



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

REACCIÓN INTERMODAL DE LAS CORTEZAS AUDITIVA Y VISUAL DE LA RATA EN UN MODELO DE SORDERA BILATERAL A LARGO PLAZO

Memoria presentada por Marianny Pernía Rosales para optar al grado
de Doctor por la Universidad de Salamanca

Director:

Prof. Dr. Miguel A. Merchán Cifuentes

Salamanca, 2019



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

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

CERTIFICA

Que la tesis doctoral titulada:

REACCIÓN INTERMODAL DE LAS CORTEZAS AUDITIVA Y VISUAL DE LA RATA EN UN MODELO DE SORDERA BILATERAL A LARGO PLAZO

Es el trabajo de investigación realizado por **Dña. Marianny Pernía Rosales** bajo mi dirección durante los últimos cinco años. La memoria de este estudio recoge un análisis exhaustivo y detallado del efecto a corto y largo plazo de lesiones bilaterales cocleares sobre la activación cortical, así como los cambios que las lesiones producen en la expresión génica y síntesis de proteína de marcadores relacionados con la excitación e inhibición en las cortezas auditiva y visual

Los datos presentados en esta memoria constituyen una contribución original y han permitido un avance significativo en el conocimiento de la reacción intermodal de las cortezas sensoriales de la rata tras la sordera a largo plazo.

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. Marianny Pernía Rosales opte al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 14 de junio de 2019

Prof. Miguel A. Merchán Cifuentes

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO – Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-78898-C2-2-R) -, por la Ayuda de la Junta de Castilla y León a Unidades de Investigación Consolidadas (UIC 083) y por la subvención de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León al Centro en Red de Terapia Celular y Medicina Regenerativa.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias al Prof. Miguel A. Merchán, por aceptarme para realizar la tesis doctoral bajo su dirección y ayudarme en mi formación como investigadora. Gracias por confiar en mí, por guiarme con tanta dedicación y paciencia y por enseñarme, entre tantas cosas, la disciplina que se requiere para hacer ciencia.

A Nacho, por su inmensa generosidad y por su incalculable ayuda, tanto a nivel académico como personal. Gracias por escucharme, por tu apoyo y por tus consejos. Gracias por las risas y por darme ánimos en los momentos difíciles. Has sido uno de los pilares más grandes a lo largo de todos estos años, como técnico y amigo, por lo que darte las gracias es poco.

Al Prof. Casto Rivadulla, por su amabilidad y por realizar los registros de los potenciales evocados visuales, que han aportado un resultado muy importante en esta tesis.

Al Prof. Juan Carro, por su disposición y su ayuda con los análisis estadísticos.

A Clara, por su amistad y por enseñarme el procedimiento de los ABRs y de las lesiones cocleares.

A Javier Herrero, por su gran ayuda durante el aprendizaje del método de las RT-qPCR y con el análisis de los resultados. También gracias a Juan Carlos Arévalo, Verónica González, Samara y Andrés por sus consejos para este método.

A David Pérez González, por su disposición y su ayuda con la calibración de los altavoces y por resolver mis dudas con respecto a los ABRs.

A Richard, Manolo, Lita, Silvia, Elena, Vero, Orlando y Enrique Saldaña, por sus sugerencias y palabras de ánimo que siempre fueron de gran utilidad.

A Ana Velasco, por su solidaridad y ayuda durante mis primeros años en Salamanca.

A Ana, Iván, Sheila, Mila y Sandra, por su amistad y por las risas de desahogo, Ana, gracias por el cariño y por los momentos de humor venezolano. Iván, gracias por contagiar serenidad y tesón y, particularmente, por tu incalculable ayuda en el análisis de los resultados de la inmunocitoquímica. Sheila, gracias por realizar los mapas que se muestran en este manuscrito. Mila, gracias por alegrarme con las ambrosías y la carne “mechada”. Sandra, gracias por tu colaboración en las horas de quirófano.

A Angélica, Dali, Ale, Dani, Andrea y Dani Chacón, por todo el amor a distancia y por escuchar mis cuentos salmantinos.

A Irene, por sus dibujos y frases célebres que alegran la vida.

A María Valle y a María José Álvarez, por ser mi familia española. Gracias por tanto amor y por ayudarme a desconectar.

A Vicente, por ser ejemplo de trabajo y de perseverancia. Gracias por ser mi mejor compañero y amigo y por animarme en los momentos más difíciles. Gracias también por toda tu ayuda con los Western Blots.

"Almost everyday you fall
Upon my waking eyes
Inviting and inciting me
To rise".

Finalmente, quiero agradecer a mis padres y a mis hermanos que son para mí el mayor ejemplo de esfuerzo, entereza y lucha. Gracias por apoyarme y comprenderme en todas mis decisiones. Gracias por su amor infinito, que siempre me ha ayudado a tolerar la distancia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	15
GRUPOS EXPERIMENTALES	17
PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. LESIONES MECÁNICAS DEL OÍDO	20
VALIDACIÓN DEL MODELO ANIMAL	20
Registro de las respuestas auditivas evocadas del tronco del encéfalo (ABRs)	20
Cuantificación de las neuronas del ganglio espiral (NGE)	21
POTENCIALES EVOCADOS VISUALES CORTICALES (VEPs)	23
Procedimiento quirúrgico para la implantación de los electrodos	23
Registros de los VEPs en la corteza visual	23
TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR	24
Procedimiento de extracción selectiva y guiada del tejido	24
Aislamiento del RNA	28
Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa - cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	29
INMUNOCITOQUÍMICA	32
Fijación y seccionamiento	32
Análisis de la inmunorreacción	34
I. Inmunotinción para Arc/Arg3.1	36
II. Inmunotinción para c-Fos	36
-Mapeo de partículas por gradientes de intensidad	36
-Análisis cuantitativo de las partículas c-Fos inmunopositivas	37
III. Inmunotinción para GluA2/3 y GAD67	38
IV. Inmunotinción para parvalbúmina	38
WESTERN BLOT	39
Extracción de proteínas del tejido	39
Preparación de las muestras para la electroforesis	39
Electroforesis	39
Electrotransferencia	40
Visualización de las proteínas y preincubación de las membranas	40
Inmunodetección	40

RESULTADOS	43
VALIDACIÓN DEL MODELO ANIMAL	45
Respuestas auditivas evocadas del tronco del encéfalo (ABRs)	45
Neuronas del ganglio espiral (NGE)	47
POTENCIALES EVOCADOS VISUALES (VEPs)	49
EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS CORTEZAS AUDITIVA Y VISUAL	51
INMUNOCITOQUÍMICA	54
c-Fos	54
Arc/Arg3.1	65
Subunidades GluA2/3 del receptor AMPA de glutamato	71
GAD67	75
Parvalbúmina	79
RECEPTORES GABA: SUBUNIDADES GABAA- α 1 Y GABAB-R2	83
DISCUSIÓN	85
MODELO EXPERIMENTAL	87
CAMBIOS DEPENDIENTES DE ACTIVIDAD	89
c-Fos	89
Arc/Arg3.1	91
Actividad eléctrica evocada en la corteza visual	93
MARCADORES DE EXCITACIÓN E INHIBICIÓN. REORGANIZACIÓN INTERMODAL	94
Subunidades GluA2/3 de los receptores AMPA	94
GAD65, GAD67 y receptores de GABA	96
Parvalbúmina	99
CONCLUSIONES	101
HIPÓTESIS DE TRABAJO	105
BIBLIOGRAFÍA	109
APÉNDICE	121

ABREVIATURAS

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

CA: corteza auditiva

CA1: corteza auditiva primaria

CAD: corteza auditiva dorsal

CAV: corteza auditiva ventral

CV: corteza visual

CV1: corteza visual primaria

CSS: corteza somatosensorial

CSS1: corteza somatosensorial primaria

DO: densidad óptica

DPOAE: emisiones otoacústicas productos de distorsión (*Distortion product otoacoustic emissions*)

MGBd: cuerpo geniculado medial dorsal (*dorsal division of the medial geniculate body*)

MGBv: cuerpo geniculado medial ventral (*ventral division of the medial geniculate body*)

NCV: núcleo coclear ventral

NGE: neuronas del ganglio espiral

PtPD: corteza parietal postero-dorsal

PtPR: corteza parietal postero-rostral

PV: parvalbúmina

TRN: núcleo reticular talámico (*thalamic reticular nucleus*)

VEPs: potenciales visuales evocados (*visual evoked potentials*)

V2L: corteza visual secundaria lateral

V2ML: corteza visual secundaria medio lateral

V2MM: corteza visual secundaria medio medial

V2M: corteza visual secundaria medial (incluye V2MM y V2ML)

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes modelos animales de sordera, siendo los más habituales los modelos genéticos (ver una revisión de Friedman y cols., 2007), los de administración de drogas ototóxicas (antibióticos aminoglucósidos, diuréticos, ácido acetilsalicílico o carboplatina), o aquellos que aplican estimulación con sonidos de alta intensidad (trauma acústico). Estos modelos alteran principalmente el sistema de transducción coclear (células ciliadas); produciéndose una escasa o moderada alteración de las neuronas del ganglio espiral (NGE) (ver una revisión de Gold y Bajo, 2014).

En este trabajo partimos de la hipótesis de que la comprobación de la sordera en los modelos convencionales mediante pruebas funcionales como el potencial de acción compuesto (*CAP*), las emisiones otoacústicas productos de distorsión (*DPOAE*) o las respuestas auditivas evocadas del tronco del encéfalo (auditory brainstem responses - *ABRs*) no permiten asegurar la desaferenciación total de la vía mientras se mantenga la descarga espontánea del nervio coclear. Para ello generamos un modelo de lesión mecánica que induce la degeneración walleriana del nervio auditivo para asegurar la pérdida de la respuesta espontánea de los aferentes primarios en los núcleos cocleares. Esta idea surge de los trabajos realizados por Martínez-Galán y cols. (2007), en los que se observó que 11 días después de realizar lesiones mecánicas bilaterales en las cócleas de la rata adulta, no se producen cambios en la síntesis de las subunidades de los receptores AMPA de glutamato en el núcleo coclear ventral (NCV), lo que sugiere que, a corto plazo, el silenciamiento eléctrico de la cóclea no produce por sí solo una reacción plástica efectiva en los núcleos cocleares. Por ello, el primer objetivo de este trabajo es validar un modelo de sordera en ratas adultas que implique la degeneración del nervio auditivo, evaluando el estado de las NGE en dos tiempos post lesión (15 y 90 días). Para este fin y para explorar la reacción intermodal en la corteza cerebral, en esta tesis proponemos un modelo de sordera basado en la extracción de los huesecillos del oído medio y la ruptura mecánica de la lámina de los contornos con una aguja por vía trans - timpánica.

Es necesario el procesamiento multimodal tras la mezcla de información procedente de los distintos sistemas sensoriales para que el cerebro de los mamíferos pueda crear la escena sensorial y analizarla en tiempo real. Este procesamiento de las señales sensoriales requiere una interacción estructural y funcional en la corteza cerebral. La integración de la información de las señales sensoriales ocurre tanto en las cortezas de asociación "*higher order*" como en las cortezas sensoriales primarias (Henschke y cols., 2014). Diversos estudios realizados mediante el empleo de trazadores en roedores demostraron que existen conexiones cortico-corticales directas desde la corteza auditiva primaria (CA1) y somatosensorial primaria (CSS1) hacia la corteza visual primaria (CV1) (Campi y cols., 2010; Ibrahim y cols., 2016; Massé y cols., 2017). En jerbos, se ha descrito que las neuronas de la CV1 proyectan hacia la CSS1 y, en menor proporción, hacia la CA1, mientras que las neuronas de la CSS1 proyectan principalmente hacia la CV1 (Henschke y cols., 2014). Particularmente, en la rata se han descrito conexiones recíprocas entre las cortezas auditiva y visual primarias (Paperna y Malach, 1991). Estos estudios demuestran las bases anatómicas sobre las que se sustenta la integración de la información sensorial y, además, aportan evidencias de la asimetría de las conexiones entre las cortezas primarias sensoriales. También ha sido descrito en jerbos que las neuronas del tálamo auditivo, somatosensorial y visual no solo proyectan hacia las cortezas primarias de su misma modalidad sensorial, sino que divergen hacia otras cortezas primarias sensoriales, lo que propone una ruta adicional de integración subcortical de la información (Henschke y cols., 2014).

Las conexiones anatómicas sugieren una interacción funcional entre las distintas modalidades sensoriales. Se ha demostrado mediante registros unitarios que las neuronas de la corteza visual (CV) del gato presentan respuestas a estímulos sonoros (Murata y cols., 1965) y, también, que las neuronas de la corteza auditiva (CA) del ratón se activan con estímulos visuales (Morril y Hasenstaub, 2018). Se ha visto en ratones que la estimulación mecánica de las vibrisas o la estimulación auditiva producen hiperpolarización en las neuronas de la CV1 (Iurilli y cols., 2012).

Específicamente, Iurilli y cols. (2012) demostraron con experimentos *in vivo* hechos en ratones que la activación de la CA1 empleando sonido o estimulación optogenética, produce la hiperpolarización de las neuronas piramidales de la CV1. Este efecto supresor de la CA sobre la visual se eliminó realizando una incisión para separar ambas cortezas y también tras el bloqueo de la neurotransmisión GABAérgica con el uso de gabazina, lo que sugiere un efecto inhibitorio de la CA sobre la CV (Iurilli y cols., 2012).

Cuando se pierde o se altera un sentido, la interacción entre los diferentes sistemas sensoriales produce una reacción adaptativa que permite mantener el procesamiento de las modalidades no afectadas, generando una reorganización anatómica y funcional del cerebro que se conoce como plasticidad intermodal. En un modelo de sordera a largo plazo en hurones, se observó mediante registros unitarios que las neuronas de la CA responden a estímulos somatosensoriales, en contraste con los animales controles donde las neuronas de la CA solo responden a estímulos auditivos. Se demuestra así un fenómeno de cambio de modalidad sensorial de las respuestas de las neuronas corticales tras la pérdida de un sentido (Allman y cols., 2009). Se ha demostrado mediante experimentos de iontoforesis que los campos receptivos sensoriales son el resultado de la regulación de la neurotransmisión GABAérgica en las redes neuronales (Firzlaff y Schuller, 2001; Tremere y cols., 2001). De este modo, la presencia de respuestas a estímulos somatosensoriales en la CA demostrada por Allman y cols. (2009) en la sordera a largo plazo debe reflejar una reorganización de la conectividad cortical en la que subyace una alteración en el balance de excitación e inhibición de sus redes neuronales. En este trabajo planteamos la hipótesis de que la alteración tálamo-cortical auditiva inducida por la sordera a largo plazo origina una reacción intermodal compensatoria de la alteración del balance de excitación e inhibición para mantener el procesamiento en la CV. Esta hipótesis se apoya en la presencia de un aumento en la actividad eléctrica de la CV y una alteración de los marcadores de excitación e inhibición en la sordera profunda crónica. La actividad eléctrica de la CV en

modelos de sordera congénita (Neville y cols., 1983; Hauthal y cols., 2013) y adquirida (Campbell y Sharma, 2014) en humanos ha sido previamente estudiada mediante potenciales evocados visuales (VEPs). En ambos análisis se demostró que las respuestas evocadas visuales de la CV presentaban una mayor amplitud y una disminución en la latencia de las respuestas en comparación con lo observado en los humanos normoyentes. Estos resultados aportan evidencias acerca de una posible sobreactivación de la CV en modelos de sordera profunda a largo plazo en adultos.

El análisis anatómico de genes de expresión temprana dependientes de actividad como c-Fos y Arc/Arg3.1 permiten analizar indirectamente el grado de activación de las redes neuronales en las diferentes subdivisiones citoarquitecturales de la corteza cerebral en condiciones normales y en modelos de privación sensorial. c-Fos es un gen de expresión temprana cuya inducción es dependiente de actividad neuronal (Morgan y Curran, 1988; Sagar y cols., 1988). El gen c-Fos codifica para la proteína Fos la cual forma dímeros con los factores de transcripción de la familia Jun, formando el factor de transcripción AP-1 (Chiu y cols., 1988). c-Fos ha sido ampliamente utilizado como un marcador de activación neuronal, debido a que se ha demostrado que puede ser inducido por una amplia variedad de estímulos como factores de crecimiento, despolarización neuronal y estimulación sináptica (Bartel y cols., 1989; Sheng y cols., 1990; Curran y Morgan, 1995; Joo y cols., 2015). No obstante, c-Fos ha sido asociado con procesos de apoptosis (Chen y cols., 2015) y de lesión neuronal (Bullit y cols., 1990). En un modelo de sordera en ratones se realizó un estudio anatómico empleando el marcador de actividad c-Fos encontrándose un incremento de las neuronas c-Fos positivas en la CV tras estímulos visuales, a la vez que un incremento de la respuesta evocada de esta corteza (Teichert y Bolz., 2017). El gen de expresión temprana c-Fos ha sido frecuentemente utilizado en nuestro laboratorio para evaluar cambios dependientes de actividad en el colículo inferior después de ablaciones corticales restringidas (Clarkson y cols., 2010). Arc/Arg3.1 es también un gen de expresión temprana

dependiente de actividad que codifica para una proteína asociada al citoesqueleto (Lyford y cols., 1995). Arc/Arg3.1 ha sido ampliamente utilizado, al igual que c-Fos, como un marcador de actividad neuronal (Chowdhury y cols., 2006; Shepherd y cols., 2006; Wall y Correa, 2017). También se ha demostrado que Arc/Arg3.1 interactúa con las proteínas endofilina y dinamina, formando un complejo involucrado en la endocitosis de los receptores AMPA de glutamato (Chowdhury y cols., 2006). Se ha descrito en cultivos de neuronas hipocámpales que el incremento de la expresión de Arc/Arg3.1 produce una disminución de la subunidad GluA1 en la membrana (Shepherd y cols., 2006). En estudios realizados en cultivos organotípicos de rodajas de hipocampo se ha demostrado que la sobreexpresión de Arc/Arg3.1 induce la endocitosis de las subunidades GluA2/3 y la reducción de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) de los receptores AMPA (Rial-Verde y cols., 2006). De este modo, el análisis inmunocitoquímico de los genes de expresión temprana dependientes de actividad c-Fos y Arc/Arg3.1 permitiría obtener evidencias indirectas acerca de los cambios que se producen en la activación neuronal de las subdivisiones de las cortezas sensoriales a lo largo del tiempo en nuestro modelo de privación auditiva.

En conclusión, existen evidencias que permiten considerar que tras la sordera profunda a largo plazo se produce una sobreactivación de la CV (Neville y cols., 1983; Hauthal y cols., 2013; Campbell y Sharma, 2014). Por ello, el segundo objetivo de esta tesis es explorar la actividad eléctrica evocada de la CV mediante el análisis de registros de VEPs y los cambios citoarquitecturales que lo soportan, utilizando el análisis de genes de expresión temprana dependientes de actividad (c-Fos y Arc/Arg3.1) en un modelo de sordera a largo plazo en ratas adultas.

La estabilización homeostática dependiente de actividad de las redes neuronales se genera por la regulación del disparo de las neuronas, su plasticidad sináptica y por el balance de excitación-inhibición (Turrigiano y cols., 1998; Nelson y Turrigiano, 2008; Perez-Otaño y Ehlers, 2005). En este sentido, la alteración del equilibrio entre la excitación y la inhibición a nivel neuronal puede inducir la síntesis o tráfico de

receptores postsinápticos (*synaptic scaling*) lo cual produce un reajuste de la fuerza sináptica (*synaptic strenght*) (Turrigiano, 2012). Se ha demostrado que la privación visual en el ratón, inducida por lesiones en la retina (Keck y cols., 2013), produce un incremento en la amplitud de las *EPSCs* de la CV. Un efecto similar fue observado en la CA de ratones tras la privación auditiva (Teichert y cols., 2017), sugiriendo estos análisis que la privación unisensorial puede inducir cambios en la excitabilidad de las neuronas de la corteza desafiada. Es bien conocido que la excitabilidad y la permeabilidad al calcio de las neuronas corticales dependen de la composición oligomérica de los receptores AMPA (ver una revisión de Tanaka y cols., 2000; Song y Huganir, 2002). Las subunidades de los receptores AMPA (GluA1 a GluA4) pueden formar homómeros o heterómeros, cuya permeabilidad al calcio aumenta cuando carecen de la subunidad GluA2 (Hollman y cols., 1991; Burnashev y cols., 1992). Se ha demostrado en ratas criadas en oscuridad y mediante registros realizados en la CV, el incremento de la amplitud de las *EPSCs*, acompañado de alteraciones en la composición de los receptores AMPA (Goel y cols., 2006). También se ha demostrado en ratones privados de luz el incremento de la expresión génica de las subunidades GluA2 y GluA3 de los receptores AMPA en la CV, mediante el uso de *microarrays* de ADN y RT-qPCR (Tropea y cols., 2006). De forma similar, en mapaches desafiados por la amputación de los dedos, se observó por inmunoblot el incremento de la subunidad GluA2 en la CSS (He y cols., 2004). Estos estudios aportan evidencias electrofisiológicas, moleculares y anatómicas acerca de los cambios en la excitabilidad neuronal inducidos por la privación unisensorial que deben estar relacionados con cambios en la síntesis, tráfico y composición de los receptores AMPA. Por lo tanto, el tercer objetivo de este trabajo es explorar en las CAs y CVs los receptores AMPA mediante el análisis de la expresión génica (RT-qPCR) de la subunidad GluA2 y el producto de la síntesis (inmunocitoquímica cuantitativa) de las subunidades GluA2/3 en la sordera a largo plazo.

