. *Eur J Neurosci* 9:356-367.1997).
- Sahley TL, Nodar RH (Improvement in auditory function following pentazocine suggests a role for dynorphins in auditory sensitivity. *Ear and hearing* 15:422-431.1994).
- Satake M, Liberman MC (Morphological subclasses of lateral olivocochlear terminals? Ultrastructural analysis of inner spiral bundle in cat and guinea pig. *J Comp Neurol* 371:621-632.1996).
- Schmittgen TD, Livak KJ (Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101-1108.2008).
- Schofield BR, Coomes DL (Auditory cortical projections to the cochlear nucleus in guinea pigs. *Hear Res* 199:89-102.2005).
- Schofield BR, Coomes DL (Pathways from auditory cortex to the cochlear nucleus in guinea pigs. *Hear Res* 216-217:81-89.2006).
- Schrott-Fischer A, Kammen-Jolly K, Scholtz AW, Gluckert R, Eybalin M (Patterns of GABA-like immunoreactivity in efferent fibers of the human cochlea. *Hear Res* 174:75-85.2002).
- Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604.1993).
- Shaw NA (The auditory evoked potential in the rat--a review. *Prog Neurobiol* 31:19-45.1988).
- Simmons DD, Mansdorf NB, Kim JH (Olivocochlear innervation of inner and outer hair cells during postnatal maturation: evidence for a waiting period. *J Comp Neurol* 370:551-562.1996).
- Simpson GV, Knight RT, Brailowsky S, Prospero-Garcia O, Scabini D (Altered peripheral and brainstem auditory function in aged rats. *Brain Res* 348:28-35.1985).
- Sliwinska-Kowalska M, Parakkal M, Schneider ME, Fex J (CGRP-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti: a light and electron microscopy study. *Hear Res* 42:83-95.1989).
- Soto-Prior A, Cluzel M, Renard N, Ripoll C, Lavigne-Rebillard M, Eybalin M, Hamel CP (Molecular cloning and expression of alpha parvalbumin in the guinea pig cochlea. *Brain Res Mol Brain Res* 34:337-342.1995).

- Spangler KM, Warr WB (1991) The descending Auditory System. In: *The Neurobiology of Hearing*, vol. II (Altschuler, R., Hoffman, D. W., Bobbin, R. P. and Clopton, B. M., Eds., ed), pp 27-45: Raven Press, New York.
- Spoendlin H (The innervation of the organ of Corti. *J Laryngol Otol* 81:717-738.1967).
- Spoendlin H (Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol* 73:235-248.1972).
- Sridhar TS, Brown MC, Sewell WF (Unique postsynaptic signaling at the hair cell efferent synapse permits calcium to evoke changes on two time scales. *J Neurosci* 17:428-437.1997).
- Strutz J (Efferent innervation of the cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 90:158-160.1981).
- Sutton MA, Ito HT, Cressy P, Kempf C, Woo JC, Schuman EM (Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell* 125:785-799.2006).
- Sziklai I, He DZ, Dallos P (Effect of acetylcholine and GABA on the transfer function of electromotility in isolated outer hair cells. *Hear Res* 95:87-99.1996).
- Undie AS, Friedman E (Stimulation of a dopamine D1 receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 253:987-992.1990).
- Vetter DE, Adams JC, Mugnaini E (Chemically distinct rat olivocochlear neurons. *Synapse* 7:21-43.1991).
- Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Turcan S, Ballestero J, Liberman MC, Elgoyhen AB, Boulter J (The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20594-20599.2007).
- Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffiote-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* 23:93-103.1999).
- Vetter DE, Mugnaini E (An evaluation of retrograde tracing methods for the identification of chemically distinct cochlear efferent neurons. *Arch Ital Biol* 128:331-353.1990).
- Wang HY, Undie AS, Friedman E (Evidence for the coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. *Mol Pharmacol* 48:988-994.1995).
- Wang H, Yin G, Rogers K, Miralles C, De Blas AL, Rubio ME (Monaural conductive hearing loss alters the expression of the GluA3 AMPA and glycine receptor alpha1 subunits in bushy and fusiform cells of the cochlear nucleus. *Neuroscience* 199:438-451.2011).

- Warr WB (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* 161:159-181.1975).
- Warr WB (Efferent components of the auditory system. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 89:114-120.1980).
- Warr WB, Guinan JJ, Jr. (Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res* 173:152-155.1979).
- Webster DB, Trune DR (Cochlear nuclear complex of mice. *Am J Anat* 163:103-130.1982).
- Wedemeyer C, Martín JZdS, Ballesterro J, Go´mez-Casati ME, Torbidoni AV, Fuchs PA, Bettler B, Belen A, Elgoyhen, Katz E (Activation of Presynaptic GABAB(1a,2) Receptors Inhibits Synaptic Transmission at Mammalian Inhibitory Cholinergic Olivocochlear–Hair Cell Synapses. *Journal of Neuroscience* 33:15477-15487.2013).
- Weedman DL, Ryugo DK (Projections from auditory cortex to the cochlear nucleus in rats: synapses on granule cell dendrites. *J Comp Neurol* 371:311-324.1996).
- White JS, Warr WB (The dual origins of the olivocochlear bundle in the albino rat. *J Comp Neurol* 219:203-214.1983).
- Whiting B, Moiseff A, Rubio ME (Cochlear nucleus neurons redistribute synaptic AMPA and glycine receptors in response to monaural conductive hearing loss. *Neuroscience* 163:1264-1276.2009).
- Xiao Z, Suga N (Modulation of cochlear hair cells by the auditory cortex in the mustached bat. *Nat Neurosci* 5:57-63.2002).
- Yamamoto Y, Matsubara A, Ishii K, Makinae K, Sasaki A, Shinkawa H (Localization of gamma-aminobutyric acid A receptor subunits in the rat spiral ganglion and organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 122:709-714.2002).
- Yang D, Thalmann R, Simmons DD (Expression of alpha and beta Parvalbumin Is Differentially Regulated in the Rat Organ of Corti during Development. *J Neurobiol* 58:479-492.2004).
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405:149-155.2000).

APÉNDICE

(Trabajos originales)

Long-Term Evolution of Brainstem Electrical Evoked Responses to Sound after Restricted Ablation of the Auditory Cortex

Verónica Lamas¹, Juan C. Alvarado², Juan Carro², Miguel A. Merchán^{2*}

1 Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **2** Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas (IDINE), Facultad de Medicina de Albacete, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus in Albacete, Albacete, Spain

Abstract

Introduction: This study aimed to assess the top-down control of sound processing in the auditory brainstem of rats. Short latency evoked responses were analyzed after unilateral or bilateral ablation of auditory cortex. This experimental paradigm was also used towards analyzing the long-term evolution of post-lesion plasticity in the auditory system and its ability to self-repair.

Method: Auditory cortex lesions were performed in rats by stereotactically guided fine-needle aspiration of the cerebrocortical surface. Auditory Brainstem Responses (ABR) were recorded at post-surgery day (PSD) 1, 7, 15 and 30. Recordings were performed under closed-field conditions, using click trains at different sound intensity levels, followed by statistical analysis of threshold values and ABR amplitude and latency variables. Subsequently, brains were sectioned and immunostained for GAD and parvalbumin to assess the location and extent of lesions accurately.

Results: Alterations in ABR variables depended on the type of lesion and post-surgery time of ABR recordings. Accordingly, bilateral ablations caused a statistically significant increase in thresholds at PSD1 and 7 and a decrease in waves amplitudes at PSD1 that recover at PSD7. No effects on latency were noted at PSD1 and 7, whilst recordings at PSD15 and 30 showed statistically significant decreases in latency. Conversely, unilateral ablations had no effect on auditory thresholds or latencies, while wave amplitudes only decreased at PSD1 strictly in the ipsilateral ear.

Conclusion: Post-lesion plasticity in the auditory system acts in two time periods: short-term period of decreased sound sensitivity (until PSD7), most likely resulting from axonal degeneration; and a long-term period (up to PSD7), with changes in latency responses and recovery of thresholds and amplitudes values. The cerebral cortex may have a net positive gain on the auditory pathway response to sound.