Ha sido demostrado que la privación somatosensorial en ratones adultos mediante la remoción de sus vibrisas produce un descenso a corto plazo y un incremento a largo plazo de la inmunorreactividad para GAD en la CSS (Welker y cols., 1989). Particularmente, en un modelo de privación auditiva por ablación coclear bilateral en jerbos se observó un incremento de la inmunorreactividad para GAD en la CA (Sarro y cols., 2008). Estos estudios aportan evidencias acerca de un efecto de la privación sensorial sobre la enzima que participa en la síntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA en la corteza sensorial desafereciada. También se ha demostrado que la privación somatosensorial en mapaches (He y cols., 2004) o la sordera en jerbos (Sarro y cols., 2008) produce alteraciones en los niveles de los receptores GABAA en la corteza desafereciada. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el cuarto objetivo que se plantea en esta tesis, es realizar un análisis comparativo entre las cortezas auditiva y visual de marcadores relacionados con la neurotransmisión inhibitoria (GAD 65 y 67, y las subunidades de los receptores GABA - *Gabra1* y *Gabbr2*) en nuestro modelo de sordera a largo plazo.

Estudios realizados en hamsters mediante inmunocitoquímica, demostraron que en la ceguera por enucleación bilateral se produce cambios en el número y en la distribución de las interneuronas positivas para las proteínas ligadoras de calcio parvalbúmina (PV), calretinina y calbindina (Desgent y cols., 2010). De todas las neuronas GABAérgicas de la corteza cerebral, las interneuronas PV inmunopositivas representan aproximadamente el 40 % (Celio, 1986; ver una revisión de Rudy y cols., 2011). Las interneuronas inmunorreactivas para la PV han sido ampliamente descritas y caracterizadas por su morfología, sus propiedades de membrana y por sus disparos rápidos de potenciales de acción; además ha sido descrito que se encuentran regulando los microcircuitos inhibitorios de la columnas corticales (Kawaguchi y Kubota, 1997; Otsuka y Kawaguchi, 2009). Debido a sus característicos potenciales de acción estas interneuronas GABAérgicas se conocen como neuronas de disparo rápido (*fast-spiking FS-neurons*) y han sido consideradas como las centinelas que se encuentran regulando las respuestas eléctricas de las

neuronas piramidales (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y Kubota, 1997). Por lo tanto, el quinto y último objetivo del presente trabajo es analizar la expresión génica de la PV y los cambios en la inmunorreactividad y en el número de estas interneuronas, tanto en la CA como en la CV en nuestro modelo de sordera a largo plazo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La alteración de la actividad tálamo-cortical auditiva inducida por una sordera profunda y mantenida a largo plazo, origina una reorganización intermodal reactiva que conduce a una alteración del balance de excitación e inhibición de la corteza auditiva, este efecto genera una disminución en la inhibición intermodal y una sobreactivación de la corteza visual.

OBJETIVOS

Objetivo general: Evaluar el estado funcional de las cortezas sensoriales y analizar los cambios moleculares que subyacen en los mecanismos de inhibición y excitación intermodal en un modelo de sordera a largo plazo en la rata.

Objetivos específicos en nuestro modelo experimental:

1. Validar un modelo de sordera en la rata que produzca la degeneración del nervio auditivo y analizar la evolución temporal de la pérdida de las neuronas del ganglio espiral, para correlacionar estos cambios con los efectos de la reorganización intermodal a largo plazo.
2. Explorar la actividad eléctrica evocada de la corteza visual mediante el análisis de registros de potenciales evocados visuales (VEPs) y analizar y comparar en las cortezas auditiva y visual los cambios de la expresión génica y de la síntesis de proteína de marcadores relacionados con la activación neuronal (c-Fos y Arc/Arg3.1).
3. Explorar en las cortezas auditiva y visual los cambios de la expresión génica de la subunidad GluA2 (RT-qPCR) y de la síntesis de proteína (inmunocitoquímica cuantitativa) de las subunidades GluA2/3 de los receptores AMPA.

4. Realizar un análisis comparativo entre las cortezas auditiva y visual de la expresión génica y de la síntesis de proteína de marcadores relacionados con la neurotransmisión inhibitoria (GAD65, GAD67 y subunidades de los receptores GABA - *Gabra1* y *Gabbr2*).

5. Analizar y comparar en las cortezas auditiva y visual los cambios de la expresión génica de la parvalbúmina y los cambios en la inmunorreactividad y en el número de las interneuronas parvalbúmina positivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPOS EXPERIMENTALES

En este trabajo se utilizaron 66 ratas Wistar macho de tres meses de edad, con un peso de 250 - 300 g. Los experimentos se realizaron cumpliendo con la normativa y recomendaciones de 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 llevaron a cabo bajo anestesia profunda para evitar el sufrimiento de los animales.

Grupo experimental 1. Registros de potenciales evocados corticales visuales (VEPs)

En este grupo experimental se realizaron registros en animales control (n=3), y en animales sometidos a punción coclear bilateral a los 15 días post lesión (dpl) (n=2) y a los 90 dpl (n=6).

Grupo experimental 2. RT-qPCR - Análisis de la expresión génica

En este grupo se evaluaron posibles cambios comparando los valores en la expresión génica entre las cortezas auditiva y visual de animales controles (n=6) y sordos tras 90 dpl (n=6). Se exploraron genes relacionados con actividad neuronal y plasticidad (*c-Fos* y *Arc/Arg3.1*), neurotransmisión excitatoria (gen de la subunidad del receptor de glutamato *GluA2*) y neurotransmisión inhibitoria (genes relacionados con la síntesis de GABA - *Gad65* y *Gad67* y sus receptores postsinápticos *Gabra1* y *Gabb-r2*) así como el gen que codifica para la proteína ligadora de calcio *parvalbúmina*.

Grupo experimental 3. Estudio inmunocitoquímico. (Dividido en subgrupos A, B y C según los marcadores utilizados)

Grupo experimental 3A. Marcadores relacionados con la actividad neuronal (c-Fos y Arc/Arg3.1). El análisis de la inmunocitoquímica se realizó cuantitativamente en animales controles (n=5), en animales sordos a los 15 dpl (n=4) y a los 90 dpl (n=4). El análisis de la inmunocitoquímica para Arc/Arg3.1 se realizó cualitativamente en animales controles (n=7) y en animales sordos a los 15 dpl (n=4) y a los 90 dpl (n=3).

Grupo experimental 3B. Inmunotinciones para marcadores relacionados con la neurotransmisión excitatoria (subunidades GluA2/3 del receptor AMPA de glutamato). Animales controles (n=4) y animales sordos a los 90 dpl (n=4).

Grupo experimental 3C. Marcadores relacionados con inhibición. Proteína intermediaria relacionada con la síntesis de GABA (GAD67) y proteína ligadora de calcio PV, que marca indirectamente interneuronas GABA. Las inmunotinciones se realizaron en animales controles (n=3) y en animales sordos a los 90 dpl (n=5).

Los grupos experimentales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Grupos experimentales (n = 66)

Grupo	Control (n)	Lesión bilateral coclear (n)	Supervivencia (días post lesión - dpl)	Metodología	Método de análisis
1	3	8	15 y 90	Potenciales evocados visuales	Análisis de amplitud y latencia de la onda N1. t de student
2	6	6	90	RT-qPCR	Análisis del <i>fold change</i> . t de student
3A	12	15	15 y 90	Inmunocitoquímica para c-Fos y Arc/Arg3.1. Cuantificación de las NGE	c-Fos: densitometría (cuantificación de neuronas) y mapas MatLab. ANOVA; post hoc: Fisher Arc/Arg3.1: imágenes pseudocolor (análisis cualitativo) Cuantificación NGE: ANOVA
3B	4	4	90	Inmunocitoquímica para GluA2/3	Densitometría (medición de la densidad óptica) ANOVA; post hoc: Fisher y Bonferroni
3C	3	5	90	Inmunocitoquímica para GAD67 y parvalbúmina	GAD67: Densitometría (medición de la densidad óptica) Parvalbúmina: Densitometría (cuantificación de neuronas PV inmunopositivas) ANOVA; post hoc: Fisher y Bonferroni

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. LESIONES MECÁNICAS DEL OÍDO

Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con una mezcla de clorhidrato de Ketamina (30 mg/kg) y clorhidrato de Xilacina (5 mg/kg), se colocaron sobre una manta térmica para mantener una temperatura corporal constante y los ojos se protegieron utilizando una gota de gel oftálmico. Empleando una lupa quirúrgica, los huesecillos del oído medio se extrajeron, y empleando una aguja estéril (20 G) se practicó un agujero inciso con fractura de pared lateral de la cóclea (lámina de los contornos). Los animales se mantuvieron en la manta térmica hasta estar despiertos y fueron trasladados a sus jaulas, permitiendo el acceso libre a agua y comida. Para minimizar el dolor se les inyectó Buprenorfina por vía subcutánea en el lomo (0,05 mg/kg) inmediatamente después de la lesión, 1 hora después y cada 8 horas durante las siguientes 72 horas siguientes a la cirugía. Durante todo el tiempo de supervivencia, se monitorizó periódicamente el proceso de recuperación de los animales y su estabulación, siguiendo la normativa del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca y de la Unión Europea.

VALIDACIÓN DEL MODELO ANIMAL

Registro de las respuestas auditivas evocadas del tronco del encéfalo (ABRs)

Los ABRs se realizaron tanto en los animales controles como en los animales sordos de todos los grupos experimentales, antes y después de la cirugía y el día de la eutanasia con el fin de evaluar las respuestas eléctricas del nervio y el tronco del encéfalo tras las lesiones cocleares bilaterales.

Para realizar los ABRs, los animales del grupo 1 fueron anestesiados utilizando Sevoflurano al 5%, que es la misma anestesia utilizada para los registros de los VEPs. Los animales de los grupos 2 y 3 fueron anestesiados por vía intramuscular

con la misma mezcla de clorhidrato de Ketamina (30 mg/kg) y clorhidrato de Xilacina (5 mg/kg) empleada para las lesiones cocleares (vi).

El registro de los ABRs se llevó a cabo empleando un equipo específico para el procesamiento de la señal en tiempo real (Tucker- Davis Technologies [TDT], System RZ- 6, Alachua, FL, EEUU). Se colocaron subcutáneamente electrodos de registro activo, referencia y tierra, en el vertex, en la mastoides ipsilateral y en la mastoides contralateral al oído estimulado respectivamente, siguiendo el protocolo habitual del laboratorio (Lamas y cols., 2013).

La estimulación sonora se realizó colocando un tubo de vinilo (10 cm de longitud x 2 mm de diámetro interno) dentro del conducto auditivo acoplado a un altavoz (TDT – MF1 Multi-Field Magnetic Speaker) colocando el animal anestesiado en un caja insonorizada. El estímulo sonoro consistió en un click de 5 mseg de duración, de polaridad alternante de 0,1 mseg, a una velocidad de repetición de 11 veces por segundo, presentado gradualmente en pasos ascendentes de diez decibelios (dB), desde una intensidad de 10 dB SPL (sound pressure level) hasta una de 90 dB SPL.

Los ABRs fueron amplificados y digitalizados usando el preamplificador Medusa RA16PA y el amplificador RA4LI (TDT, Alachua, FL, EEUU). La señal final fue filtrada con un filtro de paso alto 500 Hz y uno de paso bajo de 3000 Hz.

Cauntificación de las neuronas del ganglio espiral (NGE)

Los animales destinados para el análisis inmunocitoquímico fueron fijados por perfusión transcardiaca (ver más adelante el protocolo detallado para la perfusión) y sus cerebros y cócleas fueron extraídos según se explica en el apartado correspondiente (vi).

Las cócleas se extrajeron y se descalcificaron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 5,5% en paraformaldehído al 1% durante 15 días a 4 °C. A continuación, se realizó la crioprotección de las cócleas durante 48 horas con sacarosa al 30 % en tampón fosfato 0,1 M. Posteriormente, las cócleas fueron embebidas en una

mezcla de gelatina al 10% + sacarosa al 15% y congeladas a -70 °C en 2-propanol. Se realizaron cortes seriados para-modiolares de 30 µm de espesor usando un criostato Leica y las secciones se tiñeron con tionina al 1% durante 20 minutos. El exceso de tionina se eliminó con etanol al 10% y al 90%, y la diferenciación de la tinción se realizó con una mezcla de etanol al 96% + ácido acético. Finalmente, las secciones se deshidrataron con alcohol absoluto y se aclararon con xilol.

Con el fin de evaluar la pérdida de las NGE, se fotografiaron 1 de cada 3 secciones seriadas de las cócleas teñidas con el método de Nissl (vi) empleando un objetivo de 5X (Leica, Plan Apo, 0.12 N.A.). Para fotografiar cada cóclea en su totalidad, se realizaron mosaicos utilizando un microscopio Leica DMRB y el módulo "Virtual slice" del programa Neurolucida 8.0 (MBF-Bioscience, Williston, Vermont, EEUU). De los mosaicos realizados se seleccionó digitalmente el área del canal de Rosenthal ocupada por las NGE en cada sección y, posteriormente, las NGE se segmentaron por gradiente de intensidad de grises mediante el uso del Software para el análisis de imágenes NIH Image J 1.48v (EEUU; RRID: SCR_003070). Empleando el análisis de parámetros del Software Image J, se midieron el área total ocupada por las NGE, así como el tamaño promedio y el número de neuronas en cada microfotografía. El número total de las NGE se estimó mediante la suma del número de neuronas obtenido para cada una de las secciones fotografiadas, y el valor final de esta suma se multiplicó por tres. El número total de NGE estimado en animales de control coincide con la cuantificación previa realizada en ratas Wistar por Rueda y cols. (1987) y Juiz y cols. (1989) (ver tabla 5). Los datos se analizaron estadísticamente empleando un análisis de varianza de una vía.

POTENCIALES EVOCADOS VISUALES CORTICALES (VEPs)

Procedimiento quirúrgico para la implantación de los electrodos

Los animales del grupo 1 se colocaron en una cámara para la inducción de la anestesia, aplicando sevoflurano al 5%. Una vez que los reflejos de la pata trasera y de la córnea desaparecieron, los animales fueron colocados en un aparato estereotáctico para la implantación quirúrgica de los electrodos de registro (tornillos inoxidables de 1,2 mm de diámetro y 4 mm de longitud). Se fijó la cabeza del animal y se estableció el punto de referencia interaural (IA). La zona quirúrgica de la cabeza se desinfectó con Betadine y se expuso la superficie del cráneo realizando una incisión en la piel sobre la línea media. Posteriormente, usando un micromanipulador, se localizaron sobre el hueso las coordenadas estereotácticas; unas para el electrodo activo (colocado en la CV; AP: -7,5 y ML: 3,5) y otras en el hemisferio contralateral para el electrodo de referencia (AP: -5,5; ML: 3,5) (según el atlas de Paxinos y Watson, 2005). Utilizando un taladro manual, se realizaron dos pequeñas marcas superficiales en el cráneo en las coordenadas de colocación de los electrodos. A continuación, se atornillaron los electrodos a través del hueso sin tocar la corteza y se fijaron permanentemente con cemento acrílico dental.

Registros de los VEPs en la corteza visual

Los registros de los electroencefalogramas se iniciaron una semana después de la implantación de los tornillos. Se hicieron registros de EEG en animales controles, en animales de 15 dpl (n=2) y en animales de 90 dpl (n=6). Con el fin de mantener una actividad de onda constante, los animales se anestesiaron con 1,5-2% de sevoflurano.

Los registros de los VEPs se realizaron colocando los animales en una jaula oscura, en la cual se dejaron adaptar a la oscuridad durante 5 minutos. La estimulación visual consistió en flashes de 0,5 Hz, y los VEPs se obtuvieron promediando las respuestas a la presentación de 150 estímulos.

Para el registro de la señal se utilizó un amplificador diferencial amplifier (Model 1700 A-M System, LLC, Calsborg, WA, EEUU). La señal registrada se amplificó (x1000), se filtró (1 Hz - 500 Hz), se digitalizó a 20 KHz mediante una tarjeta convertidora de la señal (1401 CED A/D, Cambridge Electronic Design, UK) y se almacenó usando el software Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, UK) en un ordenador que permitía ver la señal en tiempo real y su posterior análisis.

Para realizar el análisis y la comparación de los VEPs entre los animales controles y los animales sordos (a distintos tiempos post lesión), se evaluaron la amplitud y la latencia de la onda N1. La latencia de la onda N1 se definió como el tiempo en segundos (seg) desde el inicio del estímulo hasta el pico positivo de la onda. La amplitud de la onda N1 se midió como la suma del valor en milivoltios (mV) del pico negativo anterior al pico de N1 y el valor (mV) del pico positivo N1.

Finalmente, para identificar diferencias significativas en la amplitud de la onda N1 (mV) y las latencias (seg) entre los animales controles y los animales sordos, se realizó una prueba t de Student para ambos parámetros. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $p < 0,05$.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR

Procedimiento de extracción selectiva y guiada del tejido

Para extraer las cortezas auditiva y visual por separado, imprimimos una máscara en 3 dimensiones. Para diseñar la máscara 3D utilizamos las imágenes digitales de secciones seriadas coronales del atlas de Paxinos y Watson (2005) seleccionando las líneas de las siluetas y los puntos de demarcación de las cortezas a comparar desde el IA 0,12 hasta el IA 12,24. Con estas referencias las secciones se alinearon generando un modelo 3D para imprimir una máscara con orificios localizados en las coordenadas de las cortezas auditiva y visual. Sobre estas pilas de imágenes, se realizó un archivo digital utilizando el programa Design X® y posteriormente, la

máscara se imprimió utilizando una impresora 3D (3D System 3510SD) y un material biocompatible (Visijet M3 Crystal) (SICNOVA SA) (Figs. 1A y B).

Los animales del grupo 2 se anestesiaron intraperitonealmente con Pentobarbital sódico al 6% (60 mg/kg), se decapitaron y se extrajeron los cerebros rápidamente. La extracción del cerebro se hizo en aproximadamente 5 minutos.

La máscara 3D se colocó cuidadosamente sobre el cerebro y se encajó sobre la referencia caudal de un punto fijo marcado por la inserción de una aguja estéril colocada en el IA 0,00 (Fig. 1C). La máscara y el cerebro fueron congelados en nitrógeno líquido y empleando los agujeros de la máscara como guía y un bisturí de cirugía oftalmológica, se diseccionaron los bordes de la cortezas auditiva y visual (Fig. 1D). Posteriormente, utilizando una paleta de metal, se extrajo cuidadosamente el tejido correspondiente a la CA y a la CV (Fig. 1D) e inmediatamente, las muestras se introdujeron en tubos eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras extraídas se conservaron a -80 °C.

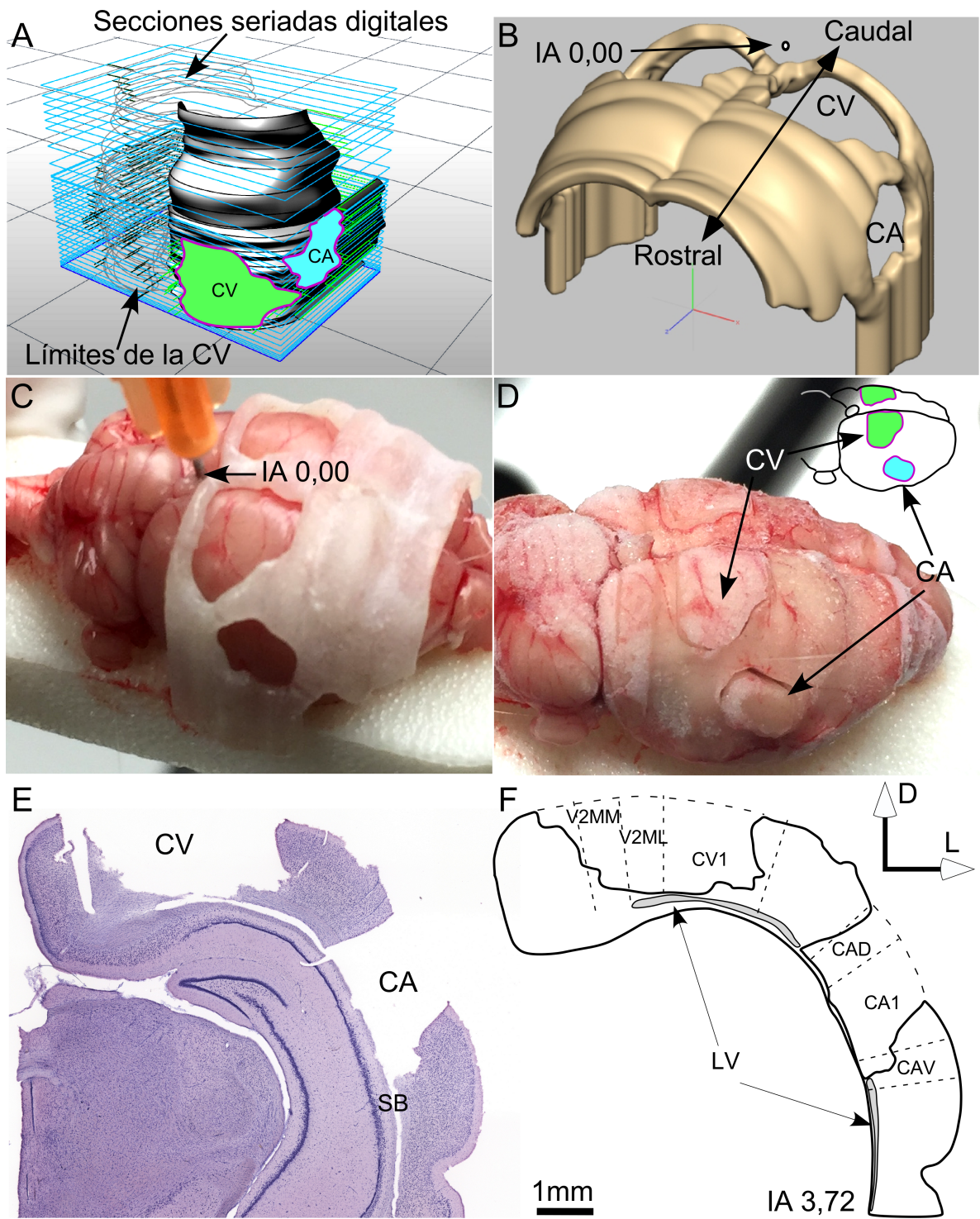
Los cerebros extraídos de los animales destinados para el análisis de la expresión génica por RT-qPCR, después de la extracción de las cortezas auditiva y visual, se sumergieron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,6 y se crioprotegieron por inmersión en sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,6 a 4 °C durante 48 horas para la realización de secciones coronales seriadas como se explica más adelante (ver el apartado de Inmunocitoquímica).