Citation: Lamas V, Alvarado JC, Carro J, Merchán MA (2013) Long-Term Evolution of Brainstem Electrical Evoked Responses to Sound after Restricted Ablation of the Auditory Cortex. PLoS ONE 8(9): e73585. doi:10.1371/journal.pone.0073585

Editor: Makoto Sato, University of Fukui, Faculty of Medical Sciences, Japan

Received: May 21, 2013; **Accepted:** July 25, 2013; **Published:** September 16, 2013

Copyright: © 2013 Lamas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by a grant from the Ministry of Economy and Competitiveness of the Government of Spain, BFU2012-39982-C02. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: merchan@usal.es

Introduction

Rasmussen's early anatomical studies showed the existence of descending connections along almost all relay stations in the auditory pathway [1]. The end effectors of this chain are the olivocochlear neurons, which in turn regulate the inner ear responses. This efferent pathway feedback on cochlear responses was masterfully shown in electrophysiological experiments performed by Robert Galambos, who found that electrical stimulation of olivocochlear fibres causes a drop in the electrically evoked activation of the cochlea after sound stimulation [2].

Recent anatomical studies have shown direct cortical projections to cochlear nuclei and the olivary complex, which includes the ventral nucleus of the trapezoid body (VNTB), lateral superior olive (LSO) and dorsal periolivary region of the LSO [3,4,5]. The combination of retrograde and anterograde tracing has shown close contacts between medial olivocochlear (MOC) neurons and

corticofugal terminals in the VNTB [4]. Anterograde tracers injected in the temporal cortex also showed terminal fields from the auditory cortex (AC) in the LSO and dorsal periolivary region [3], wherein lateral olivocochlear (LOC) neurons are located. These findings and the presumably excitatory character of the corticofugal pathway [6] suggest that the cerebral cortex may activate both MOC and LOC neurons and its efferent circuits to the cochlea and cochlear nuclei.

The physiological effects of the descending control on the responses of the olivocochlear efferent system have been analyzed in experiments of electrical stimulation, chemical blockade, cooling or ablation of the AC. Electrical stimulation of AC has shown changes in the inner ear cochlear microphonic potentials [7] and a decrease in amplitude of the otoacoustic emissions [8]. An increase in response magnitude and shortening in the response latency of cochlear nuclei has also been shown after AC electrical stimulation [9,10]. The chemical or physical blockage (cooling) of

the AC has also enabled to analyze its effects on the peripheral processing of sound [7,11]. A cortical ablation animal model for analyzing the descending control effect on auditory startle reflex and auditory brainstem responses (ABR) has been previously used by Hunter and Willot [12]. These authors observed minimal changes in ABR threshold, no changes in latencies but a decrease in ABR amplitudes 1 day after ablation and recovery 30 days later.

A different ipsi- versus contralateral effect of cortical deprivation (AC ablation) may be expected on electrically evoked activity in the brainstem because the descending projection to the brainstem ends bilaterally, albeit with a weak contralateral component [3,5,13].

This study aimed to shed light on the effect of top-down control on the lower auditory pathway by comparing ABRs assessed after unilateral vs. bilateral cortical lesions. Previous findings from our laboratory have shown reversible changes in c-Fos protein expression, calretinin immunostaining and gene expression in the midbrain after AC ablations, suggesting the long-term regulation of post-lesion plasticity in the auditory pathway [14,15,16].

This study was conducted to gain insight on the role of the descending control in hearing and aimed to examine the long-term self-repair compensation of the AC at different post-lesion times following corticofugal deprivation.

Methods

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Spanish Council (Royal Decree 53/2013 - Law 32/2007) and the European Union (Directive 2010/63/EU) for the Use of Animals in Neuroscience Research. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Salamanca (Permit Number: 2012-265). All surgery was performed under monitored anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. Forty-two young male Wistar rats weighing between 250–300 g were used in this study. According to the experimental procedure, animals were divided into 4 experimental groups ($n=7$), as follows:

Group 1 - Animals bilaterally ablated and ABR recording prior to surgery and at PSD1 and PSD7.

Group 2 - Animals bilaterally ablated and ABR recording prior to surgery and at PSD15 and PSD30.

Group 3 - Animals unilaterally ablated and ABR recording prior to surgery and at PSD1 and PSD7.

Group 4 - Animals unilaterally ablated and ABR recording prior to surgery and at PSD15 and PSD30.

It has been shown that multiple doses of anesthesia could have potential negative effects on ABR recordings, such as tolerance and dose-dependent effect over the ABR parameters [17,18,19]. To avoid the negative effects, the two experimental groups (PSD1–7 and PSD15–30) were used instead of repeated measurements from single animals.

Additionally, non-ablated control groups ($n=7$) were tested towards assessing the effect of anesthesia on ABRs, following a temporal sequence similar to the ablated groups. The control recordings were performed 1 and 7 days after the first ABR recording (at 250–300 g) in Group 5 and 15 and 30 days later in Group 6. The analysis of these groups showed no statistically significant changes ($p>0.05$, $df=3$, $F=4.293$).

Surgical procedure

The AC ablations were performed under anesthesia using a mixture of ketamine chlorhydrate (30 mg/kg Imalgene 1000, Rhone Mèreuse, Lyon, France) and xylazine chlorhydrate (5 mg/Kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) for anesthesia. Animals were placed in a stereotaxic frame (#900, David Kopf Ins., Tujinga, CA, EEUU) and the left superficial area of the cranial surface was surgically exposed. A window including the primary and secondary AC areas was opened in the skull, following the stereotaxic coordinates of Paxinos and Watson [20], and the AC was removed by gentle aspiration. The animals were returned to their cages after the ablations, carefully monitoring the post-surgery recovery.

ABR recording

ABR recordings were performed using a close-field real-time signal processing system (Tucker-Davis Technologies [TDT], System 3, Alachua, FL, USA). The system output was calibrated before the recordings using a one-quarter inch microphone (Brüel and Kjaer) to confirm that a twofold voltage increase correspond to increases in 6 dB SPL of intensity, strictly up to a maximal value of 100 dB SPL. The ABR recordings never exceeded this value.

ABR recordings were performed before and 1, 7, 15 and 30 days after the surgery (as indicated above). Animals were anesthetized and placed in a stereotaxic frame using two hollow methacrylate bars to perform the recordings. Three subcutaneous needle electrodes placed at the vertex (reference electrode), the mastoid ipsilateral to the stimulated ear (active electrode) and the mastoid contralateral to the stimulated ear (ground electrode), were used for the recordings. Stimuli consisted of a 5 milliseconds (msec) window with 1 - msec pre-stimuli period and a 0.1-msec alternating polarity click with a repetition rate of 11 bursts/s, delivered in 10-dB ascending steps from 10 to 90 dB (Sound Pressure Level, SPL). The stimuli were delivered using a magnetic speaker through tubal earphones inserted into the external auditory channel of a single ear via the methacrylate bar. A 24-cm-long tube resulted in a 0.75-msec air conduction time of stimulus arrival at the tympanic membrane. This delay was added to the 1 msec pre-stimuli period to calculate the onset of ABR (1.7 msec). Responses were averaged 1000 times. Evoked potentials were amplified and digitized using a Medusa RA16PA preamplifier and RA4LI headstage. The final signal was filtered with a 500-Hz high-pass filter and a 3000-Hz low-pass filter.

ABR Analysis

The ABR magnitude was measured in terms of the mean peak voltage during the 5-msec response window immediately before the stimulus onset. The quality of each recording was assessed measuring the mean background voltage of the 1-msec period before the stimulus onset. The ABR threshold was defined as the stimulus level that evoked a mean voltage +2SD above the mean background activity.

The positive and negative peaks of each wave and its latency values at 80 dB SPL were assessed using the peak analyzer application of OriginPro 8.5.1 (OriginLab, Northampton, MA) software. Wave amplitude was defined as the sum of the positive and negative peak values of each wave. The absolute wave I latency was defined as the time in msec from the onset to the positive peak of the wave. The interpeak latencies were defined as the time in msec between the positive peaks of the different ABRs waves. Statistical analyses were performed using the SPSS-IBM software, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All quantitative data (amplitude and latency values) were expressed as mean value \pm standard error of the mean (SEM). The

differences between groups were analyzed by analysis of variance (ANOVA), using the Levene Test for analysis of homogeneity of variance, followed by the Fisher's Least Significant Difference (LSD) test for post hoc comparison, when appropriate, or the Greenhouse-Geisser test (no homogeneity of variances) and Bonferroni-test (two by two comparisons). Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$. Wave V was excluded from the study because it was not found in any ABR recording. The amplitude and latency percentage of change [21] was calculated using the formula: $[(\text{post-lesion value} - \text{pre-lesion value}) / \text{pre-lesion value}] \times 100$. An example of a control animal ABRs recording is shown in Fig. 1.