Las secciones seriadas se colocaron de manera ordenada y en sentido rostro-caudal en portaobjetos y se tiñeron con violeta de cresilo al 1% (C-1791; Sigma-Aldrich) durante 10 minutos (tinción de Nissl). La diferenciación de la tinción de los cortes se realizó con una mezcla de alcohol al 96% más ácido acético. Las muestras se deshidrataron en un gradiente creciente de alcoholes y se aclararon con xilol.

Para asegurarnos de la precisión de la extracción de las cortezas auditiva y visual, las secciones seriadas y teñidas con violeta de cresilo se realizaron mosaicos (10X)

de toda la corteza de ambos hemisferios utilizando un microscopio Leica DMRB y el módulo "Virtual slice" del NeuroLucida 8.0 (MBF-Bioscience, Williston, Vermont, EEUU) (Fig. 1E). Las microfotografías se superpusieron con los planos coronales correspondientes del atlas Paxinos y Watson (2005) para determinar los límites dorso-ventral y rostro-caudal del tejido de las cortezas auditiva y visual extraídas (Fig. 1F). Todas las áreas correspondientes al tejido extraído (ver Fig. 1E como ejemplo de los agujeros en las secciones coronales teñidas con Nissl) se encontraban dentro de las coordenadas rostro-caudales y de los límites citoarquitecturales de ambas cortezas.

Figura 1. Procedimiento para la extracción guiada del tejido correspondiente a las cortezas auditiva (CA) y visual (CV). (A) Digitalización de las secciones coronales seriadas obtenidas del atlas de Paxinos y Watson (2005). Nótese los agujeros y los límites correspondientes a las CA (en azul) y CV (en verde). (B) Resultado digital de la máscara 3D con los agujeros delimitados para las CA y CV. (C) Procedimiento de la extracción del tejido. Colocación de la máscara 3D sobre el cerebro posicionado en la referencia caudal de un punto fijo marcado por la inserción de una aguja estéril colocada en el IA 0,00 (ver flecha en C). (D) La máscara y el cerebro se congelaron y los bordes de la CA y CV se demarcaron con un bisturí previo a la extracción del tejido que posteriormente fue congelado y utilizado para la RT-qPCR. (E) Verificación de la extracción del tejido. Microfotografía representativa de una sección coronal del cerebro de rata teñida con Nissl después de la extracción del tejido (IA 3,72). (F) Ejemplo de la superposición de la silueta de la sección coronal (E) con la sección digitalizada correspondiente al IA 3,72 tomada del atlas de Paxinos y Watson. Nótese la coincidencia de los agujeros resultantes de la extracción del tejido con las zonas correspondientes a las CA y CV. CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2MM: corteza visual secundaria medio medial, V2ML: corteza visual secundaria medio lateral, SB: sustancia blanca.



Aislamiento del RNA

La purificación del ácido ribonucleico (RNA) total de las cortezas extraídas se llevó a cabo utilizando el kit RNAqueous-micro kit® (ThermoFisher Scientific) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Brevemente, las cortezas extraídas se incubaron con una solución de lisado (Lysis solution) y se homogeneizaron utilizando un Brinkman Polytron y al lisado resultante se le añadió etanol al 100%. La mezcla del lisado más el etanol se pasó a tubos con filtros de sílice especiales para purificar el RNA mediante la centrifugación a 13200 rpm. Posteriormente, el RNA se limpió con dos soluciones (Wash solution 1 y Wash solution 2/3) de lavado y se centrifugó a 12000 rpm. Finalmente, se utilizaron 30 µl de una solución (Elution solution) precalentada a 75°C para eluir el RNA de los filtros, para lo cual se centrifugó nuevamente a 12000 rpm y se obtuvo el RNA de cada muestra concentrado y purificado en tubos autoclavados libres de RNAsas.

La concentración y la calidad del RNA purificado se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (Nano Drop Technologies Inc., Wilmington, EEUU). Cada muestra se evaluó tres veces para calcular un promedio del valor de la concentración. La calidad del RNA también se evaluó en un RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) usando un Agilent 2100 Bioanalyzer para comprobar la integridad de las bandas de RNA ribosómico 18S y 28S, así como el número de integridad (RIN), en el cual, un valor RIN de 0 correspondería a un RNA totalmente degradado y un valor RIN de 10 a un RNA íntegro. Todas las muestras utilizadas para el análisis por RT-qPCR tuvieron un valor RIN de al menos 8.0, por lo tanto, cumplían con uno de los requisitos necesarios para un experimento de RT-qPCR óptimo (Fleige y cols., 2006).

Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa - cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para realizar la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) a partir del RNA purificado, se utilizó el kit ImProm-II (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total y 1 µl de Oligo-dT se desnaturalizó a 70 °C durante 5 min, y luego se dejó enfriar a 4 °C durante 10 min. A continuación, se añadió una mezcla que contenía 4 µl de 5x Buffer, 1 µl de enzima transcriptasa reversa ImProm-II™, 2,4 µl de MgCl₂ 1 mM, 1 µl de una mezcla de dNTP (desoxinucleótidos trifosfato) 0,5 mM, 0,5 µl del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNasin® complementario y agua MilliQ libre de RNasas hasta un volumen final de 20 µl. La reacción de la transcripción reversa a cDNA se realizó en tres pasos: 5 min a 25 °C para el anillamiento del oligo-dT con el RNA molde, 60 minutos a 42 °C para la síntesis del cDNA con la retrotranscriptasa, y 15 min a 70°C para la desnaturalización de los heteroduplex de RNA-cDNA que se pudiesen formar. En todas las retrotranscripciones se incluyeron los correspondientes controles negativos que consistieron en una reacción sin RNA molde y otra sin la retrotranscriptasa.

La RT-qPCR se realizó usando el método de SYBR-Green con un 2xMáster mix (Applied Biosystems). Cada reacción contenía 10 µl de Master Mix, 0,8 µl de cada pareja de cebadores (primers forward y reverse) a una concentración 10 mM (tabla 2), 3 µl de cada muestra de cDNA a la concentración adecuada para cada gen estudiado y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 20 µl. La reacción de amplificación se realizó en el equipo QuantStudio 7 Flex Real-Time RT-qPCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95 °C y 30 seg a 60 °C, pudiendo variar ligeramente este último paso dependiendo de cada pareja de cebadores. En cada placa de reacción se realizaron triplicados para cada muestra y cada experimento se llevó a cabo dos veces. Como control negativo se utilizó la mezcla de MasterMix con la pareja de cebadores más agua Milli-Q sin la muestra de RNA. Cada control negativo

también se realizó por triplicado. Todos los cebadores utilizados se diseñaron para tener temperaturas de fusión similares y para dar amplicones de tamaños similares.

Para decidir cuál era el gen endógeno (*housekeeping*) más estable para la normalización de los datos de RT-qPCR, se seleccionaron tres candidatos; β -actina (*Actb*), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) y la proteína ribosomal L19 (*Rpl19*). La expresión de estos tres genes endógenos se evaluó por RT-qPCR en las muestras de CA y de CV, y se obtuvo que la expresión intra e intergrupo más estable fue la del gen *Rpl19*, mientras que *Gapdh* y *Actb* fueron los menos estables.

Para la representación de los resultados de forma cuantitativa, se utilizó el método comparativo del ciclo umbral (Ct) (Schmittgen y Livak 2008). Tras la eliminación de los valores atípicos (Burns y cols., 2005), los datos en bruto de fluorescencia se utilizaron para determinar la eficiencia (E) de la amplificación de la RT-qPCR utilizando la fórmula $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] * 100$. Todas las amplificaciones tuvieron un valor E de $100 \pm 10\%$, donde un valor E cercano al 100% es un indicador de una amplificación eficiente. El valor de expresión génica relativa (*fold change*) para cada transcrito se calculó de acuerdo a la ecuación $2^{-(\Delta C_t \text{ "condition 1"} - \Delta C_t \text{ "condition 2"})}$, donde la "condición 1" corresponde a las muestras experimentales y (animales sordos de 90 dpl), la "condición 2" a las muestras de los animales controles, y el ΔC_t de cada "condición" es igual a $C_t \text{ "gen experimental"} - C_t \text{ "gen endógeno"}$ (Livak y Schmittgen 2001; Schmittgen y Livak 2008). Se calculó la desviación estándar y el error estándar para cada valor de expresión génica relativa como medida de la variación de los datos. Para identificar diferencias significativas se realizó una prueba t de una y dos colas para los resultados obtenidos con la RT-qPCR para cada gen, considerando como significativo un valor de *fold change* > 1 (para un valor de $p < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron usando el software SPSS_IBM software, version 25.0.0.0 (IBM Crp. y SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU, RRID: SCR_002865).

Tabla 2. Cebadores de RT-qPCR usados para el análisis de la expresión génica.

Gen diana	Número GenBank (a)	Cebador Forward	cDNA Forward (a)	Cebador Reverse	cDNA Reverse (a)	Tamaño producto	E (b)
<i>c-Fos</i>	NM_022197.2	ACGGAGA ATCCGAA GGGAAA	569-588	TGTCTC CGCTT GGAGC GTAT	640-659	91	91,2
<i>Arc/Arg 3.1</i>	NM_019361.1	AGGCAGC AGCTGGA GTCTTC	2102-2121	GGGTG GTACC CCTTCC AGAC	2176-2195	94	97,7
<i>GluA2</i>	NM_017261	CGGCAGC TCAGCTAA AAACT	173-192	TTGTAG CTGGT GGCTG TTGA	243-262	90	96,3
<i>Gad65</i>	NM_012563.1	GATCGGA ACAGACA GCGTGA	953-972	GTGGC ACTCAC CAGGA AAGG	1059-1078	126	95,7
<i>Gad67</i>	NM_017007.1	CGTTTGAT CCGATCC AGGAG	1235-1254	GAGTTT GTGGC GATGCT TCC	1331-1350	116	98,6
<i>Gabra1</i>	NM_183326.2	TCAGCAA AATCGAC CGACTG	1468-1487	GTGGG GGCTTT TAGCTG AGG	1560-1579	112	98,5
<i>Gabbr2</i>	NM_012957.2	GCCTCCA GCATCCA GTATCG	1192-1211	GTCGG GGATG GTGATT TTCA	1307-1326	135	91,3
<i>Parvalbúmina</i>	NM12725.1	TGGGCCA CCTTGTTT AGTCT	739-758	GACTCA GCCCC TTCCGT TC	831-850	112	98,5
<i>Rpl19</i>	NM_031103	TCGCCAA TGCCAAC TCTCGTC	123-143	AGCCC GGGAA TGGAC AGTCAC	191-211	89	96,5

^a Localización del cebador en las secuencias para la rata del GenBank

^b Eficiencia (E) de los cebadores de RT-qPCR primer efficiency (E) calculada con la ecuación: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$.

INMUNOCITOQUÍMICA

Fijación y seccionamiento

Los animales del grupo 3 se anestesiaron intraperitonealmente con Pentobarbital sódico al 6% (60 mg/kg). A continuación, se realizó la apertura de la caja torácica y se llevó a cabo la perfusión transcardiaca de 125 ml de una solución de lavado (tampón salino con pH 6.9) seguido de la perfusión de 750 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,6. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se sumergieron en la misma solución fijadora durante 2 horas y posteriormente, para su crioprotección, en una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,6 a 4 °C durante 48 horas.

Para definir un plano de corte similar en todos los casos, los cerebros fueron tallados en un molde coronal con ranuras de 1 mm (69026-Coronal RBM, Electron Microscope Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, EEUU) y se introdujeron dos agujas en el hemisferio derecho de cada cerebro (una atravesando la corteza cerebral y otra atravesando el tronco del encéfalo), para el posterior reconocimiento de la lateralidad. Se realizaron secciones seriadas de 40 µm de grosor, utilizando un microtomo de congelación (HM 430 Sliding, MICROM International, Walldorf, Alemania) y los cortes se recogieron secuencialmente en 10 pocillos que contenían una solución de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,6.

Las secciones flotantes de animales controles y lesionados fueron procesadas simultáneamente, con la finalidad de eliminar las posibles diferencias de tinción, a los efectos de la posterior medición de los niveles de grises. Las secciones seriadas se lavaron con tampón fosfato 0,1 M pH 7,6 y a continuación, se inhibió la peroxidasa endógena incubando durante 10 minutos con una mezcla de metanol al 10% más H₂O₂ al 3% en tampón fosfato 0,1 M. Posteriormente, las secciones se lavaron con tampón fosfato y, a continuación, tres veces (15 minutos cada vez) con tampón - Tris 0,05 M pH 8 más Tritón X-100 al 0,5% (T9284 Sigma, St. Louis, MO, EEUU; TBS-Tx) (TBS-Tx), en agitación continua. Con el fin de eliminar un posible

marcaje inespecífico, las secciones se incubaron con suero fetal bovino al 10%. Posteriormente, las secciones se incubaron a 4 °C durante 48 horas con el correspondiente anticuerpo primario (las características de cada anticuerpo se encuentran en la tabla 3). Las secciones se lavaron nuevamente con TBS-Tx 0,05 M pH 8 (15 minutos cada vez) y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado anti conejo (biotinylated anti-rabbit IgG H1L, BA-1000; Vector, Burlingame, CA, EEUU) y con un anticuerpo biotinilado anti ratón (biotinylated anti-mouse IgG H1L, BA-2000; Vector, Burlingame, CA, EEUU), dependiendo del anticuerpo primario, con una dilución de 1:200 en TBS-Tx durante 120 minutos a temperatura ambiente y en agitación continua. Se repitieron los lavados de las secciones con TBS-Tx y se incubaron con el complejo avidina/biotina peroxidasa (ABC, Vectastain Standard kit PK-4000; Vector, Burlingame, CA, EEUU) durante 180 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción de la peroxidasa se visualizó incubando las secciones en DAB con H₂O₂ al 0,006% y sulfato de níquel y amonio al 0,4%. Como control negativo y para comprobar la especificidad de la inmunotinción, se incubó una sección de cada caso sin anticuerpo primario. Los cortes teñidos de cada caso se colocaron en portaobjetos de manera ordenada y en sentido rostro-caudal.

Tabla 3. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados para la inmunocitoquímica.

Antígeno	Inmunógeno	Descripción	Dilución empleada
c-Fos	Péptido sintético (SGFNADYEASSSRC) correspondiente a los aminoácidos 4-17 de la proteína c-Fos de humano	Policlonal obtenido en conejo, Calbiochem Ab-5	1:7500 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0,3%
Arc/Arg3.1	Proteína de fusión ARC de ratón (Strep-Tag® de longitud completa)	Policlonal obtenido en conejo, Synaptic Systems 156003	1:1000 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0,3%
Subunidades GluA2/3 del receptor AMPA	Péptido del terminal carboxilo de GluA2/3 de rata conjugado a BSA con glutaraldehído (EGYNVYGIESVKI)	Policlonal obtenido en conejo, Merck Millipore #AB1506; RRID:AB_90710	1:100 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0,3%
GAD67	Proteína GAD67 recombinante	Monoclonal obtenido en ratón, Merck Millipore #MAB5406 clone 1G10.2 RRID:AB_2278725	1:1000 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0,3%
Parvalbúmina	Parvalbúmina del músculo de la rata	Policlonal obtenido en conejo, Swant #PV-25; RRID:AB_10000344	1:5000 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0,3%

Análisis de la inmunorreacción

Las secciones coronales inmunoteñidas para los distintos grupos experimentales (3A, 3B y 3C) se fotografiaron utilizando un microscopio Leica DMRB, el módulo "Virtual slice" del Neurolucida 8.0 y un objetivo de 10X (Leica Plan Apo). Antes de realizar la captura de las imágenes, la iluminación del microscopio se ajustó a un valor prefijado utilizando un filtro de gradiente de densidad (®Eo Edmund industrial optics - ref 32599, Karlsruhe, Germany). Se capturaron imágenes de los 10 valores de gris, para la calibración posterior (Image J®) de los valores de densidad óptica

(DO). Aunque la inmunocitoquímica para las secciones de los animales controles y de los sordos se realizó en paralelo, para descartar errores en el análisis debidos a diferencias de tinción, la media y la desviación estándar de los niveles de DO se analizaron en toda la extensión de la cortezas fotografiadas. De este modo, aquellos casos cuyos niveles de media de gris (promediando todas las secciones seleccionadas) que se encontraban por encima o por debajo del nivel de gris promedio total \pm la desviación estándar, fueron eliminados del análisis. Todos los análisis cuantitativos de las microfotografías se realizaron utilizando el programa Image J 2.0 (EEUU; RRID:SCR_003070).

Los límites citoarquitecturales de las CA y CV en cada una de las microfotografías realizadas, se definieron realizando la observación del patrón para la inmunotinción correspondiente y la superposición con las secciones coronales del atlas de Paxinos y Watson (2005). Además, en cada uno de los niveles rostro-caudales evaluados, se pudieron establecer los límites entre las capas de la corteza siguiendo las pautas de Palomero-Gallagher y Zilles en Paxinos (2004).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM® SPSS®, version 25.0.0.0 (IBM Crp. and SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU, RRID: SCR_002865).

Para el análisis de la inmunorreacción de los genes de expresión temprana (c-Fos y Arc/Arg3.1 - grupo experimental 3A) se realizaron microfotografías de las cortezas correspondientes a 5 secciones coronales de cada caso (IA: 2,76; 3,12; 3,48; 3,84; 4,20 mm - Paxinos y Watson, 2005). En las secciones en las que las diferencias de tinción no permitieron distinguir con claridad los cambios citoarquitecturales de las subdivisiones de las cortezas auditiva y visual, los mosaicos obtenidos se superpusieron con los planos coronales correspondientes del atlas Paxinos y Watson (2005).

La resolución digital final de las imágenes obtenidas, utilizando un objetivo plan apocromático X10, fue de 19,6 píxeles/ μm^2 . Este cálculo se realizó contando el número de píxeles dentro de un cuadrado estándar realizado sobre la fotografía.

I. Inmunotinción para Arc/Arg3.1

El marcaje para Arc/Arg3.1 se observó en los somas y en las dendritas de las neuronas piramidales, lo que impidió la segmentación por densidad de grises de los somas neuronales y en consecuencia el conteo de neuronas. Por esta razón, la inmunotinción para Arc/Arg3.1 fue analizada solo cualitativamente por tres evaluadores independientes con experiencia en la observación microscópica. Sin embargo, para una mejor definición en la visualización por el ojo humano, las imágenes 8bits capturadas en escala de grises se transformaron en valores de color (pseudocolor) utilizando el programa ImageJ, donde las diferencias en la intensidad de la inmunorreacción queda representada en un gradiente de colores a lo largo de la sección.

II. Inmunotinción para c-Fos

- Mapeo de partículas por gradientes de intensidad

Las secciones coronales inmunoteñidas para c-Fos mostraron núcleos celulares bien definidos sobre un fondo claro, lo que permitió separarlos por densidad de grises y cuantificar su número aplicando el algoritmo de segmentación de umbral "maximum entropy" del programa Image J (Gull y Skilling, 1984; Bardera y Sbert, 2009). Tras la segmentación de las partículas inmunopositivas se obtuvieron los valores de media de grises y sus coordenadas respecto a la silueta del corte. Estos parámetros se utilizaron para realizar representaciones gráficas de la inmunoreactividad para c-Fos en la corteza de cada sección estudiada. Las representaciones gráficas se realizaron para cada sección fotografiada con el software MatLab (The MathWorks, Inc, Natick, MA, EEUU, RRID: SCR_001622), siguiendo el procedimiento ampliamente utilizado en nuestro laboratorio y

previamente publicado por Clarkson y cols. (2010). De esta manera, las neuronas c-Fos inmunopositivas segmentadas fueron representadas gráficamente como puntos de colores de diferentes tamaños y de localización precisa. En las imágenes (ver ejemplo en Fig. 8) la diferencia en el tamaño de los puntos representa los diferentes perímetros de las partículas y los diferentes colores corresponden a la intensidad de la inmunotinción, donde rojo y amarillo corresponden a valores mayores de intensidad. Esta representación gráfica permitió evaluar fácilmente los cambios en la inmunotinción para c-Fos y la distribución de las partículas a lo largo de las subdivisiones de la corteza y de las capas en las secciones coronales realizadas.