Histological procedures: immunocytochemistry and lesion localization

Fixation and sectioning. Once the recordings protocols were completed, animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of 6% sodium pentobarbitone (60 mg/kg b.w). After a deep anesthesia, 250 ml of Ringer buffer (pH 6.9, 36°C) with 0.01% heparin were perfused through the exposed heart, followed by 1 litre of fixative, consisting of buffered 4% p-formaldehyde.

After fixation, the brains were dissected out, sectioned, and post-fixed by immersion in the same fixative solution for 2 hours before being cryoprotected by immersion in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, at 4°C for 48 hours. The brains were then serially sectioned in the coronal plane at 40 μm with a sliding freezing microtome.

Immunocytochemistry for Glutamic Acid Decarboxylase and Parvalbumin

Floating sections were sequentially washed with 0.05 M TBS, pH 7.6, followed by inhibition of endogenous peroxidase by incubating with 10% methanol + H_2O_2 3% in 0.1 M PB for 10 minutes. Sections were then washed in TBS-Tx, pH 7.6, for 3 \times 15 minutes under continuous shaking. Nonspecific labelling was blocked with fetal calf serum (10%) for Parvalbumin (Pv) and normal horse serum (3%) for GAD. Sections were incubated with the corresponding primary antiserum, against Rabbit glutamate decarboxylase GAD-67; Chemicon AB108 dilution 1:1000 in TBS-Tx (Chemicon/Millipore, Billerica, MA, USA), and Rabbit polyclonal anti Parvalbumin Swant PV28 dilution 1:5000 in TBS-Tx (Swant, Switzerland), for 48 hours at 4°C. This was followed by washing three times in TBS-Tx for 15 minutes each. After several TBS washes, both Pv and GAD sections were incubated with an anti-rabbit biotinylated secondary antibody (biotinylated anti-rabbit IgG H + L, BA- 1000; Vector) at a dilution of 1:200 in TBS-Tx for 120 minutes at room temperature. Subsequently, the sections were washed again in TBS-Tx and incubated in an avidin-biotinylated peroxidase complex - TBS-Tx solution for 90 minutes. The peroxidase reaction was revealed with DAB in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6. The control sections were not incubated with the primary antibodies to test the specificity of the detection systems.

Cresyl violet staining

Every third serial section was stained with 1% cresyl violet (C-1791; Sigma-Aldrich), for 10 minutes. Staining differentiation was in 96% alcohol + acetic acid, and sections were finally dehydrated in graded alcohols from 50% to 100%, followed by clearing in xylene (3 \times 3 minutes).

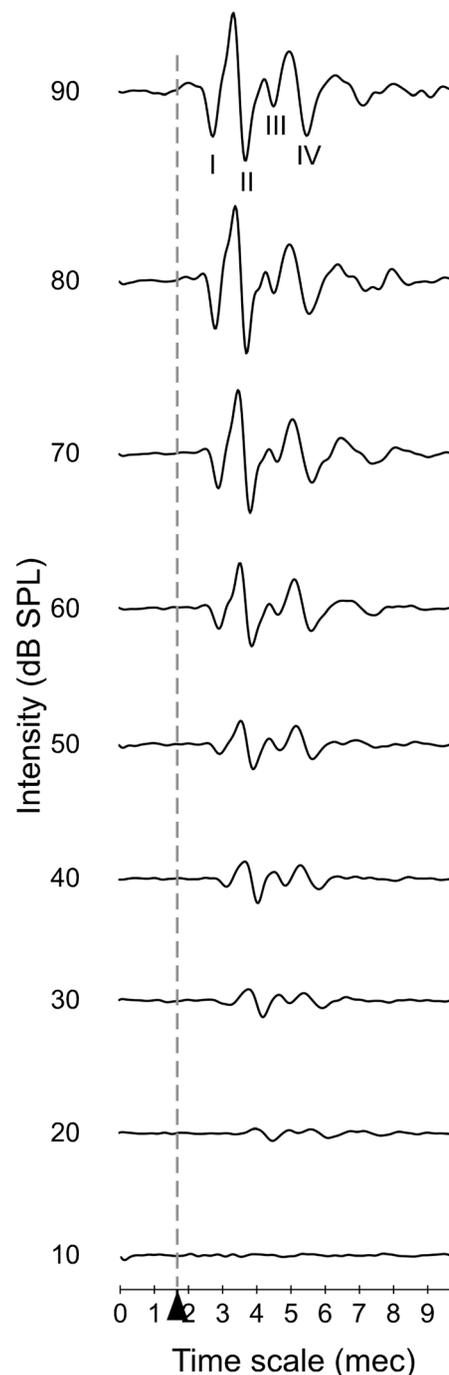


Figure 1. An example of the ABR waveforms obtained from a control animal during recordings from 10 to 90 dB SPL along the first 10 milliseconds (msec). The stimulus onset starts at 1.7 msec and all waves were visible between 20 and 30 dB SPL. Note that, according to literature (Alvarado et al. 2012), wave II is the largest wave in rat ABR recordings whereas wave III is the smallest. doi:10.1371/journal.pone.0073585.g001

Localisation of the lesions

The localisation of the lesions was performed as described previously [14]. Briefly, a map of coordinates was designed to localize the lesions in the ablated brains. In two control animals, a large longitudinal window was opened in the superficial area of the cranial surface from a deeply anesthetized rat and two needles

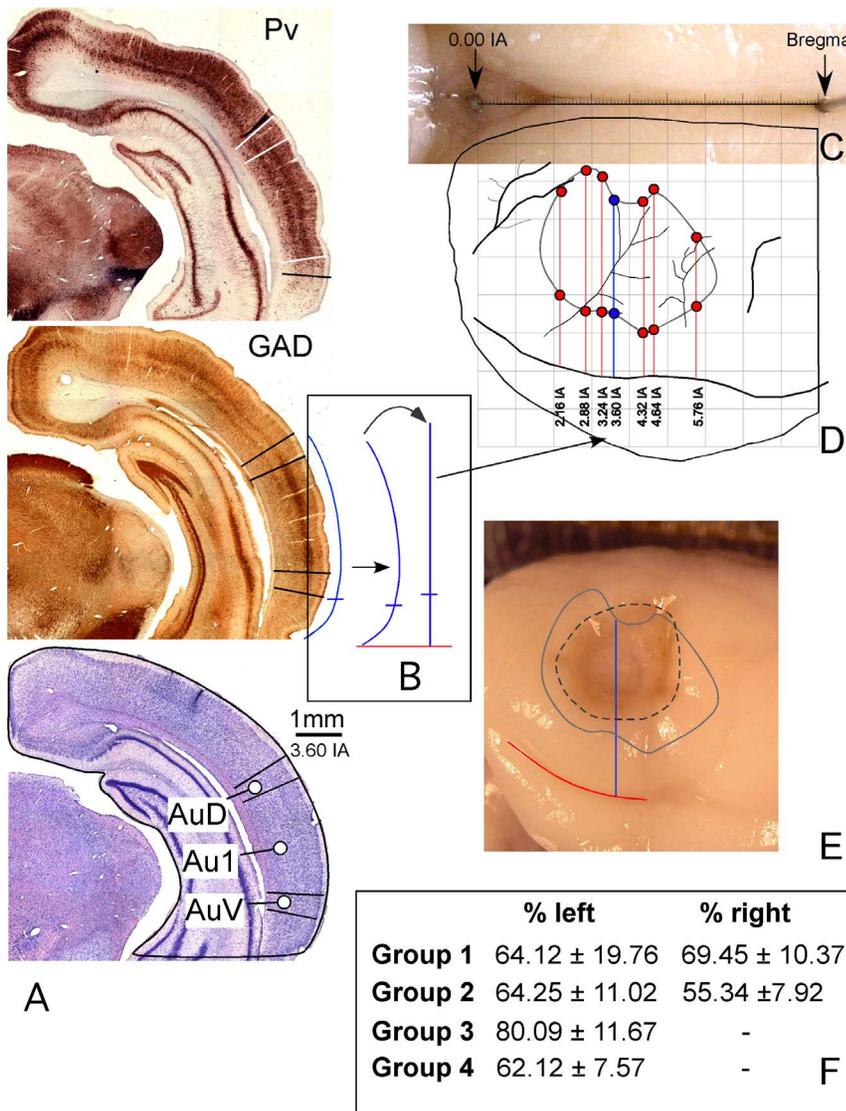


Figure 2. Procedure for the location and extent of lesions in the rat brain AC. **A.** Coronal caudal sections at a similar rostro-caudal level stained with Parvalbumin (Pv), Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) and Nissl (interaural 3.60 – similar to Paxinos and Watson). In the immunostained sections, positive pyramidal cells and neuropil of layers III and V enable to define the AC boundaries (highlighted on the photographs with lines perpendicular to the surface of the section). **B.** Outline of the section contour after labeling the AC boundary. The straight line (in bold) on the right side of the curved arrow was drawn with the same length as the auditory cortex perimeter, using the Canvas software. After scaling the line to compensate the shrinkage of the section, the coordinates were transferred to the macroscopic image of the brain (thick arrow). **C.** Photograph of the brain midline with stereotactically (Paxinos and Watson coordinates) implanted needles in 0.00 IA and Bregma. **D.** AC map after transferring the coordinates of AC boundaries from seven rostrocaudal sectioning levels. **E.** Overlapping map of the cortex on a matrix, positioned into a matrix to calculate the extension and location of the ablated surface relative to the AC boundaries. **F.** Results of the percentage of AC affected by lesions in the experimental groups. doi:10.1371/journal.pone.0073585.g002