- Análisis cuantitativo de las partículas c-Fos inmunopositivas

La inmunotinción para c-Fos, su representación gráfica y la superposición con las secciones coronales del atlas de Paxinos y Watson (2005), permitieron definir los límites citoarquitecturales de las cortezas auditiva y visual, así como los límites entre las capas de la corteza en cada uno de los niveles rostro-caudales evaluados.

Utilizando la segmentación de umbral "maximum entropy" del Image J, se cuantificaron las partículas c-Fos inmunopositivas para las cortezas auditiva y visual, donde cada una contenía sus correspondientes áreas secundarias y primarias. De esta manera, el número de neuronas c-Fos en $500 \mu\text{m}^2$ se promedió para cada una de las cortezas (auditiva y visual) por separado y estos valores se compararon entre los animales controles y los animales sordos de 15 y 90 dpl. Además, se midió la media de grises de las neuronas c-Fos inmunopositivas segmentadas, con el fin de evaluar la intensidad de la inmunotinción.

Las diferencias entre grupos se evaluaron realizando un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido de la prueba Fisher's Least Significant Difference (LSD) para la comparación post hoc. Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM), y las diferencias y resultados de correlación se consideraron estadísticamente significativos con un valor $p < 0,05$.

III. Inmunotinción para GluA2/3 y GAD67

Se realizaron microfotografías de las cortezas inmunoteñidas para GluA2/3, GAD67 y PV correspondiente a seis secciones coronales de cada caso (IA: 0,96; 2,16; 3,00; 4,20; 4,44; 4,80 - Paxinos y Watson 2005).

En la inmunocitoquímica realizada para GluA2/3 y GAD67, donde se observó una alta intensidad de la inmunotinción tanto en los somas como en el neuropilo, no se pudieron segmentar las neuronas. Por lo tanto, la segmentación de toda la inmunorreactividad para cada una de las áreas estudiadas se analizó mediante la medición de los valores de DO.

Las microfotografías realizadas de las secciones inmunoteñidas para GluA2/3 y GAD67, se analizaron realizando la segmentación de la inmunorreactividad utilizando el algoritmo de segmentación de umbral "default" (Image J), lo que permitió medir el valor promedio de la DO para cada una de las cortezas (primarias y secundarias) auditiva y visual, por separado.

IV. Inmunotinción para parvalbúmina

En la inmunotinción realizada para PV se observó una buena definición del contorno de la neuronas inmunopositivas, así como un alto contraste entre la señal de fondo y la señal de la inmunorreacción lo que permitió una segmentación adecuada de las neuronas. La segmentación de las neuronas inmunopositivas para la PV se realizó utilizando el algoritmo "maximum entropy" (Gull y Skilling, 1984; Bardera y cols. 2009) y se cuantificaron las neuronas segmentadas en $10.000 \mu\text{m}^2$, por separado para cada una de las cortezas analizadas.

Los valores obtenidos a partir de los análisis realizados (DO para el análisis de GluA2/3 y GAD67 y número de neuronas/ $10.000 \mu\text{m}^2$ para el análisis de PV) para las secciones de cada caso, se promediaron, por separado, para cada una de las cortezas sensoriales evaluadas: corteza auditiva primaria (CA1), corteza auditiva dorsal secundaria (CAD), corteza auditiva ventral secundaria (CAV), corteza visual

primaria (CV1), corteza visual lateral (V2L) y corteza visual medial (V2M, que contenía las corteza visuales medio-medial y medio lateral). Las diferencias entre grupos se evaluaron utilizando un análisis ANOVA, seguido del test Fisher's Least Significant Difference (LSD) para la comparación post hoc y del test de Bonferroni. Todos los datos se expresaron como media \pm SEM, y las diferencias y resultados de correlación se consideraron estadísticamente significativos con un valor $p < 0,05$.

WESTERN BLOT

Extracción de proteínas del tejido

Para la extracción del tejido se empleó el mismo método utilizado en la extracción guiada de la CA y la CV para las RT-qPCR. El tejido fue recogido y disgregado mecánicamente en tampón de lisis RIPA [150 mM cloruro sódico, 1% de Tritón X-100 v/v, 0,5% de deoxicolato sódico (p/v), 0,1% de dodecil sulfato sódico - SDS, 50 mM de Tris pH 8 con inhibidores de proteasas 1:1000 (v/v) (Sigma-Aldrich™)] y se mantuvo en agitación durante 2 h a 4 °C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 20 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se congelaron a -20 °C hasta su uso en la electroforesis.

Preparación de las muestras para la electroforesis

Las proteínas extraídas se prepararon para la electroforesis añadiendo tampón de carga *Laemmli* pH 6,8 con 2% SDS (v/v), 5% β -mercaptoetanol (v/v), 10% glicerol (v/v), 0,002% azul de bromofenol (p/v) y 62,5 mM Tris-HCL).

Electroforesis

La electroforesis de las proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (AMRESCO®) compuestos por un gel de separación (12% de poliacrilamida) y un gel de concentración (4% de poliacrilamida) que se dispone en el último paso de la preparación de los geles, sobre el gel de separación.

Las soluciones de las proteínas en tampón de carga se calentaron a 70 °C durante 10 min para producir su desnaturalización, y se mantuvieron en frío hasta ser cargadas en el gel. Después, las proteínas se cargaron en el gel junto con un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad Laboratories). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en una cubeta mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories) con tampón de migración (25 mM de Tris-Base, 190 mM e glicina (p/v) y SDS al 1% (p/v), pH 8,3 en agua), a un voltaje constante (120 V) y durante el tiempo considerado conveniente para separar las proteínas de interés.

Electrotransferencia

Las proteínas separadas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF Immobilon™ (Millipore®) activada previamente con metanol. La transferencia fue de tipo "húmedo", empleando como tampón de transferencia una solución con la siguiente composición: Tris 25 mM y glicina 0,19 M (pH 8,6), con SDS al 0,1% (p/v) y metanol al 10% (v/v). Para la electrotransferencia se aplicó un voltaje de 70 V durante 3 horas a 4 °C.

Visualización de las proteínas y preincubación de las membranas

La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante tinción con Rojo Ponceau al 10% (v/v). A continuación, la membrana se lavó con TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM y pH 7,5, Tween 20PS (Panreac) al 0,1% (v/v)), hasta la completa desaparición de la tinción del colorante. Posteriormente, la membrana se preincubó durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación en una solución de tampón Tris-Base Salino (TBS) con tween-20 como detergente al 0,1% (v/v) (TBST) y BSA al 2% (BST-BSA).

Inmunodetección

Para detectar las proteínas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario contra la proteína de interés durante toda la noche a 4 °C en agitación. Los

anticuerpos primarios utilizados (tabla 4) se prepararon en una solución de TBST-BSA 2%. El anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH (1:5000; Cat. ab8245 Abcam, Netherlands) se utilizó como control de carga, para cuantificar y normalizar la expresión proteica.

A continuación, las membranas se lavaron tres veces durante 10 min a temperatura ambiente con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón (HRP-rec-Protein G, 101223, Thermo Fisher Scientific, EEUU) o de conejo (HRP-Protein A, 10-1023, Thermo Fisher Scientific, EEUU) conjugado con peroxidasa (HRP), durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una concentración de 1:7500 preparados en TTBS y 5% de leche desnatada en polvo.

Tras lavar con TBST se realizó el revelado de las membranas, para lo que se utilizó el kit de quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad Laboratories) que junto con la peroxidasa de rábano (HRP) del anticuerpo produce una señal. Esta señal se expuso a una película radiográfica Super RX (Fujifilm) con el kit RP X-OMAT EX II (Kodak), y posteriormente las películas se lavaron con agua y se fijaron con el kit RP X-OMAT LO (Kodak).

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente, Luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 1 minuto, en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada por exposición a una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana en condiciones de exposición subsaturante.

Tabla 4. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados para el *Western blot*

Antígeno	Inmunógeno	Descripción	Dilución empleada
GAPDH	GAPDH del músculo del conejo	Monoclonal obtenido en ratón, ab8245 Abcam	1:5000 TBST-BSA 2%
GABAA- α 1	Péptidos sintéticos (QPSQDELKDNTTV FT-C) correspondiente a los aminoácidos del 1-15 de la subunidad α del receptor GABAA de rata	Policlonal obtenido en conejo, Millipore 06-868	1:10000 TBST-BSA 2%
GABAB-R2	Péptido sintético correspondiente al receptor GABABR2 de humano	Policlonal obtenido en conejo, Abcam ab52248	1:500 TBST-BSA 2%

RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL MODELO ANIMAL

Con el modelo de sordera empleado en este trabajo se buscaba producir una sordera total y permanente, así como la muerte de las NGE con el fin de eliminar su actividad. Para evaluar la efectividad de las lesiones mecánicas bilaterales de las cócleas, se realizaron registros de las respuestas auditivas evocadas en los animales lesionados y se analizó el número de NGE.

Respuestas auditivas evocadas del tronco del encéfalo (ABRs)

Los ABRs realizados en los animales controles y antes de la cirugía mostraron que tanto la forma de los registros como los umbrales, las amplitudes y las latencias de las ondas fueron similares a los ABRs estudiados y previamente publicados por Lamas y cols. (2013).

Los ABRs realizados en los animales sordos inmediatamente después de la cirugía, a los 15 y a los 90 dpl no mostraron ninguna respuesta auditiva evocada a ninguna de las intensidades del sonido utilizadas para la estimulación (clicks de 10 a 90 dB). De esta manera, se pudo verificar la ausencia total de respuesta sensorial auditiva en nuestro modelo de sordera (Fig. 2).

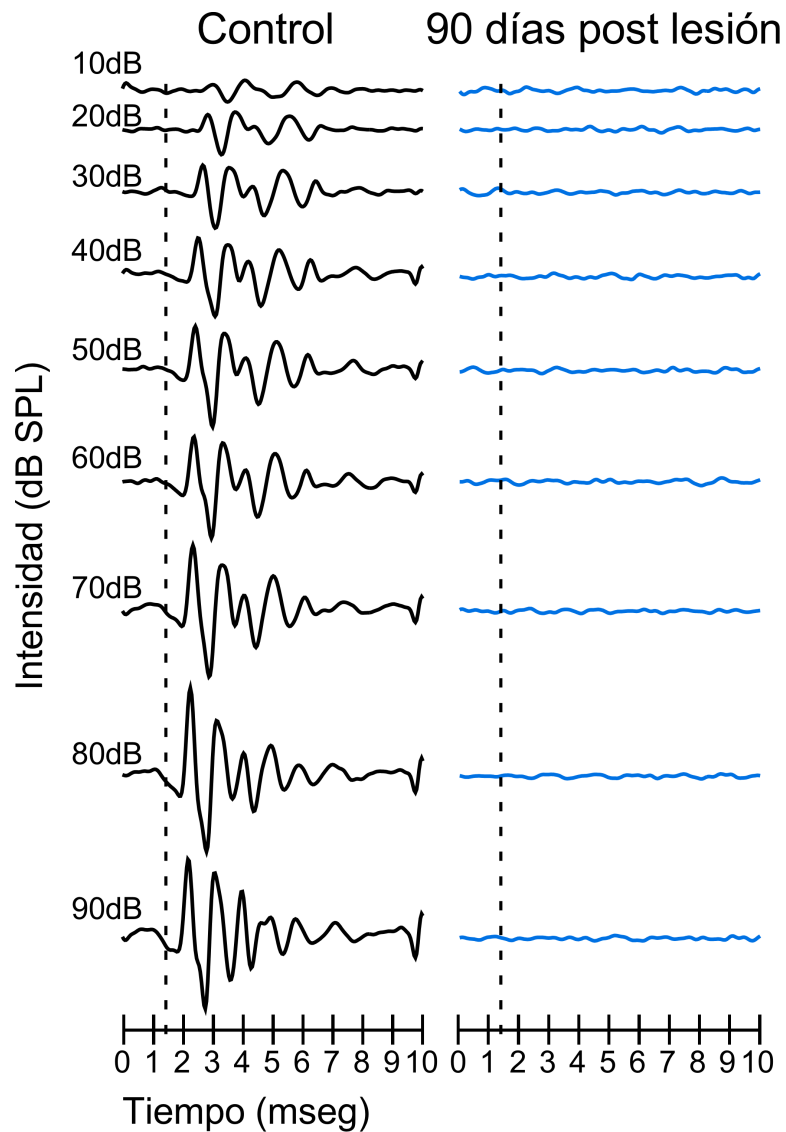


Figura 2. Ejemplo de un registro de respuestas auditivas evocadas en el tronco del encéfalo (auditory brainstem responses – ABR) hecho en un animal antes de la lesión mecánica coclear (izquierda) y 90 días post lesión (90 dpl – líneas azules). Nótese la ausencia de respuestas evocadas a los 90 dpl desde 10 dB SPL hasta 90 dB SPL.

Neuronas del ganglio espiral (NGE)

La cuantificación de las NGE en secciones seriadas de las cócleas de animales controles y de animales sordos a los 15 y 90 dpl (grupo experimental 3A), permitió evaluar la evolución a lo largo del tiempo del porcentaje de pérdida de las neuronas, así como el tamaño promedio del soma en cada grupo de animales.

Se encontró que a los 15 dpl el porcentaje de pérdida de las NGE en nuestro modelo de sordera es, en promedio, del 17,5%, sin ningún cambio significativo en el tamaño promedio de los somas (Fig. 3, tabla 5). A los 90 dpl, el porcentaje promedio de pérdida es del 72,8%. Con respecto al área promedio de los somas neuronales, se encontró que a los 90 dpl disminuye un 25,1% con respecto al tamaño promedio de los somas neuronales de los animales controles (Fig. 3 - tabla 5). Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante los ABRs así como la evaluación de la degeneración de las NGE reflejan una pérdida permanente de la audición en nuestro modelo de sordera.

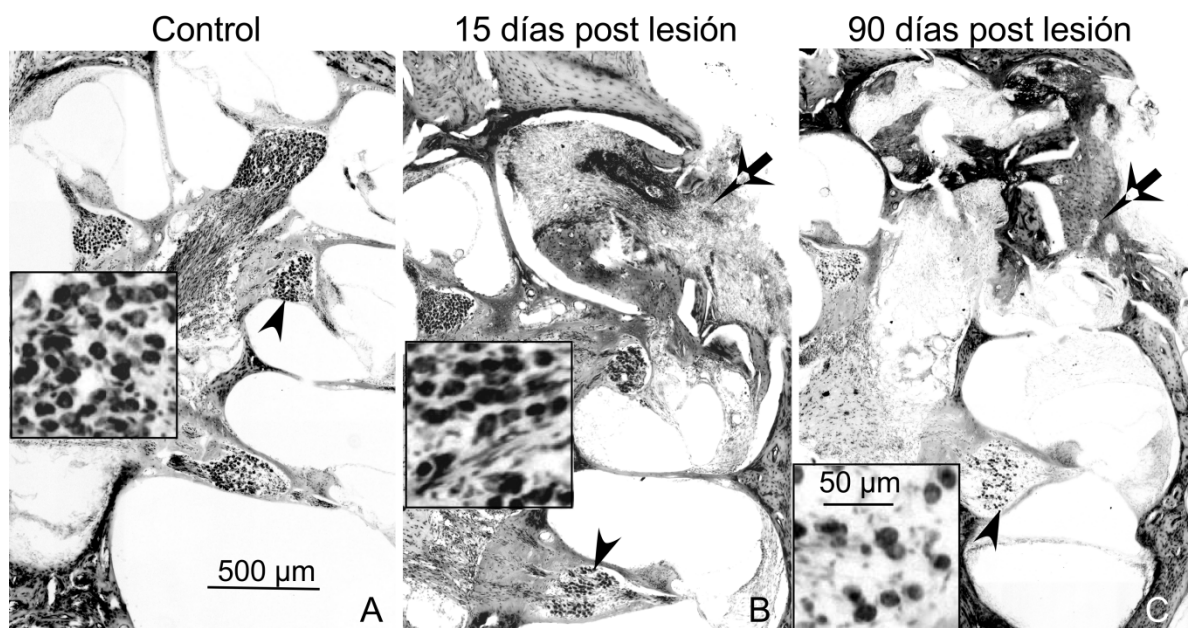


Figura 3. Microfotografías representativas de secciones cocleares de rata en el plano mediodorsal teñidas con Nissl. (A) Control. (B) 15 días post lesión (dpl). (C) 90 dpl. Los detalles a mayor aumento para cada uno de los casos muestran las neuronas del ganglio espiral (NGE) y las cabezas de flecha señalan de donde fueron fotografiados los detalles. Nótese la pérdida de las NGE a lo largo del tiempo. Las flechas señalan las zonas de la lesión hechas por la punción coclear.

Tabla 5. Cuantificación del número y medición del tamaño de las neuronas del ganglio espiral (NGE) de las cócleas de animales controles y de animales sordos a los 15 y 90 días post lesión (dpl). (ANOVA de una vía).

Grupo experimental	Media del número de NGE	Desviación estándar	Media del tamaño de las NGE (μm^2)	Desviación estándar
Control	18272	2950,2	139	19,2
15 dpl	15071	2860,3	132	25,9
90 dpl	4958 **	1423,8	104 *	1,7

**p<0,001

*p<0,01

POTENCIALES EVOCADOS VISUALES (VEPs)

Los registros de los VEPs (grupo experimental 1) realizados en la CV de los animales controles y de los sordos (a los 15 y 90 dpl) permitieron distinguir un componente primario (P1-N1) y uno secundario (P2-N2-P3) (Fig. 4A), tal y como lo describieron Creel y cols. (1974). En la figura 4A se muestra un ejemplo de un VEPs de un animal control, de un animal sordo a los 15 dpl y de otro a los 90 dpl. Se pudo observar que la amplitud de la onda N1 en el animal sordo a los 90 días incrementa con respecto al animal control y al de los 15 dpl.

Las comparaciones estadísticas entre las medias de las amplitudes de la onda N1 y de las medias de las latencias entre los animales controles y los animales sordos a los 15 dpl no mostraron ninguna diferencia significativa. Sin embargo, la comparación entre los controles y los animales sordos a los 90 dpl mostró un incremento significativo de la onda N1 de un 156,39% (amplitud promedio de N1 en los controles \pm EE = $0,0024 \pm 0,000022$ mV versus la amplitud promedio de N1 en los sordos \pm EE = $0,0062 \pm 0,0004$ mV) (Fig. 4B). No se observaron diferencias significativas en la comparación de las latencias entre los controles y los animales sordos a largo plazo (90 dpl) (Fig. 4C).

Potenciales evocados visuales de la corteza visual

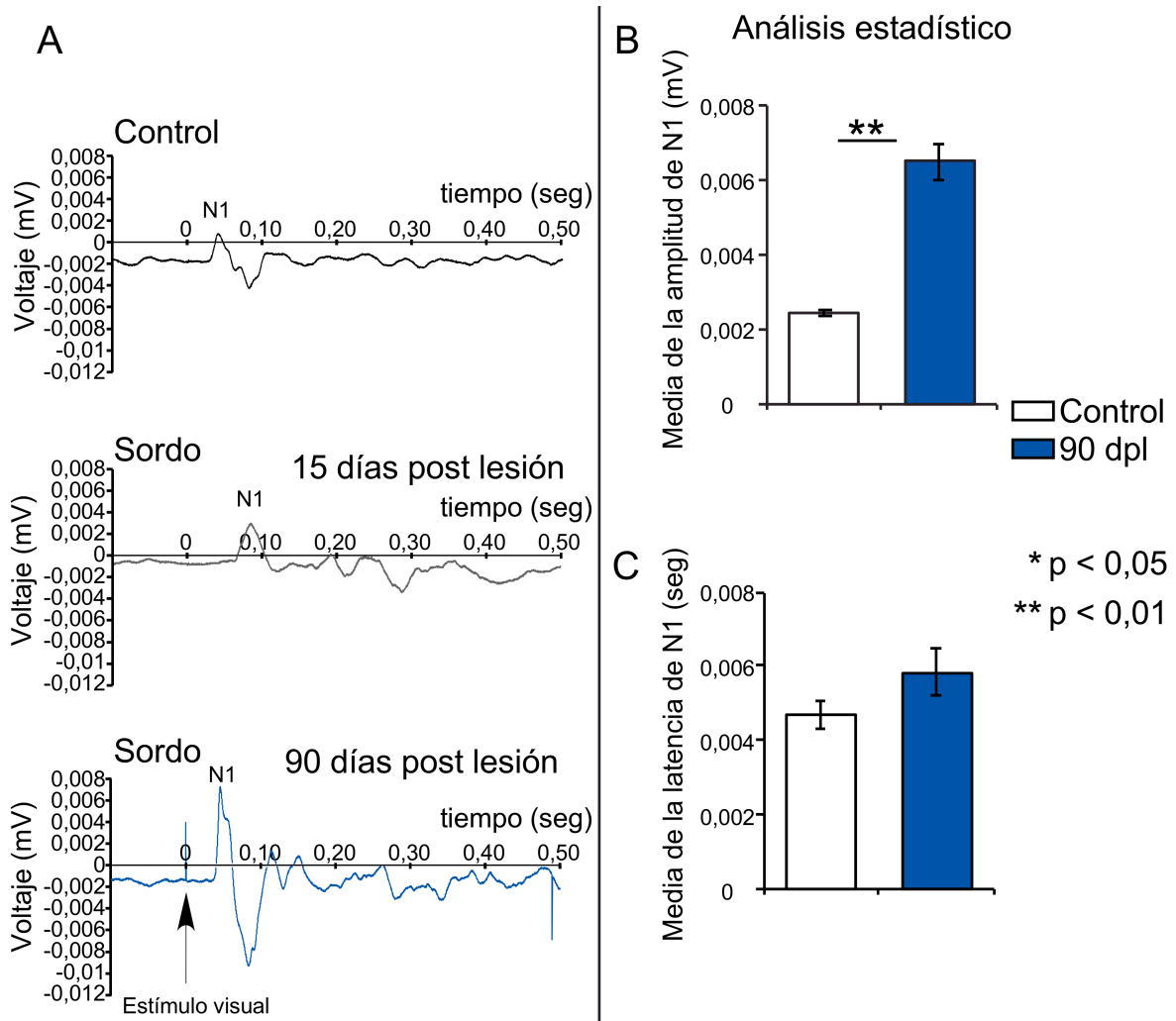


Figura 4. Registros representativos de potenciales evocados visuales (visual evoked potentials - VEPs) obtenidos en la corteza visual de (A) un animal control, un animal sordo a los 15 días post lesión (dpl) y de uno a los 90 dpl. (B) Representación gráfica del promedio de la amplitud de la onda N1 y del error estándar (animales controles $n = 3$; animales a los 90 dpl $n = 6$). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ($* = p < 0,05$; $** = p < 0,01$). Nótese el incremento estadísticamente significativo del promedio de la onda N1 a los 90 dpl. El valor de la amplitud de la onda se midió como la suma del valor en milivoltios (mV) del pico negativo anterior al pico de N1 y el valor (mV) del pico positivo N1. (C) Representación gráfica del valor promedio de la latencia de la onda N1 y del error estándar (animales controles $n = 3$; animales a los 90 dpl $n = 6$; $* p < 0,05$; $** p < 0,01$).

EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS CORTEZAS AUDITIVA Y VISUAL

La extracción del tejido restringida a la CV y CA se comprobó mediante la superposición de las secciones digitalizadas del atlas de Paxinos y Watson (2005) con las fotografías realizadas de las secciones coronales teñidas con el método de Nissl. De esta manera, se pudo confirmar que los huecos correspondientes al tejido extraído de los animales controles y sordos (90 dpl) coincidían con las cortezas auditiva y visual (Figs. 1E y F). Este método permitió realizar el análisis de la expresión del grupo de genes seleccionados (*Arc/Arg3.1*, *c-Fos*, *GluA2*, *Gad65*, *Gad67*, *Gabra1*, *Gabrb2* y *Parvalbúmina*) con alta precisión para las cortezas auditiva y visual, de manera individual, de los animales controles y sordos (90 dpl) del grupo experimental 2.

En los animales sordos (90 dpl) los niveles de expresión génica para *c-Fos* (*fold change* 1,96 – $p < 0,01$) y *Arc/Arg3.1* (*fold change* de 1,46 – $p < 0,05$) mostraron un incremento estadísticamente significativo en la CV (Figs. 5A y B). Sin embargo, en la CA no se obtuvo ningún cambio.

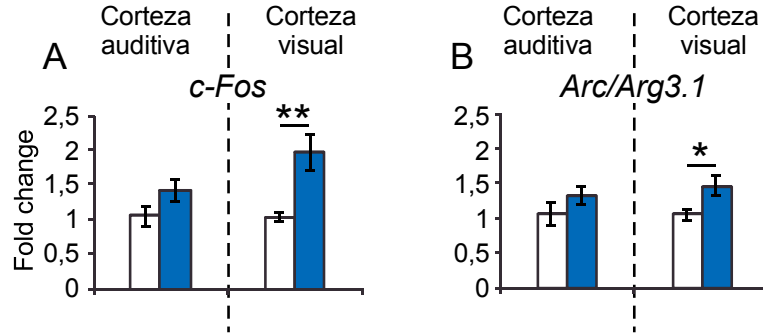
La expresión génica de la subunidad *GluA2* del AMPA R mostró un incremento estadísticamente significativo en la CA (*fold change* de 1,42 – $p < 0,05$) pero no en la CV (Fig. 5C).

Los niveles de expresión génica de *Gad65* y *Gad67* mostraron un incremento significativo en la CA con un *fold change* de 1,59 y 1,99 respectivamente ($p < 0,01$), pero en la CV no hubo cambios (Figs. 5D y E). Finalmente, no hubo cambios significativos en la expresión génica de las subunidades de los receptores GABAA y GABAB (*Gabra1* y *Gabrb2*) ni de la *Parvalbúmina* en la CA ni en la CV (Figs. 5F a H).

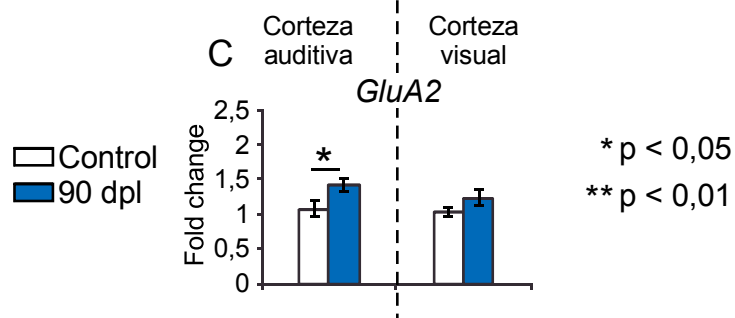
Figura 5. Comparación de la expresión de los genes analizados en la corteza auditiva (CA) y en la corteza visual (CV) en animales controles (barras blancas) y en animales sordos a los 90 días post lesión (dpl - barras azules). Genes dependientes de actividad (A) *c-Fos* y (B) *Arc/Arg3.1*. (C) Subunidad *GluA2* del receptor AMPA. (D) *Gad 65* y (E) *Gad67*. Subunidades de los receptores de GABA (F) *Gabra1* y (G) *Gabbr2*. (H) *Parvalbúmina*. Los gráficos representan la media \pm el error estándar del valor de la expresión génica relativa (*fold change*). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Resultados de la expresión génica - RT-qPCR

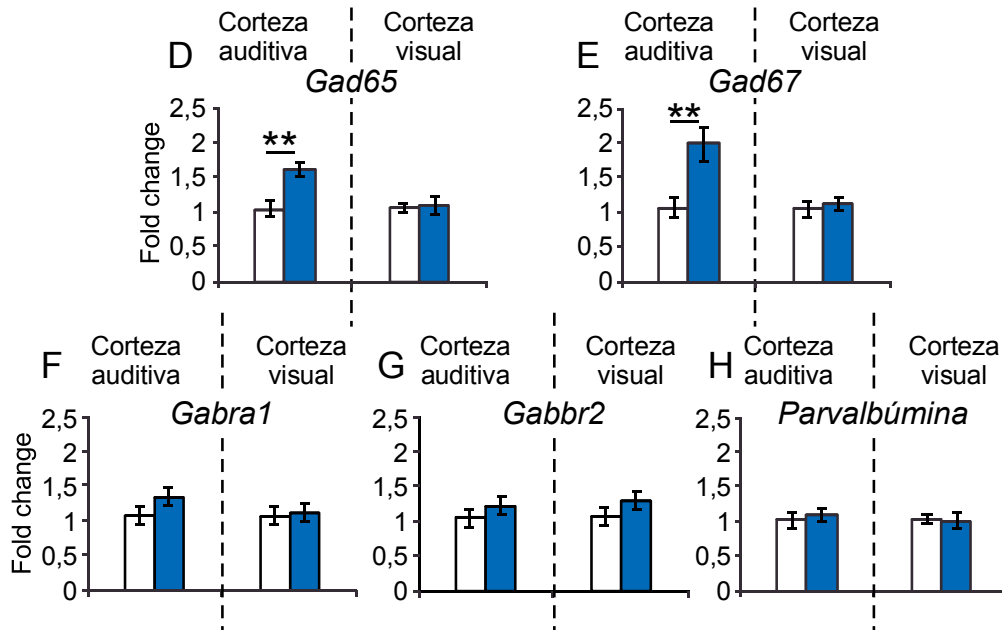
Genes de expresión temprana dependientes de actividad



Marcador de excitación



Marcadores de inhibición



INMUNOCITOQUÍMICA

c-Fos

En la inmunotinción para c-Fos (grupo experimental 3A) se observaron somas inmunorreactivos a lo largo de toda la corteza y de todas las capas. En el análisis cualitativo de las secciones de los animales controles y de sus correspondientes mapas (MatLab) se observó que la mayor densidad de las neuronas c-Fos inmunopositivas se encuentra en las capas 2/3, 4 y 6 de las cortezas auditiva y visual (primarias y secundarias) (Figs. 6A, 7A y 8A). Tanto en las secciones inmunoteñidas como en los mapas, las neuronas c-Fos positivas se encontraron más concentradas en las capas 2/3 de la CA1, lo que permitió distinguir a esta corteza de las secundarias (Figs. 6A, 7A y 8A). Por el contrario, en las capas 2/3 de la CV1 se observó una menor concentración de las partículas c-Fos positivas, lo que permitió definir los límites citoarquitecturales de las cortezas secundarias del área visual (Figs. 6A, 7D y 8A). La superposición de los mapas con las secciones digitales del atlas de Paxinos y Watson (2005) del nivel interaural correspondiente también facilitó establecer los límites de las distintas capas a lo largo de la corteza (Fig. 6A).

En la CA (cortezas primaria y secundaria) de los animales a los 15 dpl, el análisis de los mapas y de las secciones inmunoteñidas evidenció una pérdida de las neuronas c-Fos inmunopositivas en todas las capas de la CA (corteza primarias y secundarias) (Figs. 6B y 8B) (ver detalles de la CA1 de un control y de un animal a los 15 dpl en la Figs. 7A y B). Esta observación se confirmó mediante el análisis cuantitativo, donde se encontró una disminución estadísticamente significativa del número de neuronas c-Fos inmunorreactivas (Fig. 9A). Además, se observó una disminución de la intensidad de la inmunotinción a lo largo de toda la CA (Fig. 6B). Al realizar el análisis cuantitativo de la media de grises, se encontró un aumento estadísticamente significativo, lo que refleja una disminución de la inmunoreactividad de las partículas (Fig. 9B).

En la CA del grupo de animales sordos a los 90 dpl, mediante el análisis cualitativo de las secciones inmunoteñidas y de los mapas, se observó una menor cantidad de partículas c-Fos positivas con respecto al control, pero mayor que en los animales de 15 dpl (Figs. 6C y 8C) (ver detalles de la CA1 en la Fig. 7C). Al realizar el análisis cuantitativo, se encontró un incremento estadísticamente significativo de las neuronas c-Fos inmunorreactivas en comparación con el grupo de 15 dpl, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales controles (Fig. 9A). Además, se observaron diferencias en la distribución e intensidad de las neuronas c-Fos inmunorreactivas encontrándose más concentradas en las capas 4 y 6 de la CA y representadas por puntos rojos (partículas más inmunoteñidas) (Figs. 7C y 8C). Al analizar cuantitativamente la intensidad de la inmunorreacción, se encontró una disminución estadísticamente significativa de la media de grises de las neuronas c-Fos en comparación con las de la CA de los animales de 15 dpl, reflejando entonces un aumento de la inmunotinción de las neuronas a los 90 dpl (Fig. 9B).

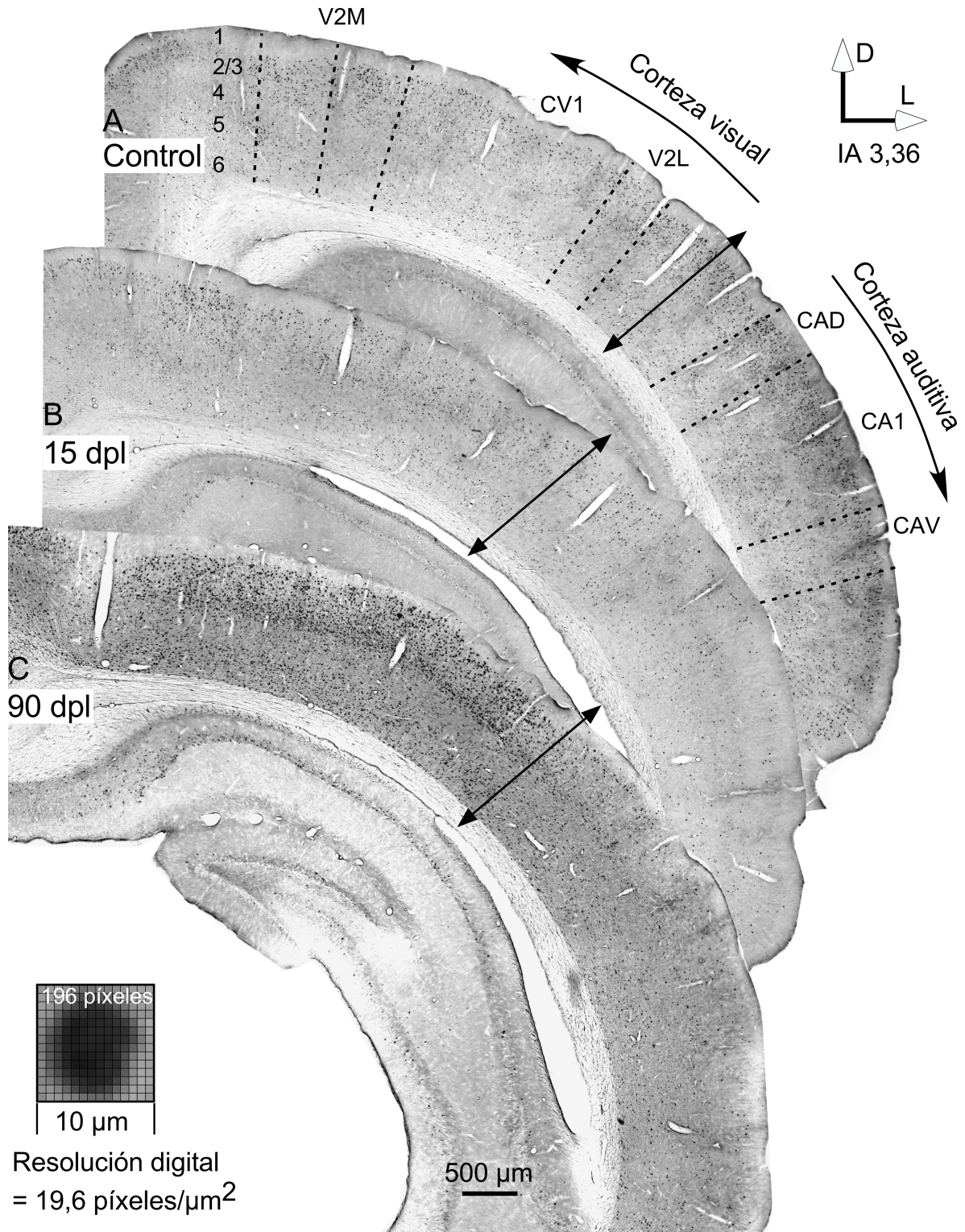
Con respecto a la CV a los 15 dpl, no se observaron diferencias cualitativas en el número de neuronas c-Fos positivas (Figs. 6B y 8B) (ver detalles de la CV1 de un control y de un animal a los 15 dpl en las Figs. 7D y E), aunque en los mapas se observó una mayor cantidad de puntos rojos (partículas más inmunoteñidas) (Fig. 8B). Al realizar el análisis cuantitativo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en los valores de grises de la inmunotinción ni en la cantidad de neuronas (Figs. 9A y B).

En la CV a los 90 dpl se observó en las secciones inmunoteñidas y en los mapas un aumento de la cantidad de neuronas inmunorreactivas para c-Fos, particularmente en las capas 4 y 6 (Figs. 6C y 8C) (ver detalles de la CV1 en la Fig. 7F). Esta observación se confirmó mediante el análisis de la cuantificación del número de partículas c-Fos positivas, donde se encontró un incremento estadísticamente significativo, a diferencia de los resultados obtenidos a los 15 dpl (Fig. 9A). También se encontró un incremento en la intensidad de la inmunotinción

de las neuronas c-Fos inmunorreactivas, reflejado por un descenso en los valores de la media de grises (Fig. 9B).

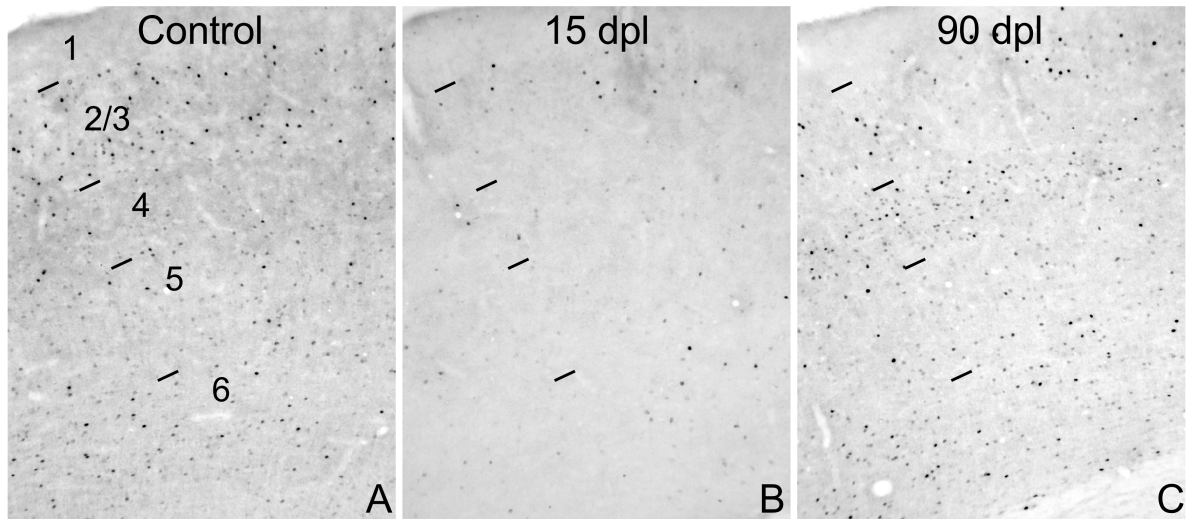
Figura 6. Microfotografías de secciones coronales inmunoteñidas para c-Fos. (A) Control, (B) 15 días post lesión (dpl) y (C) 90 dpl. Las tres secciones corresponden a niveles rostro-caudales similares (IA 3,36). Las líneas discontinuas en la sección coronal del control (A) representan las subdivisiones citoarquitecturales de la corteza, que fueron establecidas mediante la superposición de las secciones rostro-caudales con las secciones digitales del atlas de Paxinos y Watson (2005) (IA 3,36). Nótese que los límites citoarquitecturales establecidos coinciden con cambios en la intensidad y en la distribución de las neuronas c-Fos inmunorreactivas a lo largo de la corteza. Los números del 1 al 6 corresponden a las capas de la corteza. El descenso de la inmunorreactividad en la corteza auditiva (CA) a los 15 dpl se observa en (B) y el incremento en la cantidad de neuronas y en la intensidad de su inmunorreactividad en la corteza visual (CV) a los 90 dpl en (C). Abajo y a la izquierda se muestra la resolución digital en píxeles/ μm^2 de las fotografías realizadas. CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2ML: corteza visual secundaria lateral.

Inmunotinción para c-Fos



Inmunotinción para c-Fos

Corteza auditiva primaria



Corteza visual primaria

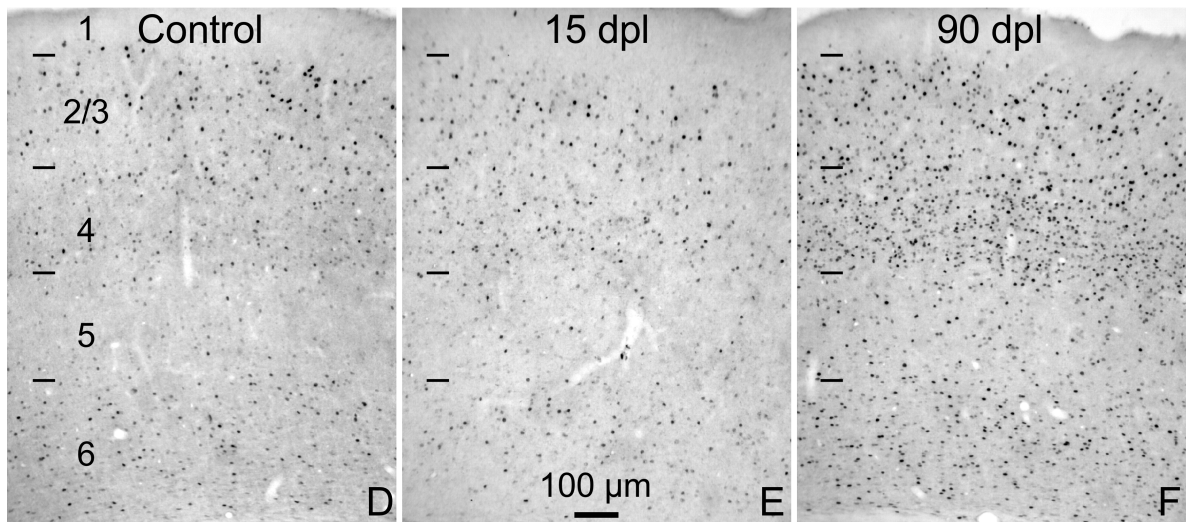


Figura 7. Detalles de la corteza auditiva primaria (CA1) y de la corteza visual primaria (CV1), tomados de secciones inmunoteñidas para c-Fos a un nivel rostro-caudal similar de un animal control (A y D), a los 15 días post lesión (15 dpl) (B y E) y a los 90 dpl (C y F). Los números del 1 al 6 corresponden a las capas de la corteza. Nótese la disminución de las neuronas inmunorreactivas a los 15 dpl (C) comparado con el control (A) y el aumento a los 90 dpl, principalmente en las capas 4 y 6 (D). El incremento en el número de neuronas inmunopositivas y en la intensidad de la inmunotinción se observa a lo largo de todas las capas de la CV1 a los 90 dpl (F).