were inserted into the bregma and interaural 0 references following the coordinates of Paxinos and Watson [20] (Fig. 2C). Two more needles, separated by 1 mm, were stereotactically placed in the brain to calculate the retraction of the brain with respect to the histological sections. The brain was carefully removed, after finishing the surgery, and immersed in 4% paraformaldehyde. After post-fixation, the lateral surface of the brain was photographed using a Nikon camera located 21 cm above the brain. The photograph was superimposed with a 9×9 mm grid using the Canvas X computer program to transfer the reference coordinates (Bregma and interaural 0.00) to the brain surface (Fig. 2D and E). Stained sections were photographed

using a Leica DMRB microscope with ×10 objective, and mosaics were generated using a motorized stage and the NeuroLucida program (MicroBright field - USA) (Fig. 2A). The limits of the AC were determined by GAD, parvalbumin, and Nissl staining in accordance with Paxinos and Watson [20]

The measurements of the distances between the limits of the AC were transferred to the brain photographs using the rhinal fissure of the brain as reference (Fig. 2D and E). This was accurately performed by compensating the error of the brain curvature using the tool “dimensioning perimeter” of the Canvas X computer software (Figs. 2 B). The resulting map (Fig. 2 D) was superimposed with photographs from the ablated brains (Fig. 2E),

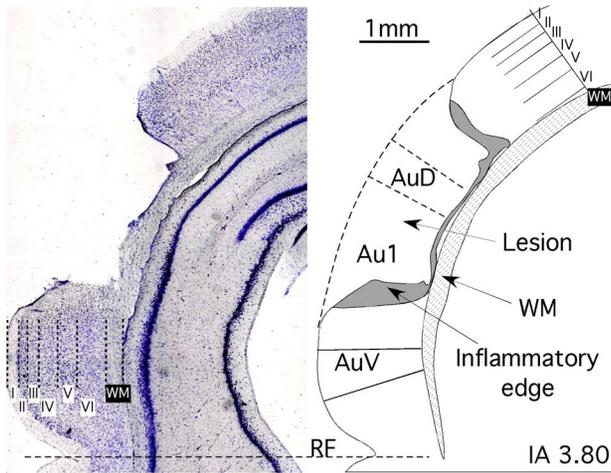


Figure 3. Example of section from animals received lesions. Left, a Nissl stained section showing the different cortical layers and the ablated area. **Right**, the corresponding drawing line, showing the AC subdivisions affected by the ablation. Note that lesion affect all AC layers but not the underlying white matter (WM). doi:10.1371/journal.pone.0073585.g003

and the percentage of lesion was calculated relative to the area occupied by the AC.

Results

Localisation of lesions

The analysis of the ablated AC area showed that lesions included a region ranging from 70 to 100% of the total AC area. Fig. 2 F summarizes the mean percentage \pm SEM of the lesion

from each group of animals, and Figure 3 shows an example of a section from animals received a lesion.

ABR recordings

Threshold. The ABR threshold of the bilateral ablated animals before surgery was 11.29 ± 1.23 dB SPL in the short-term group (PSD1–7) and 15.97 ± 1.49 dB SPL in the long-term group (PSD15–30). After surgery, the ABR threshold of animals from the short term group increases to 14.50 ± 1.00 dB SPL at PSD1 and 16.93 ± 1.73 dB SPL at PSD7, while animals from the long term group showed ABR thresholds similar to the pre-ablation condition both at PSD15 and 30 (14.70 ± 0.95 and 14.78 ± 0.86 dB SPL, respectively). The increase in threshold by 28.43% at PSD1 and 49.95% at PSD7 was statistically significant ($p < 0.05$, $F = 3.660$, $df = 2$). However, changes in the ABR threshold at PSD15 and 30 were not statistically significant.

The ABR recordings of animals from the unilateral ablated groups were divided into those in which the ear ipsilateral to the lesion was used and those in which the contralateral ear to the lesion was used. When the ear ipsilateral to the lesion was used, the animals from the short-term group showed an ABR threshold before surgery of 19.72 ± 1.23 dB SPL and the animals from the long-term group showed a threshold of 18.47 ± 2.28 dB SPL, while the ABR thresholds after injury were 14.53 ± 2.72 dB SPL at PSD1, 14.01 ± 1.29 dB SPL at PSD7, 19.46 ± 3.85 at PSD15 and 17.62 ± 2.41 dB SPL at PSD30. Stimulation in the ear contralateral to the lesion showed an ABR threshold before the ablation of 12.61 ± 1.73 dB SPL in the animals from the short-term group and 13.13 ± 1.64 dB SPL in the animals from the long-term group, while the thresholds after surgery were 14.63 ± 2.57 dB SPL at PSD1, 14.47 ± 0.87 dB SPL at PSD7, 13.31 ± 0.76 at PSD15 and 15.54 ± 0.78 dB SPL at PSD30. No statistically significant differences were found in the ABR threshold of the unilateral

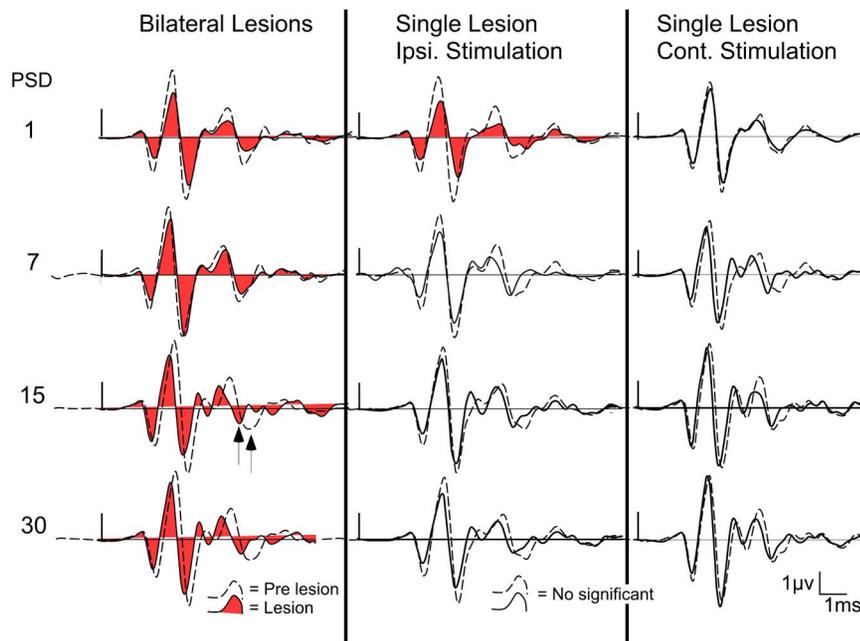


Figure 4. Average ABRs waveform before and after cortical ablation from all experimental groups (n = 7), at different post-surgery days (PSD): at left, ABR waveforms from animals with bilateral AC lesions; in the middle, ABR waveforms of the ear ipsilateral to the AC ablation from the unilaterally ablated animals; at right, ABR waveforms of the ear contralateral to the AC ablation from the unilaterally ablated animals. doi:10.1371/journal.pone.0073585.g004

Bilateral ablated Groups

Wave amplitudes of the ABRs (μV)

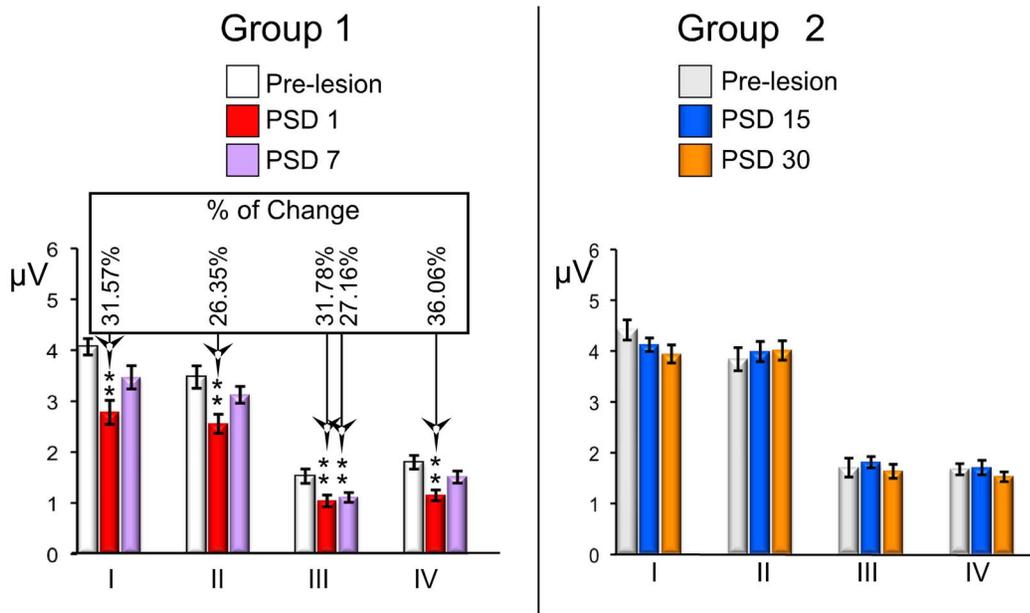


Figure 5. ABRs changes in waves amplitudes from the bilateral ablated experimental groups. The mean \pm SEM amplitude of waves in microvolts (μV) is shown in the graphs. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. The percentage of change (Alvarado et al 2007) regarding the pre-lesion condition is shown in the top box. Note that all mean values of waves decrease in relation to the pre-lesion condition in the short-term (PSD1 and 7) periods, and no significant changes were observed at long-term (PSD15 and 30). doi:10.1371/journal.pone.0073585.g005

ablated animals, at any PSD, regardless of the ear used for stimulation.

Wave Amplitudes. The amplitudes of all ABR waves assessed (I–IV) in the short-term group of the bilateral ablated animals showed a significant decrease in both PSD1 and PSD7 experimental animals, compared to those values before the surgery (Fig. 4 and 5). The PSD1 experimental condition showed a significant decrease in wave I by 31.57% (df. = 2; $F = 13.842$), in wave II by 26.35% (df. = 2; $F = 9.216$), in wave III by 31.78% (df. = 2; $F = 21.097$) and in wave IV by 36.06% (df. = 1.359; $F = 14.015$) (Fig. 5 left). Wave III also showed a statistically significant decrease of 27.16% at PSD7, although the decrease in the amplitude of waves I, II and IV in this experimental condition (PSD7) was not statistically significant in relation to the pre-lesion condition (Fig. 5 left). ABRs from the bilaterally ablated long-term group showed wave amplitudes after the injury similar to those in the pre-lesion condition, and no statistically significant changes were found either in PSD15 or PSD30 (Fig. 4 and Fig. 5 right).

The ABR recordings in the unilaterally ablated animals were divided into those in which the ear ipsilateral to the lesion was used and those in which the ear contralateral to the lesion was used for sound stimulation. Using the ear ipsilateral to the lesion, rats from the short-term group showed a decrease in wave amplitudes at PSD1 (Fig. 4 and 6). This experimental condition showed a statistically significant decrease of wave I of 34% ($p < 0.05$; df. = 2; $F = 6.759$), wave II of 37.57% ($p < 0.01$; df. = 2; $F = 17.294$) and wave III of 37.57% ($p < 0.05$; df. = 2; $F = 5.565$) (Fig. 6 left). The decrease in the amplitude of wave IV was not statistically significant (Fig. 6 left). ABRs recorded during stimulation of the

ipsilateral ear from the long-term group showed wave amplitudes after injury similar to those to the pre-lesion condition, and no statistically significant changes were found either at PSD15 or PSD30 (Fig. 4 and Fig. 6 right).

When the ear contralateral to the lesion was used, rats from both short- and long-term groups showed wave amplitudes after surgery similar to those in the pre-lesion condition, and no statistically significant changes were found at any PSD (Fig. 4).

Waves latencies. The ABR from the short-term group of the bilaterally ablated animals showed absolute latencies of wave I and interpeak latencies of waves after injury similar to those in the pre-lesion condition, and no statistically significant changes were found either in PSD1 or PSD7 (Fig. 4 and Fig. 7 left). However, there was a shortening in the latencies of the long-term (PSD15 and 30) animals (Fig. 4 and Fig. 7 right) This experimental condition showed a statistically significant shortening in the absolute latency of wave I of 4.09% at PSD15 and 4.67% at PSD 30 ($p < 0.01$; df. = 2; $F = 10.458$), and a statistically significant shortening in the interpeak latency of waves I–II of 6.49% at PSD15 and 4.56% at PSD30 ($p < 0.05$; df. = 2; $F = 8.100$) (Fig. 7 right). Furthermore, the interpeak latencies of waves II–III and I–IV were shortened at PSD30 by 6.20% ($p < 0.05$; df. = 2; $F = 4.683$) and 6.63% ($p < 0.05$; df. = 2; $F = 10.81$), respectively (Fig. 7 right). The interpeak latency of waves III–IV did not show any statistically significant change at PSD 15 and 30 (Fig. 7 right).

The ABR recording in the unilaterally ablated animals were divided according to the ear used to deliver the sound stimulation into those in which the ear ipsilateral to the lesion was used and those in which the ear contralateral to the lesion was used, as

Unilateral ablated group

Ipsilateral ear stimulated

Wave amplitudes (μV)

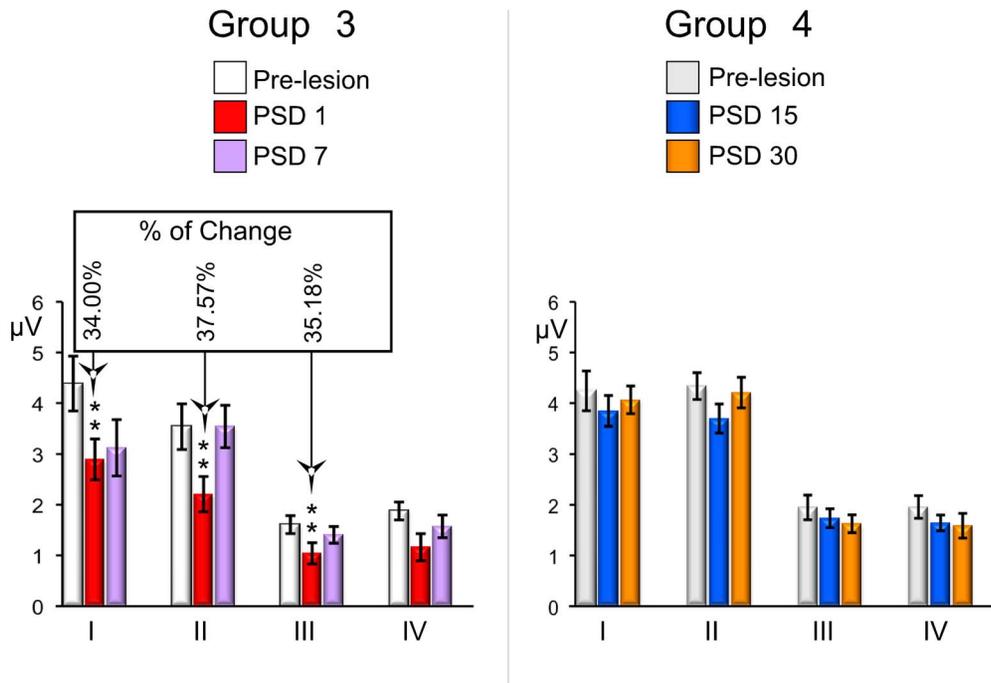


Figure 6. ABRs changes in waves amplitudes from the unilateral ablated experimental groups. The mean \pm SEM amplitude of waves in microvolts (μV) is shown in the graphs. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. The percentage of change (Alvarado et al 2007) regarding the pre-lesion condition is shown in the top box. Note that mean values of waves I, II and III decrease in relation to the pre-lesion condition in the short-term (PSD 1 and 7) periods, and no significant changes was observed at long-term (PSD 15 and 30). doi:10.1371/journal.pone.0073585.g006

previously indicated. Animals from both short- and long-term groups showed ABR latencies after injury during the stimulation of the ear ipsilateral to the lesion similar to those in the pre-lesion condition, except the interpeak latency of waves I–II, which were significantly increased by 8.67% ($p < 0.05$; $df = 2$; $F = 4.252$) at PSD1 (Fig. 4 and 8).