Figura 8. Reconstrucción multiparamétrica con el programa MatLab de los valores de perímetro nuclear, media de grises y la localización de las neuronas inmunorreactivas para c-Fos de 3 secciones coronales a un nivel rostro-caudal similar (IA 3,48). (A) Control, (B) 15 días post lesión (dpl) y (C) 90 dpl. Cada punto de color corresponde a una neurona inmunorreactiva y los colores representan la intensidad de la inmunotinción (abajo y a la izquierda de la figura se encuentra la barra de calibración que muestra la equivalencia de colores con la intensidad de los grises). El tamaño de los puntos corresponde al perímetro de los núcleos inmunorreactivos. En la corteza auditiva (CA) se observa un descenso en el número de neuronas a los 15 dpl (B), que se recupera parcialmente (comparar C con B) y con una distribución distinta a los 90 dpl (comparar C con A). Nótese el incremento en la cantidad de neuronas inmunorreactivas en la corteza visual (CV) a los 90 dpl (C) en comparación con el control (A) y con el animal de 15 dpl (B). CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2ML: corteza visual secundaria lateral.

Mapas de la inmunotinción para c-Fos

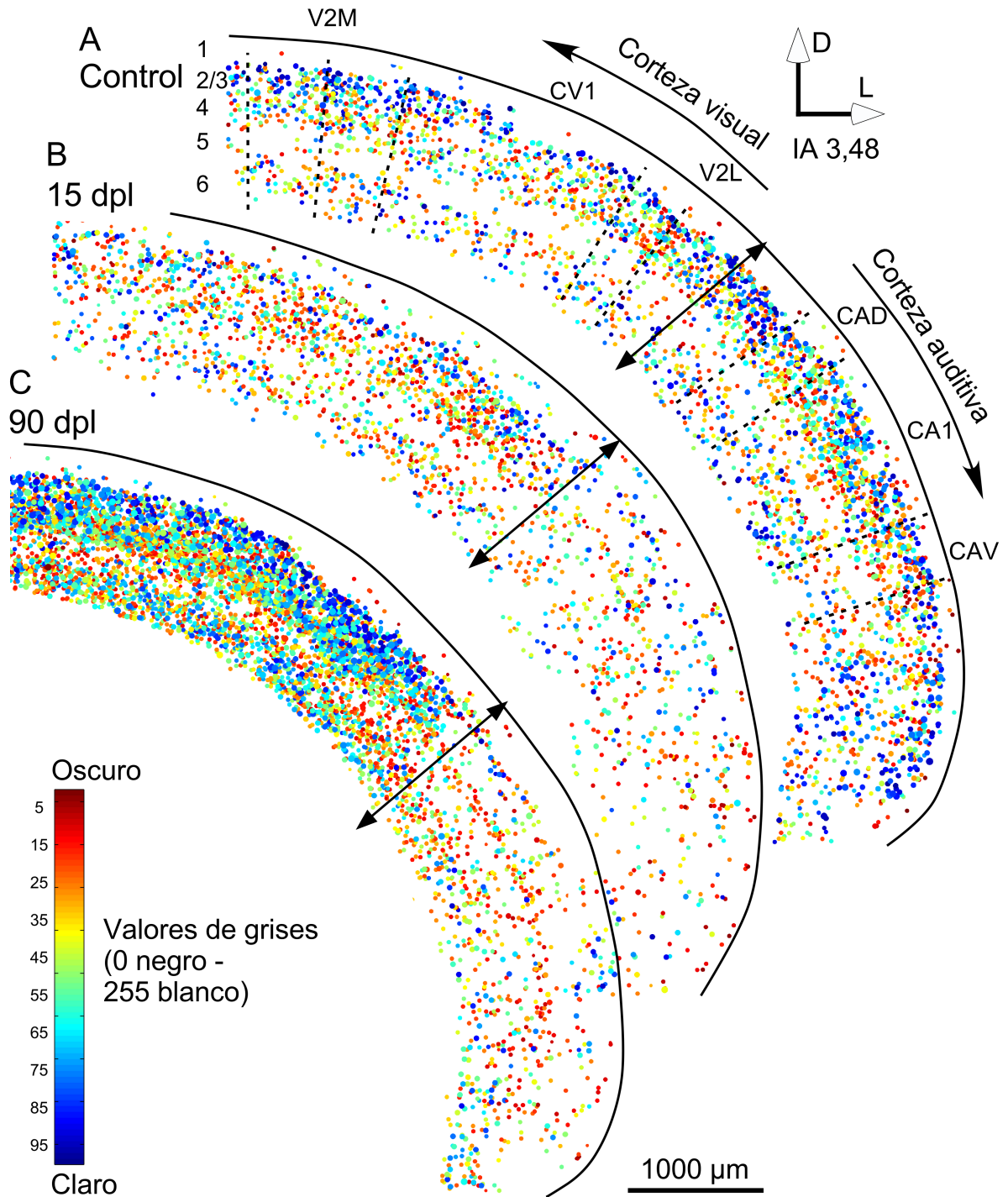
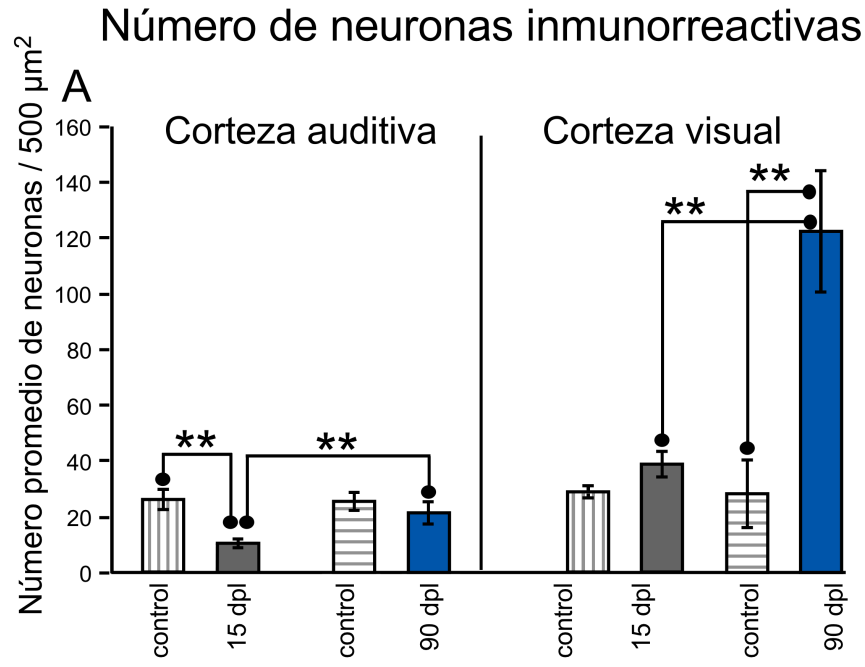
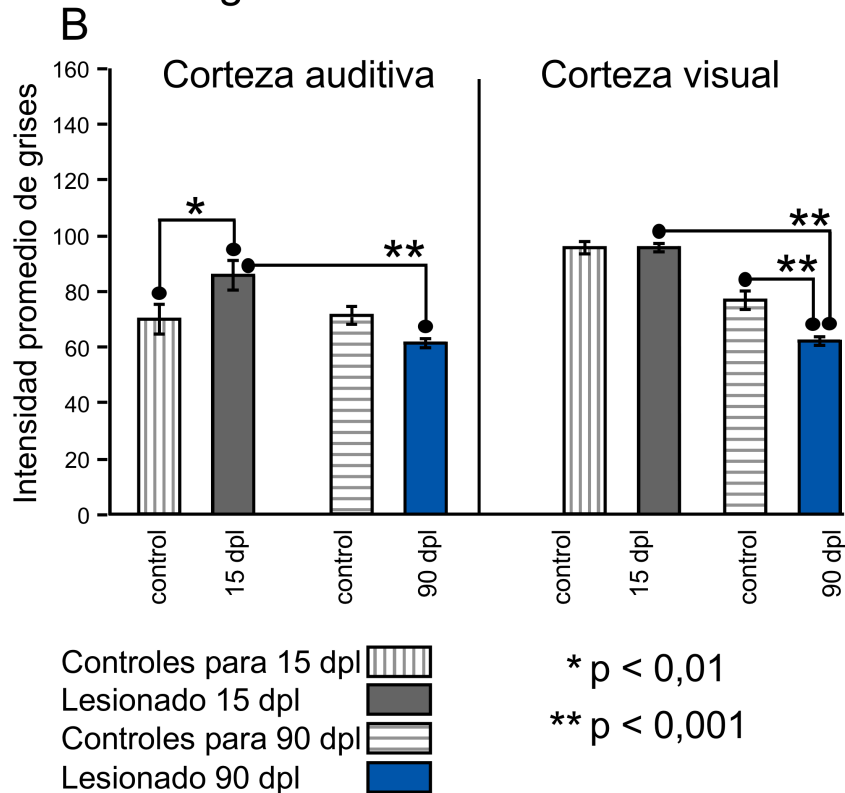


Figura 9. Análisis estadístico del número de neuronas c-Fos inmunorreactivas (A) y de la intensidad de grises de la inmunotinción (B). Las líneas acabadas en puntos y los asteriscos marcan las comparaciones estadísticas realizadas y las diferencias significativas encontradas entre los grupos (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$). Nótese que en la corteza auditiva el número promedio de las neuronas c-Fos inmunopositivas disminuye significativamente a los 15 días post lesión (dpl) con respecto a su grupo control. A los 90 dpl el número promedio de neuronas inmunorreactivas es mayor que a los 15 dpl, pero similar al grupo control. El promedio de los valores de grises a los 15 dpl es más alta (menor intensidad de la inmunotinción) que en el grupo control. A los 90 dpl la intensidad promedio de los valores de grises es menor que en el grupo de 15 dpl y similar al grupo control. En la corteza visual no se observan cambios a los 15 dpl ni en el número de neuronas ni en la intensidad de la inmunorreacción. A los 90 dpl el número de neuronas c-Fos inmunorreactivas incrementa con respecto a los controles y a los 15 dpl. La intensidad de los valores de grises a los 90 dpl es significativamente menor (mayor intensidad de inmunotinción) que en los controles.

Análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica para c-Fos



Valores de grises de las neuronas inmunoteñidas



Arc/Arg3.1

La inmunorreactividad para Arc/Arg3.1 (grupo experimental 3A) se detectó en los somas y dendritas de neuronas piramidales grandes y medianas, tanto en las secciones coronales de los controles como de los animales sordos (Fig. 10A). En los animales controles se observó una mayor intensidad de inmunotinción y una mayor cantidad de dendritas y somas inmunorreactivos en las CA1 y CV1, lo que permitió establecer, junto con el atlas de Paxinos y Watson (2005), los límites citoarquitecturales de las cortezas secundarias (Fig. 10A).

En la CA de las secciones inmunoteñidas del grupo de animales de 15 dpl se evidenció una disminución de la intensidad y de la cantidad de los somas y dendritas inmunorreactivas con respecto a los animales controles (Figs. 10A y B), reflejado en la imagen pseudocolor por una menor cantidad de somas en color negro y rojo, y una menor cantidad de dendritas y neuropilo en color rojo (Figs. 11A y 11B). En comparación con los 15 dpl, a los 90 dpl se observó un aumento de los somas inmunopositivos en la capa 6, evidenciado por una mayor cantidad de somas rojos en la imagen pseudocolor (Fig. 11C). También se observó un incremento de la intensidad de la inmunorreactividad en toda la CA, evidenciado por una mayor cantidad de dendritas y de neuropilo en color verde en la imagen pseudocolor, con respecto a los 15 dpl (comparar Fig. 11B con 11C).

En la CV, la intensidad de la inmunotinción y la cantidad de dendritas y de somas inmunorreactivos incrementó a los 15 dpl (Fig. 10B) y 90 dpl (Fig. 10C), observándose un incremento mayor a los 90 dpl. Además, el incremento de la inmunorreactividad y de la cantidad de somas y de dendritas inmunopositivas para Arc/Arg3.1 fue más evidente en las capas 2/3 a la 6, reflejado en la imagen pseudocolor por un mayor número de somas en color negro, y por una mayor cantidad de dendritas y neuropilo en color rojo (Fig. 11C).

Figura 10. Microfotografías de secciones coronales inmunoteñidas para Arc/Arg3.1 a un nivel rostro-caudal similar (IA 3,36). (A) Control, (B) 15 días post lesión (dpl) y (C) 90 dpl. Las líneas discontinuas en la sección coronal del control (A) corresponden a las subdivisiones citoarquitecturales definidas mediante la superposición de la fotografía con la sección rostro-caudal digital del atlas de Paxinos y Watson (2005). Los números del 1 al 6 corresponden a las capas de la corteza. Nótese la disminución de la inmunorreactividad para Arc/Arg3.1 en la corteza auditiva (CA) a los 15 dpl, así como el incremento en la cantidad de neuronas y sus dendritas inmunorreactivas en la corteza visual (CV) a los 90 dpl y el incremento en la intensidad de la inmunotinción. CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2ML: corteza visual secundaria lateral.

Inmunotinción para Arc/Arg3.1

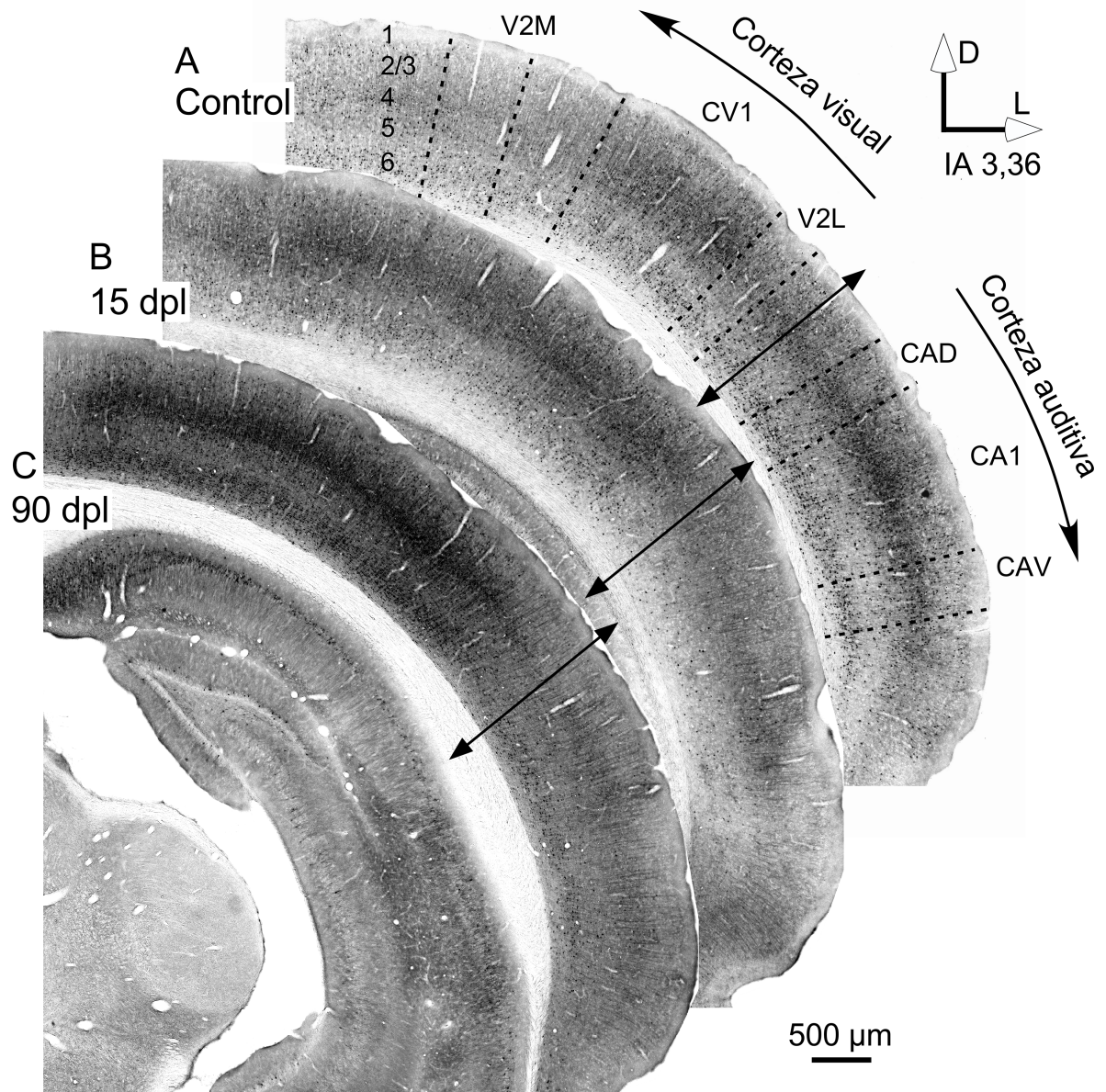
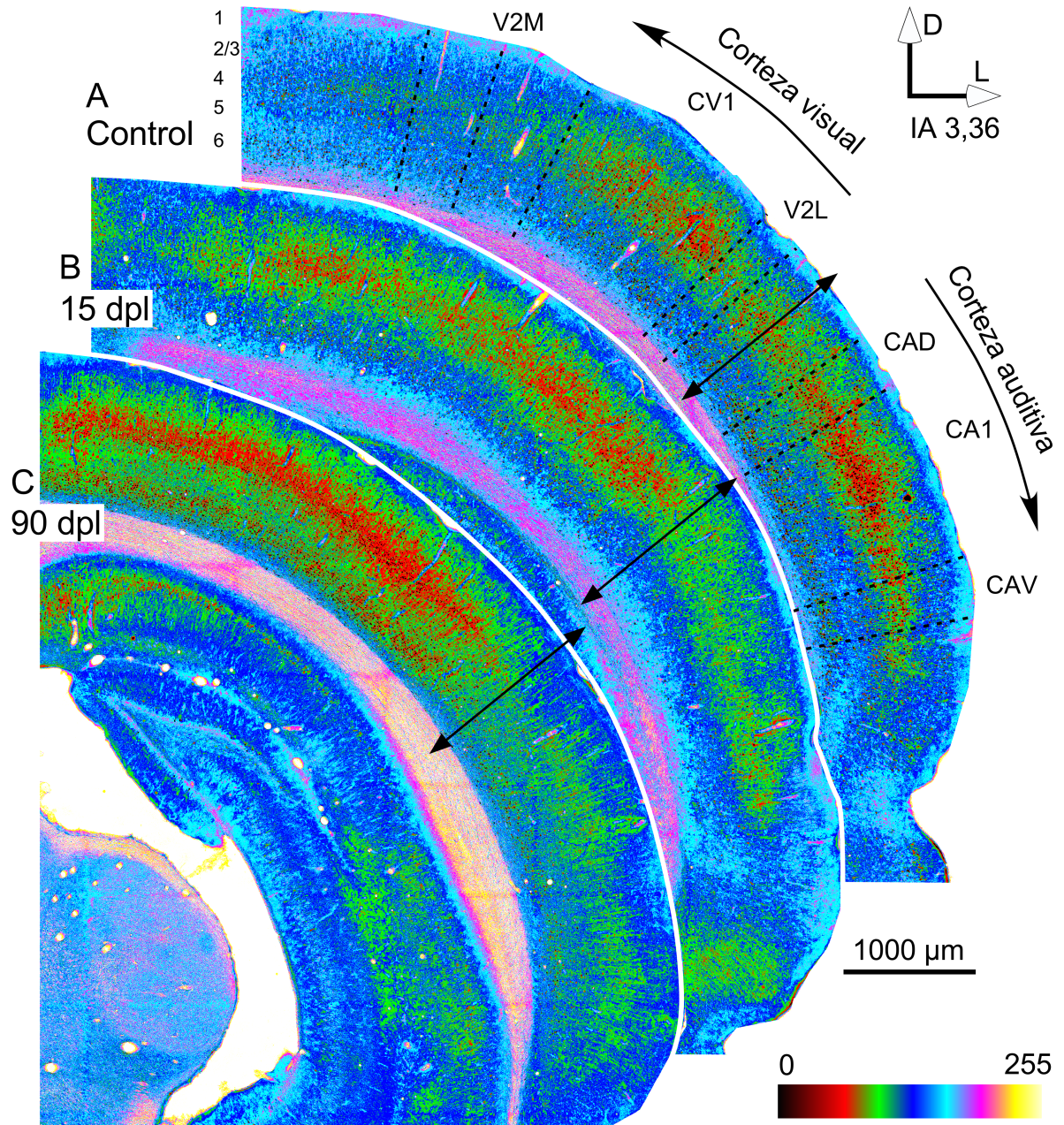


Figura 11. Imágenes de gradientes de gris representados en pseudocolor obtenidas a partir de microfotografías hechas para secciones coronales inmunoteñidas para Arc/Arg3.1 a un nivel rostro-caudal similar (IA 3,36) (mismas secciones que la Fig. 10). Abajo y a la derecha de la figura se encuentra la barra de calibración de colores que corresponden a la intensidad de los valores de grises de la inmunotinción. (A) Control, (B) 15 días post lesión (dpl) y (C) 90 dpl. Nótese el incremento en la inmunorreactividad de las neuronas y de sus dendritas en la corteza visual (CV) a los 90 dpl. CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2L: corteza visual secundaria lateral.