Rats from both short- and long-term groups showed wave latencies after surgery similar to those in the pre-lesion condition when the ear contralateral to the lesion was used, and no statistically significant changes were found at any PSD (Fig. 4).

Discussion

Changes in auditory brainstem evoked responses found in the present study depended on the type of lesion (single or bilateral) induced in the experimental animals and the post-surgery time of ABR recordings. Accordingly, bilateral AC ablations caused a significant increase in the thresholds of ABR recordings at PSD1 and 7. Conversely, unilateral AC ablation did not have any statistically significant effect on the auditory thresholds at any PSD. The wave amplitudes significantly decreased at PSD1 and 7 following bilateral AC ablations, while a decrease in wave amplitude only occurred following unilateral AC ablations at PSD1, and then only upon stimulation of the ear ipsilateral to the lesion. Finally, no effects on the latencies were noted in the

bilaterally ablated group at PSD1 and 7. However, statistically significant decreases in latency were found at PSD15 and 30. A statistically significant increase in wave I–II interpeak latency was found at PSD1 following unilateral ablation, albeit just upon stimulation of the ear ipsilateral to the lesion, as previously indicated (Table 1 summarizes all these results).

The ABR threshold is the lowest intensity (in dB SPL) that evokes a peak voltage response corresponding to a minimum of 2SD above the mean background activity. Wave II is the largest wave in rat ABR recordings [22] and it is frequently used to calculate the threshold value. The ABR threshold could be defined as the lowest intensity at which an electrically evoked response is produced by the auditory brainstem because the waves in ABR recordings of these animals are generally accepted to correspond to the activation of the auditory nerve, cochlear nuclei, superior olivary complex and lateral lemniscus (waves I, II, III and IV, respectively) [23]. It has been previously shown that this electrical activity evoked in the brainstem could be attenuated or eliminated by lesions in the auditory nerve [23,24]. This has led to suggesting that the increase in ABR threshold and decrease in wave amplitude following bilateral AC ablations, reported herein, could be explained as a consequence of the decrease in activity of the organ of Corti and the auditory nerve, upon removal of cortical inputs. In the cochlea, depolarization and firing of spiral ganglion type I neurons may be regulated in two ways, by

Bilateral ablated Group

ABR Waves Latencies (msec.)

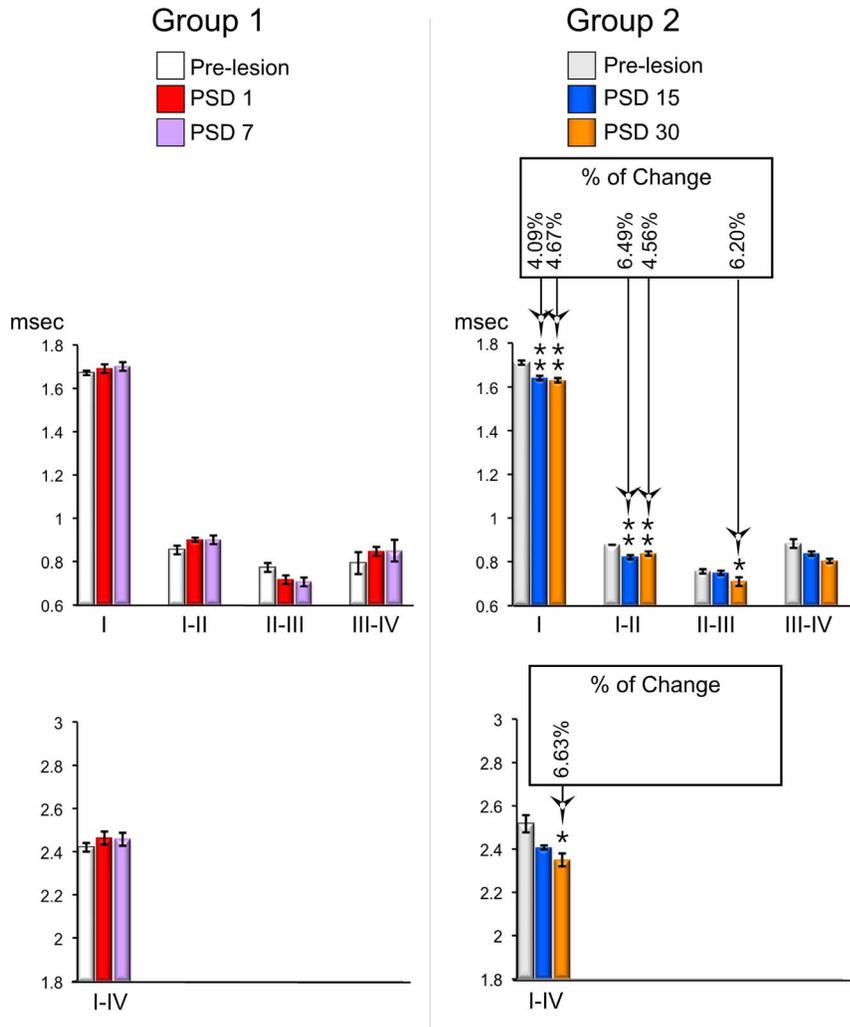


Figure 7. ABRs changes in waves latencies from the bilateral ablated experimental groups. The mean \pm SEM of significant latencies of all intervals of waves in milliseconds are shown on the graphs. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. The percentage of change (Alvarado et al 2007) regarding the pre-lesion condition is shown in the top box. Latencies are significantly shortened in recordings conducted in the long-term (PSD 15 and 30).

doi:10.1371/journal.pone.0073585.g007

modulating the glutamatergic activation of inner hair cells (IHC), through LOC activation, and/or indirectly by changes in the micromechanical activity of the outer hair cells (OHC), through MOC activation [25]. The LOC efferent system may alter the resting potential or “set-point” of distal dendrites of type I spiral ganglion neurons, changing its sensitivity to IHC glutamatergic activation [25]. The activity of MOC fibres hyperpolarizes OHC and adjusts its axial stiffness, thereby modulating its motility and changing the gain of the cochlear amplifier [26,27,28,29]. Previous studies have shown an effective cortical modulation in the activation of type I spiral ganglion distal dendrites. Accordingly, decreases in compound action potential amplitudes after cooling or lidocaine inactivation of the AC [11] suggest a top-down control of the auditory nerve fibres. Furthermore, changes in cochlear microphonic amplitudes and otoacoustic emissions have been shown following AC electrical stimulation [7,8] and AC

resection or deactivation by muscimol [7,30] indicating that AC may regulate OHC activity.

Considering the combined effect of the descending projections on the medial and lateral efferent systems, we suggest that the changes in threshold and waves amplitude noted in our experiments following bilateral AC ablation could be explained by the loss of descending inputs on MOC and/or LOC neurons. This loss could induce a decrease in the activity of these systems and, consequently, reduce their effect on the cochlea. Anatomical studies using retrograde and anterograde tracing methods also support this hypothesis. For example, close contacts have been shown between MOC neurons and corticofugal terminals in the VNTB [4]. Furthermore, terminal fields from the AC have been identified in the LSO and dorsal periolivary region, where LOC neurons are located [3]. In addition, the increased thresholds and decreased wave amplitudes following bilateral cortical ablation

Unilateral ablated group

Ipsilateral ear stimulated

ABR Waves Latencies (msec.)

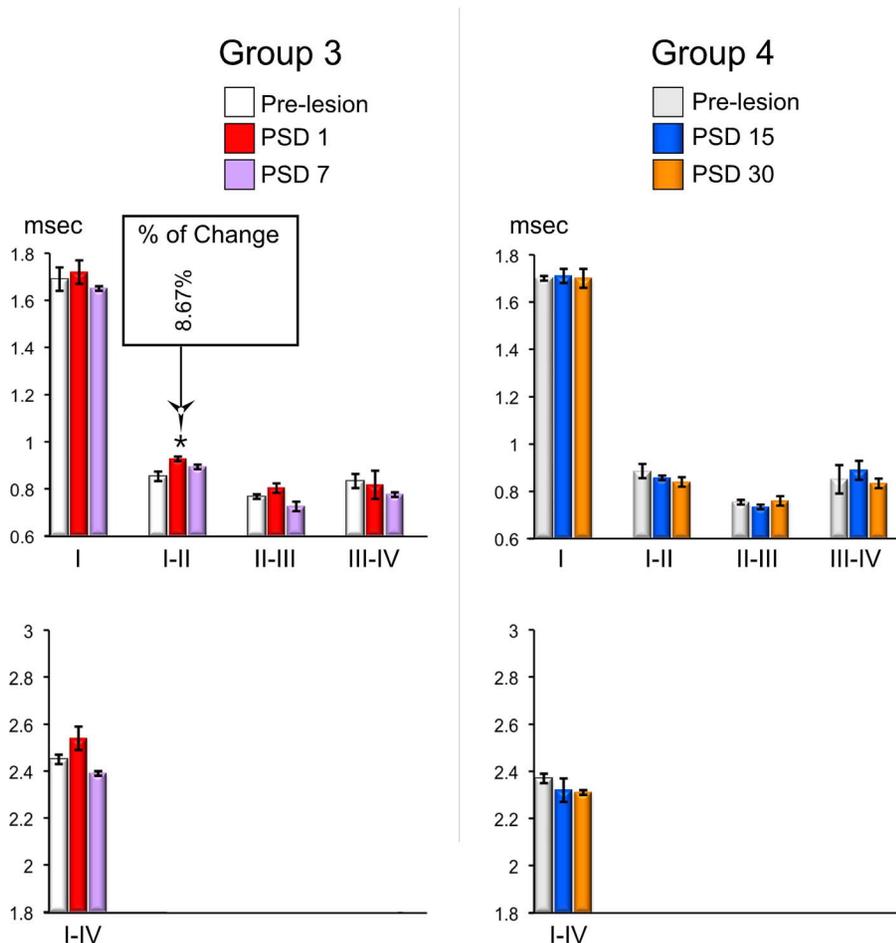


Figure 8. ABRs changes in waves latencies from the unilateral ablated experimental groups. The mean \pm SEM of significant latencies of all intervals of waves in milliseconds are shown on the graphs. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. *** $p < 0.001$. The percentage of change (Alvarado et al 2007) regarding the pre-lesion condition is shown in the top box. Latencies of wave I-II are significantly increased in recordings conducted in the short-term (PSD 1).

doi:10.1371/journal.pone.0073585.g008

could also suggest a reinforcing AC role on the excitation of the caudal auditory pathway because the corticofugal projection seems to have an excitatory and potentially glutamatergic role [6]. Therefore, the findings in the present study support the hypothesis that inputs from the AC could act as drivers of the lower brainstem auditory nuclei and their removal would impact the activity of those nuclei.

Both threshold values and wave amplitudes reverted to control levels at the longest post-surgery periods, that is, PSD15 and 30. Our cortical lesion may cause the degeneration of fibres directly connecting the cortex to the olivo-cochlear neurons and to those connecting to the midbrain. Previous studies from our laboratory have shown that cortical ablation produces a decrease in c-Fos immunoreactivity in the IC, which is restored in long post-surgery periods in experimental animals [15]. This long-term reactivation of the IC should also affect colliculo-olivary connections and, therefore, could be involved in the recovery (PSD15 and 30) of

ABR wave parameters found in the present study, because the electrical stimulation of the IC has shown to modulate the cochlear afferent response by the olivo-cochlear system [31]. Further studies assessing the electrical stimulation of the IC and performing electrophysiological recordings in the superior olivary complex in animal models, are required to confirm this hypothesis.

Moreover, a long-term functional adaptation of inner ear hair cell synapses should also be considered. Altering the balance of excitation and inhibition in a central nervous system (CNS) network affects the synthesis and trafficking of postsynaptic receptors and channels (scaling), thereby modifying the synaptic strength and conductance of axons [32]. These changes lead to a dynamic self-regulating process known as homeostatic plasticity, which is maintained until the network recovers its balance (set point level) [33]. A synaptic scaling mechanism has been suggested in the cochlear nuclei as a response to changes in auditory nerve activity following unilateral occlusion of the external ear canal in

Table 1. Summary of the changes in the ABR statistical analysis in the different experimental groups.

Bilateral lesions					Unilateral lesion Ipsilateral stimulation				Unilateral lesion Contralateral stimulation			
	1	7	15	30	1	7	15	30	1	7	15	30
PSD												
Threshold	↑*	↑*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amplitudes												
W. I	↓**	-	-	-	↓*	-	-	-	-	-	-	-
W. II	↓**	-	-	-	↓**	-	-	-	-	-	-	-
W. III	↓**	↓**	-	-	↓*	-	-	-	-	-	-	-
W. IV	↓**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Latencies												
W. I	-	-	↓**	↓**	-	-	-	-	-	-	-	-
Ws. I-II	-	-	↓*	↓*	↑*	-	-	-	-	-	-	-
Ws. II-III	-	-	-	↓*	-	-	-	-	-	-	-	-
Ws. III-IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ws. I-IV	-	-	-	↓**	-	-	-	-	-	-	-	-

W(s) = wave(s). On = onset.

*p<0.05.

**p<0.01.

***p<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0073585.t001

rats by unilateral ear plugging [34]. These authors show that globular cells, intermediaries in the chain that forms the cochlear-brainstem feedback loop, up-regulate the synthesis of the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor subunit 3 (GluA3; excitation) and down-regulates glycine receptor alpha 1 subunit (GlyRalpha1; inhibition), as a compensatory homeostatic response to decreased activity in the auditory nerve.

A synaptic scaling homeostatic mechanisms to rebalance the olivo-cochlear system in the inner hair cells and superior olivary complex or cochlear nuclei may explain the recovery of ABRs shown after PSD7. Ongoing studies, using qPCR analysis of several genes in the organ of Corti after AC lesion of our laboratory appear to support this hypothesis (data not shown).

The correlation between waves in ABR recordings and auditory nuclei, and the tracts which generated them, may be understood based on studies assessing small lesions in the caudal auditory pathway of cats [35,36,37]. Additionally, a similar approach using radiofrequency lesions performed in rats has shown changes in wave III of ABR recordings after altering the superior olivary complex or lateral lemniscus [23]. Interestingly, the present study has also shown that wave amplitudes were restored at PSD 7, except for wave III (Fig. 3 bottom left). This finding suggest a more complicated mechanism of recovery of electrical activity in the superior olivary complex, and most likely reflects a direct effect of the lost of excitation resulting from the removal of the descending corticofugal terminals.

A significant shortening in latency was noted in recordings after long post-surgery periods (PSD15 and 30) following bilateral cortical lesions. The reduction in latency time could be explained by the theory of cochlear filtering, which postulates that a wider frequency tuning produces a shortening of responses. A shortening of response leads to activate faster nerve responses and consequently also the latencies of ABR waves. Therefore, afferent neurons may trigger earlier if the cochlear filtering is reduced by MOC alterations or OHC injury (as reviewed by [38]. Other

experimental evidences also support the notion that changes in MOC activity may generate a decrease in response latency [39,40,41,42,43]. Even clinical results also appear to support this hypothesis by showing that a broader frequency tuning, as a result of peripheral hearing loss, causes the decreased latencies found in ABR recordings of deaf patients [44]. As the above studies appear to indicate, the shortening of latencies noted in the present study at PSD15 or 30, may be explained by an imbalance in cochlear filtering resulting from the long-term reorganization of inputs in MOC neurons following AC deprivation. Moreover, we cannot exclude changes in processing in caudal brainstem nuclei, which may also explain this finding. The hypothesis of a scaling mechanism involved in the long-term functional recovery of auditory thresholds and wave amplitudes in the bilaterally ablated animals imply an enhancement that may affect the latencies of auditory responses. The increased strength towards recovering the auditory system “normal” function could also affect other aspects of the neuronal responses, including the reaction time. Consequently, neuronal latencies could be accelerated. Therefore, the shortening of latencies could be explained by a combination of cochlear filtering and central synaptic scaling.

The descending projection to the auditory brainstem ends bilaterally but with a weak contralateral component [3,5,13], whereby a different effect may be expected in single cortical ablation experiments, when stimulating the ear ipsilateral or contralateral to the lesion. Accordingly, we have found that ipsilateral ear stimulation one day after unilateral ablation, shows statistically significant changes in the amplitude of waves I through III and an increase in the latency between waves I and II. Nonetheless, no significant changes have been noted upon contralateral ear stimulation at any PSD following the unilateral cortical removal. Previous studies from our laboratory have shown that unilateral AC ablations increase the ABR thresholds at PSD15 [45]. This discrepancy, could be explained by differences in the size and location of lesions in the cortex and the fact that

different anesthetic combinations were used in each study. Previous studies [19,46] have shown that the ketamine and medetomidine, used in the study of Clarkson et al. [45] may have a negative effect on the evoked potentials.