Imágenes pseudocolor de la inmunorreactividad para Arc/Arg3.1



Subunidades GluA2/3 del receptor AMPA de glutamato

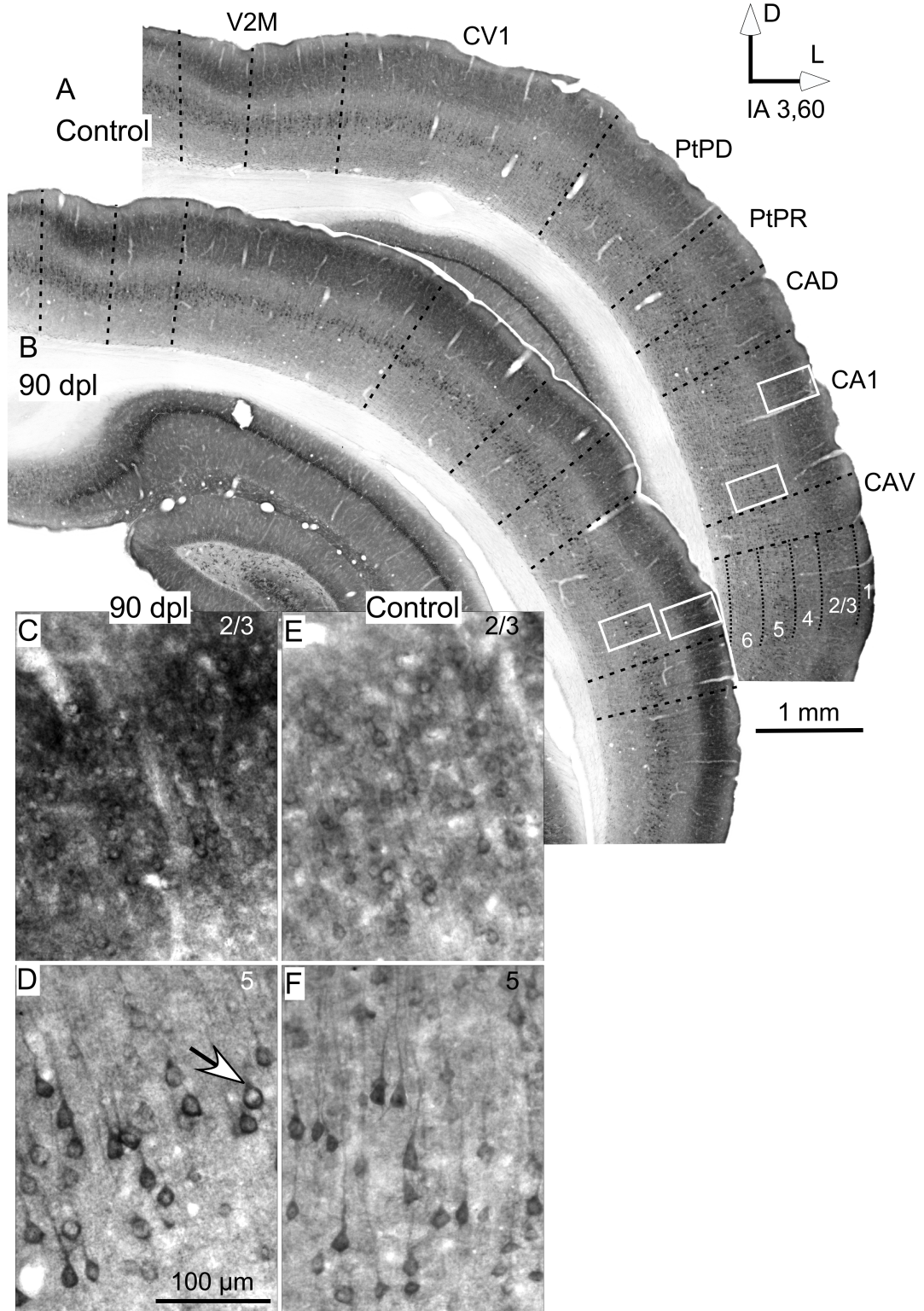
La inmunorreactividad para las subunidades GluA2/3 en los animales controles se observó en las pirámides medianas y pequeñas de las capas 2/3, y en las pirámides grandes de la capa 5 a lo largo de toda la corteza (Fig. 12A, E y F). La capa 2/3 también se caracterizó por presentar una alta inmunorreactividad en el neuropilo. También se observó que la inmunotinción en la capa 5 era menor en las cortezas primarias (auditiva y visual) en comparación con las secundarias, lo que permitió establecer las distintas subdivisiones citoarquitecturales (Fig. 12A).

El patrón de la inmunotinción en los animales sordos a los 90 dpl fue similar a los observados en los animales controles. Sin embargo, en las cortezas auditiva y visual de los animales sordos se observó que las dendritas y los somas de las pirámides medianas y grandes eran más densos en las capas 2/3 y en la 5 en comparación con los controles (Fig. 12B, C y D). El incremento de la inmunorreactividad en las capas 2/3 de los animales sordos fue muy elevado, lo que dificultó llevar a cabo una segmentación adecuada de la inmunotinción (Fig. 12B). En los animales sordos (90 dpl) también se evidenció un incremento de la inmunorreactividad para las subunidades GluA2/3 en las neuronas piramidales grandes (Fig. 12D – flecha).

Debido a las dificultades para segmentar las neuronas inmunopositivas de forma individual, el análisis cuantitativo se hizo midiendo la DO de toda la inmunorreactividad para cada una de las subdivisiones citoarquitecturales analizadas por separado (las cortezas primarias y secundarias correspondientes a las áreas auditiva y visual). De todas las subdivisiones analizadas, sólo se obtuvo un incremento estadísticamente significativo en los valores de DO en la CA1 y en la CAD de los animales sordos (Fig. 13). Aunque en la CV se observó cualitativamente un incremento de la inmunotinción, no se obtuvieron diferencias significativas en los valores de DO en ninguna de sus subdivisiones (Fig. 13).

Figura 12. Microfotografías de secciones coronales inmunoteñidas para las subunidades GluA2/3 del receptor AMPA a un nivel rostro-caudal similar (IA 3,60). (A) Control y (B) 90 días post lesión (dpl). Las líneas discontinuas corresponden a las subdivisiones citoarquitecturales de la corteza y los números del 1 al 6 indican las capas a lo largo de la corteza. Los rectángulos blancos corresponden a detalles a mayor aumento de las capas 2/3 y 5 de la corteza auditiva primaria (CA1) (C y D - 90 dpl) y (E y F - control). Nótese el incremento de la inmunorreactividad en las neuronas piramidales a los 90 dpl (C y D). CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial,. PtPD: corteza parietal postero-dorsal; PtPR: corteza parietal postero-rostral.

Inmunotinción para GLUA2/3



Análisis de la densidad óptica para la inmunorreactividad de GluA2/3

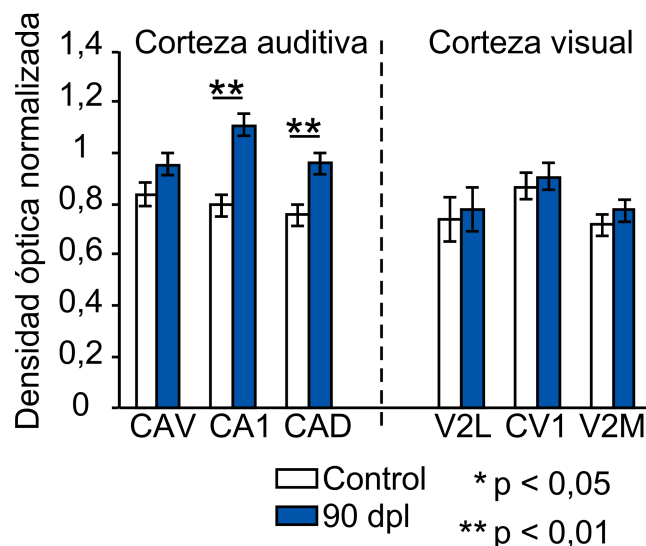


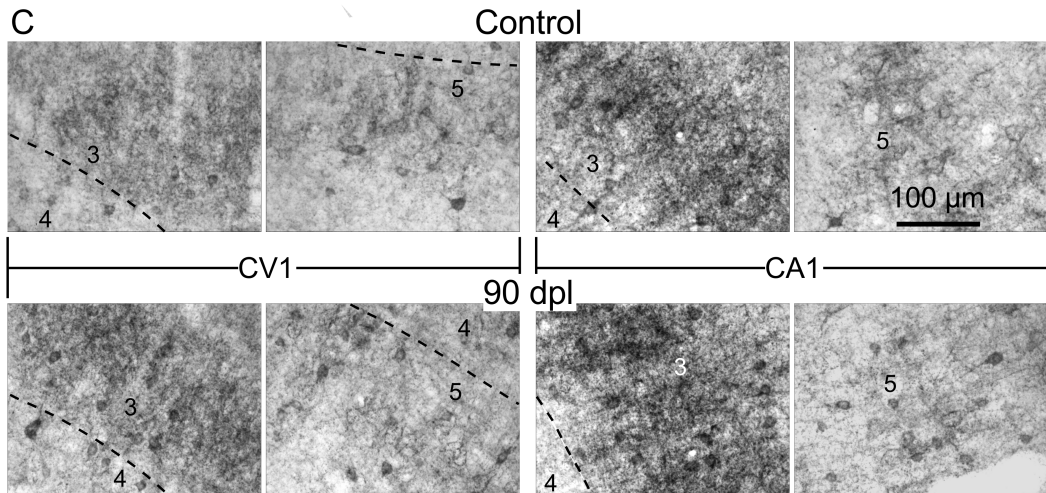
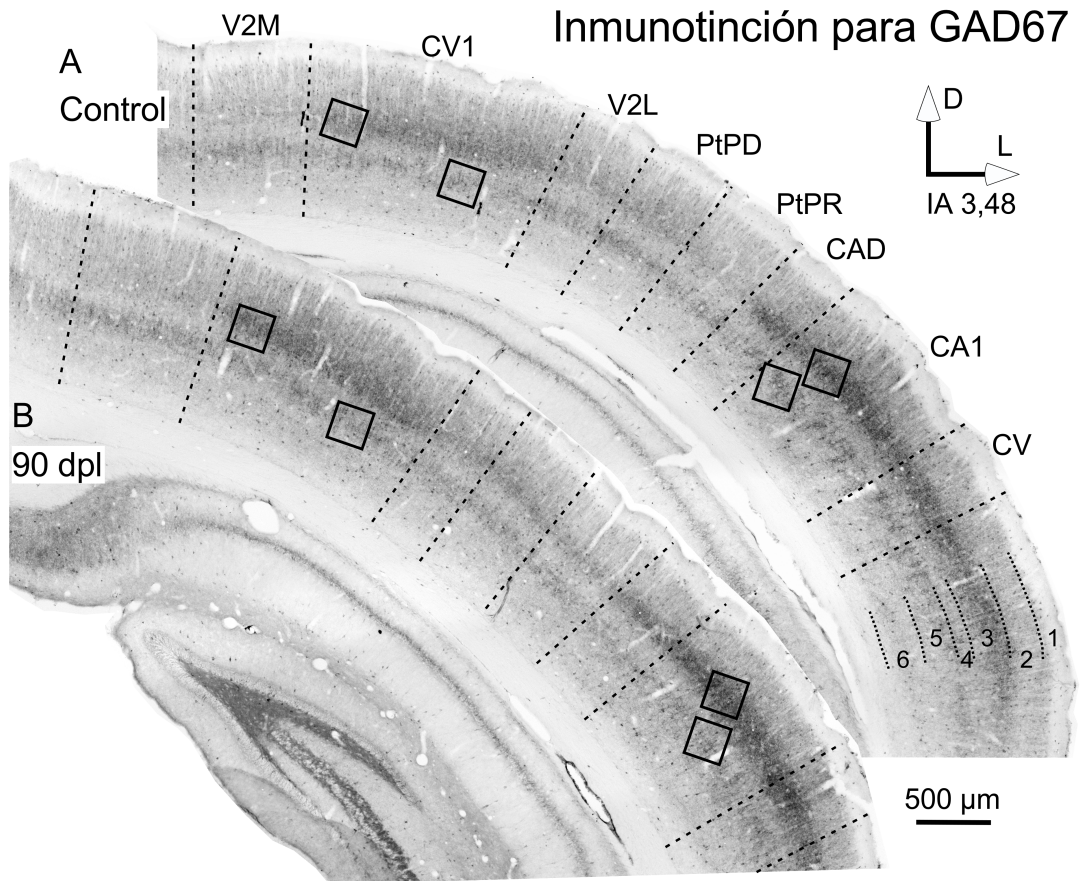
Figura 13. Inmunocitoquímica cuantitativa - análisis estadístico. Cambios en la densidad óptica (DO) normalizada de la inmunorreactividad para las subunidades GluA2/3 del receptor AMPA en la corteza auditiva (CA) y en la corteza visual (CV), de animales controles (barras blancas) y de animales sordos a los 90 días post lesión (dpl - barras azules). El análisis cuantitativo de la DO se realizó por separado para CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2L: corteza visual secundaria lateral. Las barras representan la media \pm el error estándar de la DO. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas entre grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Nótese el incremento significativo de la DO de la inmunotinción en la CA1 y en la CAD a los 90 dpl.

GAD67

La inmunorreactividad para GAD67 en los animales controles permitió observar somas inmunorreactivos de neuronas medianas y pequeñas a lo largo de todas las capas, así como neuropilo inmunorreactivo principalmente en las capas 3 y 5 (Fig. 14A y C). También se observaron neuronas inmunonegativas delineadas por terminales inmunopositivos. Particularmente, se observó que la intensidad de la inmunorreactividad del neuropilo de las capas 2/3 y 5 era mayor que en las otras capas, lo cual permitió establecer y distinguir los límites de las capas corticales (Fig. 14A). Las subdivisiones corticales se pudieron distinguir con facilidad, debido a que la inmunotinción en las CA1 y CV1 era más intensa que en las cortezas secundarias (Fig. 14A).

Al comparar cualitativamente los animales sordos a los 90 dpl con los animales controles, se observó que las CA1 y CV1 de los animales sordos presentaban una mayor intensidad en la tinción del neuropilo y de los somas inmunorreactivos, principalmente de las capas 3 y 5 (Fig. 14B y C). El análisis cuantitativo de la inmunorreactividad confirmó un incremento estadísticamente significativo en los valores de DO tanto en la CA1 como en CAD y CAV (CA secundarias) de los animales sordos (Fig. 15). Sin embargo, sólo se observó un incremento estadísticamente significativo en la CV1 (Fig. 15).

Figura 14. Microfotografías de secciones coronales inmunoteñidas para GAD67 a un nivel rostro-caudal similar (IA 3,48). (A) Control y (B) 90 días post lesión (dpl). Las líneas discontinuas corresponden a las subdivisiones citoarquitecturales de la corteza y los números del 1 al 6 indican las capas a lo largo de la corteza. Los recuadros negros corresponden a detalles a mayor aumento de las capas 3 y 5 en la corteza visual primaria (CV1) y en la corteza auditiva primaria (CA1) de un animal control y de un animal sordo a los 90 dpl (C). Nótese el incremento de la inmunorreactividad en las neuronas de la CV1 y de la CA1 a los 90 dpl (D). Nótese también el incremento de la inmunorreactividad del neuropilo en la capa 3 de la CV1 y de la CA1 a los 90 dpl. CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2L: corteza visual secundaria lateral, PtPD: corteza parietal postero-dorsal; PtPR: corteza parietal postero-rostral.



Análisis de la densidad óptica para la inmunorreactividad de GAD67

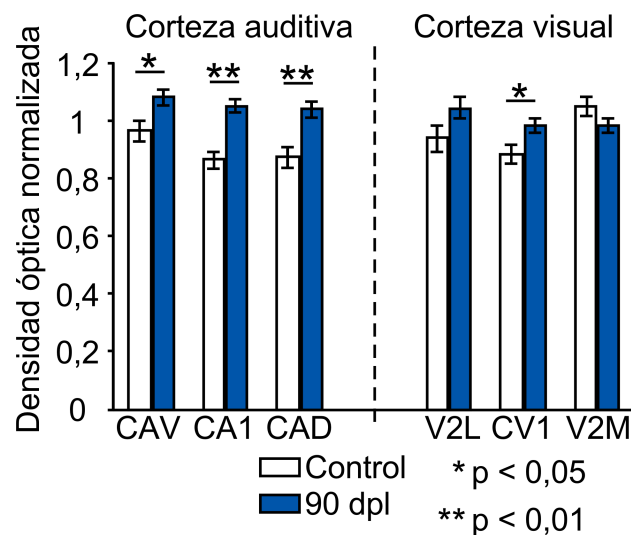


Figura 15. Inmunocitoquímica cuantitativa - análisis estadístico. Cambios en la densidad óptica (DO) normalizada de la inmunorreactividad para GAD67 en la corteza auditiva (CA) y en la corteza visual (CV), de animales controles (barras blancas) y de animales sordos a los 90 días post lesión (dpl - barras azules). El análisis cuantitativo de la DO se realizó por separado para CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2L: corteza visual secundaria lateral. Las barras representan la media \pm el error estándar de la DO. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas entre grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Nótese el incremento significativo de la DO de la inmunotinción en toda la CA y en la CV1 a los 90 dpl.

Parvalbúmina

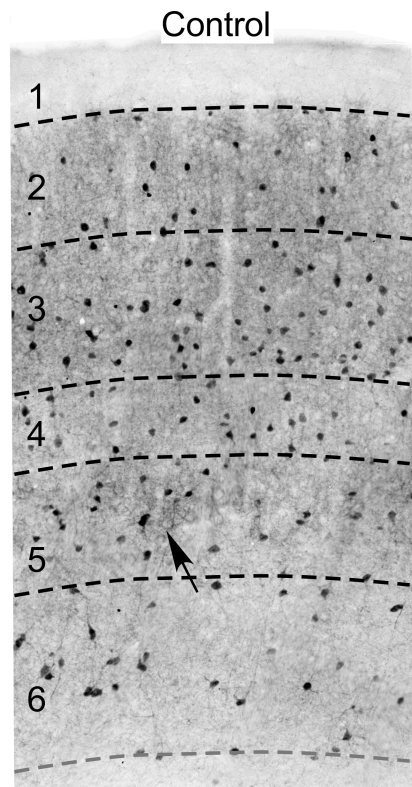
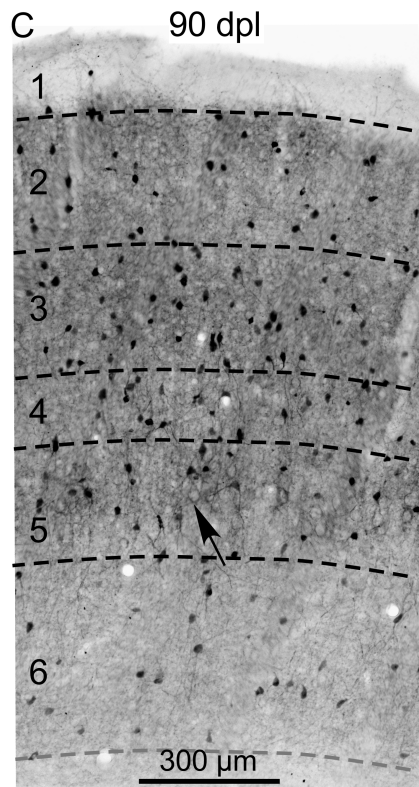
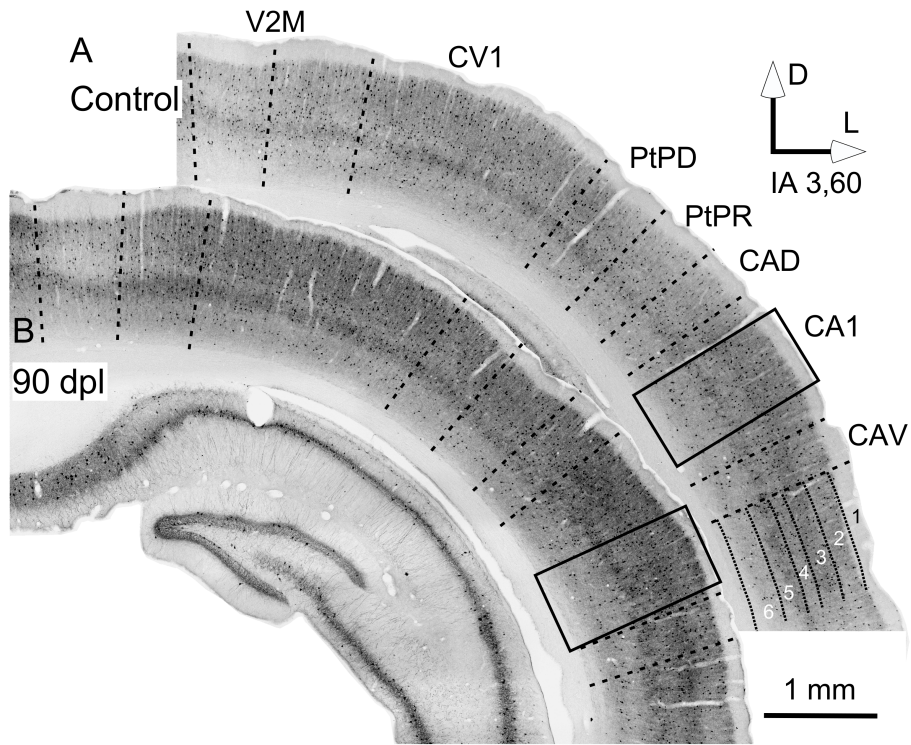
En las secciones inmunoteñidas para PV tanto en controles como lesionados se observaron cuerpos celulares inmunorreactivos medianos y pequeños, así como arborizaciones dendríticas, lo que permitió identificar a estas neuronas como interneuronas (Fig. 16A y B). La distribución de las interneuronas inmunopositivas para PV se observó a lo largo de todas las capas, excepto en la capa 1 (Fig. 16A, B y C). En las capas 2/3 y 5, los terminales inmunopositivos observados eran más abundantes y presentaban una mayor intensidad de la inmunorreacción (Fig. 16A, B y C). Se identificaron terminales inmunopositivos que se encontraban delineando neuronas piramidales grandes y medianas inmunonegativas, particularmente en la capa 5 (ver flechas en los detalles de la Fig. 16C). Las interneuronas PV inmunopositivas se observaron distribuidas homogéneamente a lo largo de toda la corteza. Las diferencias en la intensidad de la inmunotinción permitieron identificar los límites citoarquitecturales, puesto que las cortezas primarias y secundarias de las áreas visual y auditiva presentaban una mayor densidad de inmunorreacción, particularmente en la CA1 (Fig. 16A y B).