The results reported herein suggest that both changes in evoked electrical activity and their reversal over time depend on the number of connections lost after AC lesions and reinforce the hypothesis that the descending control acts as an enhancer of the auditory response.

References

- Rasmussen GL (1953) Further observations of the efferent cochlear bundle. *J Comp Neurol* 99: 61–74.
- Galambos R (1956) Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 19: 424–437.
- Coomes DL, Schofield BR (2004) Projections from the auditory cortex to the superior olivary complex in guinea pigs. *Eur J Neurosci* 19: 2188–2200.
- Mulders WH, Robertson D (2000) Evidence for direct cortical innervation of medial olivocochlear neurons in rats. *Hear Res* 144: 65–72.
- Feliciano M, Saldana E, Mugnaini E (1995) Direct projections from the rat primary auditory neocortex to nucleus sagulum, paralemniscal regions, superior olivary complex and cochlear nuclei. *Auditory Neuroscience* 1: 287–308.
- Feliciano M, Potashner SJ (1995) Evidence for a glutamatergic pathway from the guinea pig auditory cortex to the inferior colliculus. *J Neurochem* 65: 1348–1357.
- Xiao Z, Suga N (2002) Modulation of cochlear hair cells by the auditory cortex in the mustached bat. *Nat Neurosci* 5: 57–63.
- Perrot X, Ryvlin P, Isnard J, Guenot M, Catenoix H, et al. (2006) Evidence for corticofugal modulation of peripheral auditory activity in humans. *Cereb Cortex* 16: 941–948.
- Luo F, Wang Q, Kashani A, Yan J (2008) Corticofugal modulation of initial sound processing in the brain. *J Neurosci* 28: 11615–11621.
- Liu X, Yan Y, Wang Y, Yan J (2010) Corticofugal modulation of initial neural processing of sound information from the ipsilateral ear in the mouse. *PLoS One* 5: e14038.
- Leon A, Elgueda D, Silva MA, Hamame CM, Delano PH (2012) Auditory cortex Basal activity modulates cochlear responses in chinchillas. *PLoS One* 7: e36203.
- Hunter KP, Willott JF (1993) Effects of bilateral lesions of auditory cortex in mice on the acoustic startle response. *Physiol Behav* 54: 1133–1139.
- Schofield BR, Coomes DL (2005) Auditory cortical projections to the cochlear nucleus in guinea pigs. *Hear Res* 199: 89–102.
- Clarkson C, Juiz JM, Merchan MA (2010) Long-term regulation in calretinin staining in the rat inferior colliculus after unilateral auditory cortical ablation. *J Comp Neurol* 518: 4261–4276.
- Clarkson C, Juiz JM, Merchan MA (2010) Transient Down-Regulation of Sound-Induced c-Fos Protein Expression in the Inferior Colliculus after Ablation of the Auditory Cortex. *Front Neuroanat* 4: 141.
- Clarkson C, Herrero-Turrión MJ, Merchan MA (2012) Cortical Auditory Deafferentation Induces Long-Term Plasticity in the Inferior Colliculus of Adult Rats: Microarray and qPCR Analysis. *Front Neural Circuits* 6: 86.
- Cumming JF (1976) The development of an acute tolerance to ketamine. *Anesth Analg* 55: 788–791.
- Livingston A, Waterman AE (1978) The development of tolerance to ketamine in rats and the significance of hepatic metabolism. *Br J Pharmacol* 64: 63–69.
- Church MW, Gritzke R (1987) Effects of ketamine anesthesia on the rat brainstem auditory evoked potential as a function of dose and stimulus intensity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 67: 570–583.
- Paxinos G, Watson C, editors (2005) *The rat Brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Alvarado JC, Vaughan JW, Stanford TR, Stein BE (2007) Multisensory versus unisensory integration: contrasting modes in the superior colliculus. *J Neurophysiol* 97: 3193–3205.
- Alvarado JC, Fuentes-Santamaria V, Jareno-Flores T, Blanco JL, Juiz JM (2012) Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in Wistar rats. *Neurosci Res* 73: 302–311.
- Chen TJ, Chen SS (1991) Generator study of brainstem auditory evoked potentials by a radiofrequency lesion method in rats. *Exp Brain Res* 85: 537–542.
- Rosahl SK, Tatagiba M, Gharabaghi A, Matthies C, Samii M (2000) Acoustic evoked response following transection of the eighth nerve in the rat. *Acta Neurochir (Wien)* 142: 1037–1045.
- Raphael Y, Altschuler RA (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 60: 397–422.
- Klinke R (1986) Neurotransmission in the inner ear. *Hear Res* 22: 235–243.
- Dallos P, He DZ, Lin X, Sziklai I, Mehta S, et al. (1997) Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J Neurosci* 17: 2212–2226.
- Evans MG, Lagostena L, Darbon P, Mammano F (2000) Cholinergic control of membrane conductance and intracellular free Ca²⁺ in outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Cell Calcium* 28: 195–203.
- Sziklai I, Szonyi M, Dallos P (2001) Phosphorylation mediates the influence of acetylcholine upon outer hair cell electromotility. *Acta Otolaryngol* 121: 153–156.
- Khalfia S, Bougeard R, Morand N, Vuilleil E, Isnard J, et al. (2001) Evidence of peripheral auditory activity modulation by the auditory cortex in humans. *Neuroscience* 104: 347–358.
- Groff JA, Liberman MC (2003) Modulation of cochlear afferent response by the lateral olivocochlear system: activation via electrical stimulation of the inferior colliculus. *J Neurophysiol* 90: 3178–3200.
- Perez-Otano I, Ehlers MD (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28: 229–238.
- Turrigiano GG (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 22: 221–227.
- Whiting B, Moiseff A, Rubio ME (2009) Cochlear nucleus neurons redistribute synaptic AMPA and glycine receptors in response to monaural conductive hearing loss. *Neuroscience* 163: 1264–1276.
- Melcher JR, Knudson IM, Fullerton BC, Guinan JJ, Jr., Norris BE, et al. (1996) Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. I. An experimental approach to their identification. *Hear Res* 93: 1–27.
- Melcher JR, Kiang NY (1996) Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. III: Identified cell populations. *Hear Res* 93: 52–71.
- Melcher JR, Guinan JJ Jr, Knudson IM, Kiang NY (1996) Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. II. Correlating lesion sites with waveform changes. *Hear Res* 93: 28–51.
- Guinan JJ Jr (2010) Cochlear efferent innervation and function. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 18: 447–453.
- Francis NA, Guinan JJ Jr (2010) Acoustic stimulation of human medial olivocochlear efferents reduces stimulus-frequency and click-evoked otoacoustic emission delays: Implications for cochlear filter bandwidths. *Hear Res* 267: 36–45.
- Guinan JJ Jr, Stankovic KM (1996) Medial efferent inhibition produces the largest equivalent attenuations at moderate to high sound levels in cat auditory-nerve fibers. *J Acoust Soc Am* 100: 1680–1690.
- Guinan JJ Jr, Gifford ML (1988) Effects of electrical stimulation of efferent olivocochlear neurons on cat auditory-nerve fibers. III. Tuning curves and thresholds at CF. *Hear Res* 37: 29–45.
- Warren EH 3rd, Liberman MC (1989) Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I. Contributions of cochlear efferents. *Hear Res* 37: 89–104.
- Warren EH 3rd, Liberman MC (1989) Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. II. Dependence on stimulus variables. *Hear Res* 37: 105–121.
- Don M, Ponton CW, Eggermont JJ, Kwong B (1998) The effects of sensory hearing loss on cochlear filter times estimated from auditory brainstem response latencies. *J Acoust Soc Am* 104: 2280–2289.
- Clarkson C, Lopez DE, Merchan MA (2010) Long-term functional recovery in the rat auditory system after unilateral auditory cortex ablation. *Acta Otolaryngol* 130: 326–332.
- Hayton SM, Kriss A, Muller DP (1999) Comparison of the effects of four anaesthetic agents on somatosensory evoked potentials in the rat. *Lab Anim* 33: 243–251.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ignacio Plaza for excellent technical assistance, S. Kuwada for their suggestions about ABRs recordings, Carlos V. Melo for proofreading, Sriram Boothalingam and Jose M. Juiz for their helpful comments in the discussion of our findings, and E. Saldaña for the help in the parvalbumin immunocytochemistry.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM. Performed the experiments: VL. Analyzed the data: VL JCA JC MM. Contributed reagents/materials/analysis tools: VL JCA JC MM. Wrote the paper: MM VL.