La inspección microscópica de las secciones evidenció un incremento de la intensidad en la inmunorreactividad del neuropilo (comparar las secciones coronales en la Fig. 16A). Sin embargo, no se observó ningún cambio estadísticamente significativo al comparar los valores de DO de la inmunotinción total de las diferentes subdivisiones corticales.

Debido a que la tinción de las interneuronas PV positivas se podía distinguir muy claramente de la señal de fondo y de la inmunorreactividad del neuropilo, la segmentación de los somas permitió cuantificarlos en cada una de las subdivisiones corticales evaluadas. De acuerdo con este análisis, se encontró un incremento estadísticamente significativo del número de interneuronas PV positivas en la CA1 de los animales sordos (Fig. 17).

Figura 16. Microfotografías de secciones coronales inmunoteñidas para parvalbúmina (PV) a un nivel rostro-caudal similar (IA 3,60). (A) Control y (B) 90 días post lesión (dpl). Las líneas discontinuas en (A) y (B) corresponden a las subdivisiones citoarquitecturales de la corteza y los números del 1 al 6 indican las capas a lo largo de la corteza. Los rectángulos negros corresponden a detalles a mayor aumento de la corteza auditiva primaria (CA1) mostrados en (C), de un animal control y de un animal sordo a los 90 dpl. Nótese el incremento de la inmunorreactividad en la CA1 a los 90 dpl en (C). CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2L: corteza visual secundaria lateral, PtPD: corteza parietal postero-dorsal; PtPR: corteza parietal postero-rostral.

Inmunotinción para parvalbúmina



Número normalizado de neuronas PV inmunorreactivas

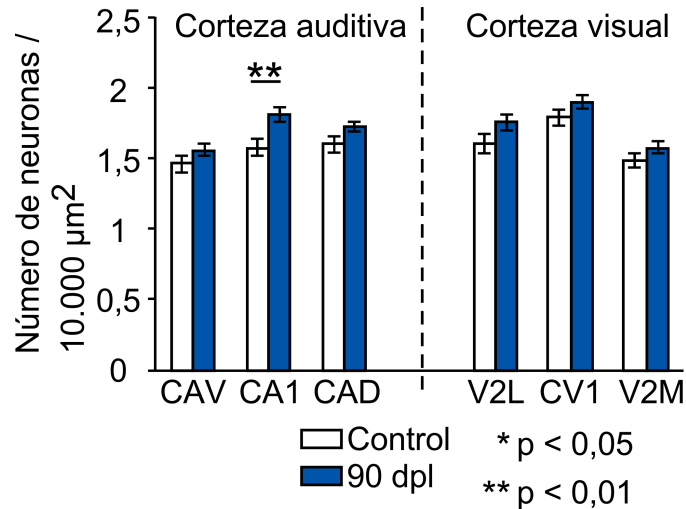


Figura 17. Inmunocitoquímica cuantitativa - análisis estadístico. Cambios en el número de neuronas parvalbúmina (PV) positivas en la corteza auditiva (CA) y en la corteza visual (CV), de animales controles (barras blancas) y de animales sordos a los 90 días post lesión (dpl - barras azules). El análisis cuantitativo de las neuronas PV inmunorreactivas se realizó por separado para CA1: corteza auditiva primaria, CAD: corteza auditiva dorsal, CAV: corteza auditiva ventral, VC1: corteza visual primaria, V2M: corteza visual secundaria medial, V2L: corteza visual secundaria lateral. Las barras representan la media ± el error estándar del número de neuronas en 10.000 μm². Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas entre grupos (* p < 0,05; ** p < 0,01). Nótese el incremento significativo de las neuronas PV positivas exclusivamente en la CA1 a los 90 dpl.

RECEPTORES GABA: SUBUNIDADES GABAA- α 1 Y GABAB-R2

En el análisis de la proteína realizado mediante *Western blot* se pudieron detectar las bandas correspondientes al receptor ionotrópico GABAA- α 1 y al metabotrópico GABAB-R2 en la localización de 51 kDa y 106 kDa respectivamente (Fig. 18).

No se encontraron diferencias relevantes en el patrón de expresión de GABAA- α 1 y de GABAB-R2, en la CA ni en la CV de los animales a 90 dpl al compararlos con los controles.

Niveles de las proteínas GABAA- α 1 y GABABR2

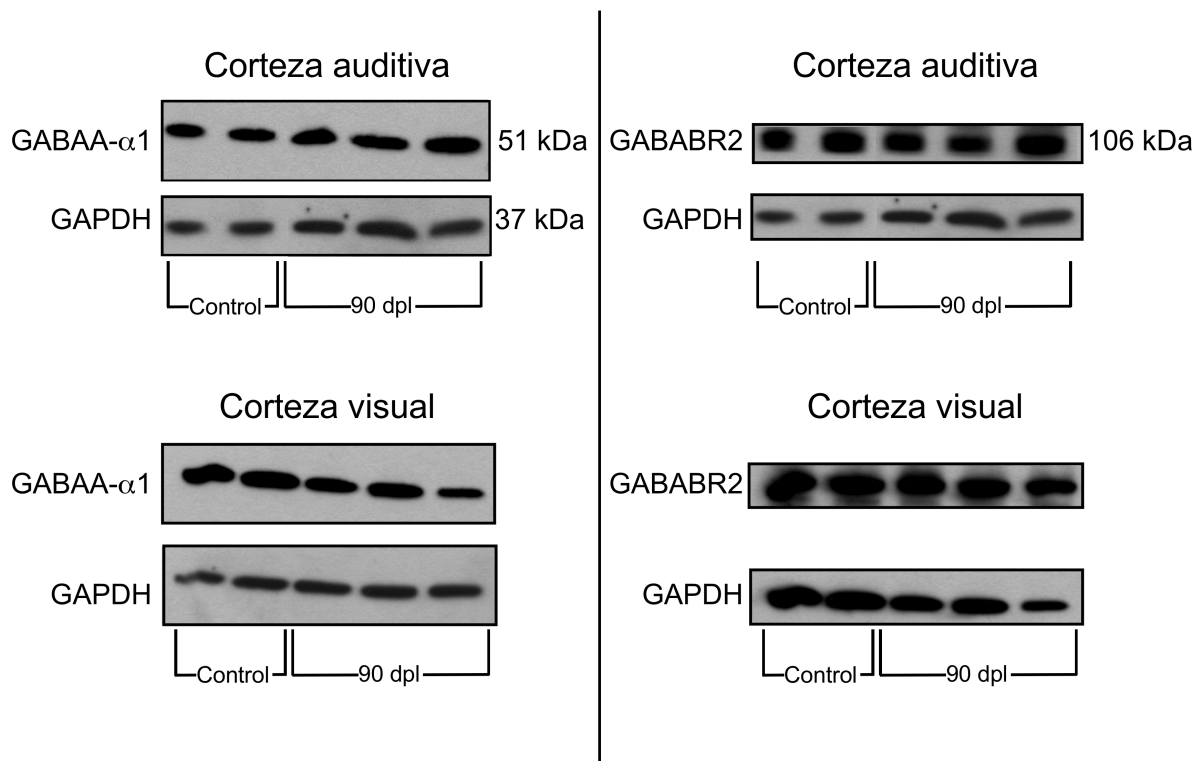


Figura 18. Expresión de las proteínas correspondientes al receptor ionotrópico GABA α 1 y al metabotrópico GABAB-R2. Resultados del Western blot de las cortezas auditiva y visual de animales controles y animales sordos a los 90 días post lesión (dpl).

DISCUSIÓN

MODELO EXPERIMENTAL

En nuestro modelo experimental hemos observado una pérdida de la respuesta eléctrica auditiva evocada del tronco del encéfalo (ABRs planos) inmediatamente después de la lesión coclear y en los dos tiempos post lesión (15 y 90 dpl). Además, hemos encontrado una pérdida del 17% de las NGE a los 15 dpl y del 73% a los 90 dpl. En función de nuestros resultados, los marcadores de activación neuronal (genes de expresión temprana dependientes de actividad y VEPs) sugieren que se produce una reacción intermodal principalmente a los 90 dpl en nuestro modelo de sordera. A la vista de estos datos es posible que estos cambios intermodales observados a lo largo del tiempo se correlacionen con la degeneración progresiva del nervio auditivo.

Si la plasticidad intermodal cortical se desencadena por el descenso de actividad o el silenciamiento total de la vía auditiva es algo que está aún por demostrarse. Sin embargo, el descenso en la estimulación primaria auditiva de las primeras y sucesivas estaciones de la vía debe ser imprescindible para activar la plasticidad intermodal objeto de este estudio. Se ha descrito que tras 15 días después de realizar lesiones mecánicas cocleares en cobayas se produce un aumento en el umbral del potencial de acción compuesto de la cóclea (disminución de la sensibilidad del receptor) y un incremento en la actividad espontánea de las neuronas del núcleo coclear ventral medida mediante registros unitarios (Vogler y cols., 2011). Estos resultados sugieren que a los 15 dpl la vía auditiva mantiene su actividad en ausencia de potenciales inducidos por las aferencias primarias.

Por otra parte, se ha descrito que la sordera a corto plazo inducida por trauma acústico en cobayas produce un incremento significativo de la amplitud de las respuestas evocadas auditivas corticales, evidencia que sugiere un incremento en la ganancia y activación de la CA después de la privación sensorial (Popelar y cols. 1987). Un efecto similar ha sido demostrado en chinchillas empleando un modelo de sordera inducida por el daño de las células ciliadas externas mediante el uso de

drogas ototóxicas (Qiu y cols. 2000). Además, ha sido demostrado mediante registros electrofisiológicos extracelulares en un modelo de trauma acústico en ratas, que la amplitud de las respuestas evocadas auditivas se incrementa 2 semanas después de la exposición al ruido (Schormans y cols. 2017). Estos modelos de privación auditiva a corto plazo, donde no se produce una pérdida importante de las NGE, sugieren que la descarga espontánea del nervio auditivo podría mantener la vía auditiva activa.

En nuestro modelo experimental hemos observado una pérdida de la respuesta eléctrica auditiva evocada del tronco del encéfalo (ABRs planos) a todas las intensidades del sonido exploradas (entre 10 y 90 dB) inmediatamente después de la lesión coclear y en todos los tiempos post lesión. Como la onda 1 de estos registros evocados refleja la actividad del nervio y de la cóclea (Kiang, 1965) y no se observó en ninguno de los animales registrados, es posible inferir que la actividad del nervio está anulada o disminuida en nuestro modelo experimental a 15 y 90 dpl. Sin embargo, a la vista de los resultados de otros modelos de sordera a corto plazo explicados anteriormente, este análisis funcional de ABRs no descarta la pérdida total de la activación de los núcleos cocleares o del nervio auditivo. Por este motivo, en nuestro estudio valoramos tanto las respuestas eléctricas como el estado de lesión de las NGE. En nuestro análisis con el método de Nissl de secciones seriadas de las cócleas lesionadas mecánicamente hemos encontrado una pérdida del 17% de las NGE a los 15 dpl y del 73% a los 90 dpl, lo que demuestra un proceso degenerativo progresivo a largo plazo del nervio auditivo. La coincidencia de la degeneración extensa de las NGE y la fuerte reacción intermodal auditivo-visual observada en este trabajo no permite establecer una relación causal, pero abre la posibilidad de generar una hipótesis de trabajo a explorar en el futuro en la que se propone que solo la degeneración masiva a largo plazo de los aferentes primarios permite garantizar el silencio sensorial auditivo y una reacción intermodal cortical. Sin embargo, aunque en nuestro modelo de sordera la ruptura de la escala media del órgano de Corti y la pérdida consiguiente de la endolinfa aseguran la

desactivación de las células sensoriales por el desacoplamiento del potencial endococlear y el silenciamiento del nervio auditivo (ABRs planos), una reacción intermodal evidente no se produce hasta los 90 dpl, momento en el que se observa la pérdida extensiva de las NGE.

CAMBIOS DEPENDIENTES DE ACTIVIDAD

c-Fos

En nuestros resultados obtenidos por inmunocitoquímica se observó un descenso en el número de neuronas c-Fos inmunopositivas a los 15 dpl y una recuperación a los 90 dpl en la CA, acompañado de un fuerte incremento en la CV que fue confirmado por un aumento significativo de su expresión medido por RT-qPCR.

c-Fos es un gen de expresión temprana, cuya expresión es rápidamente inducida y modulada por neurotransmisores, despolarización neuronal o cambios en la regulación de factores de crecimiento (Greenberg y cols., 1986; Morgan y Curran, 1988; Bartel y cols., 1989; Sheng y Greenberg, 1990; Joo y cols., 2015). También se ha visto que la inducción temprana de c-Fos está relacionada con procesos de apoptosis (Preston y cols., 1996) y con lesión neuronal (Bullit, 1990; Chen y cols., 2015). Sin embargo, en las secciones inmunoteñidas para c-Fos, tanto en animales controles como en animales sordos, no se observó cromatolisis en los núcleos c-Fos inmunorreactivos. Por lo tanto, los cambios en la expresión de *c-Fos* y en el número de neuronas c-Fos inmunopositivas observados en nuestros resultados en la corteza cerebral sugieren que pueden deberse a cambios en la actividad eléctrica neuronal, metabólica o neurotrófica, o a una combinación de estos factores. Dado el carácter de la expresión de este gen, la disminución estadísticamente significativa de las neuronas c-Fos inmunopositivas en la CA a los 15 dpl, apoya una disminución de la actividad neuronal, seguramente debida a una alteración del funcionamiento de los aferentes talámicos auditivos inducida por la privación sensorial auditiva.

En contraste con los resultados obtenidos a los 15 dpl, se observó que el número de neuronas c-Fos inmunorreactivas a los 90 dpl en la CA fueron similares a los resultados encontrados en los animales controles. Resultados similares han sido encontrados en gato en un modelo de privación visual, donde c-Fos se utilizó para analizar los cambios que se producen en la corteza (Arckens y cols., 2000). En este modelo, que consistió en la fotocoagulación de la zona central del campo visual de la retina, se describió que la expresión de c-Fos disminuye en la CV 3 días después de la lesión y se recuperaba 3 meses después (Arckens y cols., 2000). Estos resultados y los mostrados en el presente trabajo relativos a la CA, sugieren que la privación sensorial produce una disminución en la activación neuronal de la corteza desafereciada con una posible recuperación a lo largo del tiempo. Resulta interesante que el incremento de las neuronas c-Fos inmunopositivas en la CA a los 90 dpl se observó principalmente en las capas 4 y 6. Siendo estas capas las principales dianas de las aferencias tálamo-corticales (Kharazia y Weinberg, 1994), la recuperación de la inmunorreactividad para c-Fos habla en favor de una reactivación del eje tálamo-cortical auditivo a largo plazo.

A los 15 dpl no se encontraron cambios en el número de neuronas c-Fos positivas en la CV, lo que podría relacionarse con la pérdida y degeneración lenta de las NGE (pérdida del 17% a los 15 dpl), lo que sugiere que la reorganización y sobreactivación de esta corteza se produce a largo plazo como reacción intermodal a la pérdida de la mayoría de las NGE (73% de pérdida a los 90 dpl). También los resultados de RT-qPCR confirman un incremento de la expresión génica de *c-Fos*, además de un incremento en la proteína (evaluada por inmunocitoquímica cuantitativa) en la CV y sugieren que una población amplia de neuronas se sobreactiva en la sordera a largo plazo (90 dpl).

En resumen, los cambios encontrados en el número, en la distribución y en la intensidad de la inmunorreactividad de las neuronas c-Fos inmunopositivas, tanto en la CV como en la CA, reflejan un incremento en la activación neuronal de la CV, que

puede ser el sustrato de una reorganización intermodal que solamente se produce a largo plazo.

Arc/Arg3.1

En nuestro modelo de sordera bilateral crónica se observó un descenso en la inmunorreactividad para Arc/Arg3.1 a los 15 dpl en la CA, y una recuperación a los 90 dpl, acompañado por un aumento tanto de su expresión génica como de su inmunorreactividad en la CV.

El gen de expresión temprana Arc/Arg3.1 se ha relacionado estrechamente con la actividad eléctrica neuronal, después de observar que su expresión génica se inducía rápidamente con la estimulación eléctrica de alta frecuencia en el hipocampo (Lyford y cols., 1995; Steward y cols., 1998; Steward y cols., 2015). Por lo tanto, un descenso en su inmunorreactividad como el observado por nosotros en los animales sordos a los 15 dpl sugiere una menor activación de la CA, seguramente inducida por una alteración de sus aferencias talámicas tras la privación sensorial. Un descenso en este gen también se encontró en la CA1 de ratas Wistar 6 días después de una sordera inducida por trauma acústico (Tan y cols., 2007). No obstante, al igual que se observó tras el análisis de la inmunorreactividad para c-Fos, a los 90 dpl encontramos un incremento de los somas Arc/Arg3.1 inmunorreactivos en la capa 6 de la CA, que apoya (vs) la potencial reactivación a largo plazo de las aferencias tálamo-corticales. Se necesitarán nuevos experimentos para cimentar esta hipótesis, por cuanto una reactivación talámica puede, en principio, deberse a un fenómeno intrínseco del tálamo, o a una reorganización intermodal localizada tanto en los niveles más bajos (colículo inferior) como en los superiores (núcleo reticular talámico y corteza) de la vía auditiva.

Se ha demostrado que Arc/Arg3.1 se encuentra estrechamente relacionado con la neurotransmisión glutamatérgica, puesto que regula la internalización de algunas subunidades de los receptores AMPA de glutamato y, en consecuencia, participa

en el balance homeostático de la excitabilidad de las neuronas (Turrigiano y cols., 1998; Ju y cols., 2004; Chowdhury y cols., 2006; Rial-Verde y cols., 2006; Derkach y cols., 2007; Bramham y cols., 2008; Byers y cols., 2015). Esta función del gen *Arc/Arg3.1* ha sido analizado en rodajas de cerebro, donde se observó que tras estímulos eléctricos, participa en la endocitosis de las subunidades GluA2 y 3, que se correlaciona funcionalmente con una disminución de la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias *EPSCs* (Rial-Verde y cols., 2006). A la vista de su papel en la plasticidad sináptica y en la regulación homeostática de la actividad neuronal, el incremento observado en la expresión génica de *Arc/Arg3.1* y de la inmunorreactividad en la CV de los animales sordos, principalmente encontrado a los 90 dpl, se puede interpretar como un fenómeno de compensación del incremento en la activación neuronal de la CV en la sordera a largo plazo. Un hecho relevante es que el incremento de la inmunorreactividad para *Arc/Arg3.1* se observó en las capas 2/3 a la 6. Las capas 2/3 y 5 reciben las conexiones horizontales provenientes de otras cortezas sensoriales (Paperna y Malach, 1991; Ibrahim y cols. 2016; Teichert y Bolz, 2017), por lo que pensamos que el efecto intermodal se puede relacionar con alteraciones en la actividad de las conexiones horizontales entre la CA y la CV. Las capas 4 y 6, donde también se observó un incremento de la inmunorreactividad para *Arc/Arg3.1*, reciben principalmente las aferencias talámicas (Kharazia y Weinberg, 1994), por lo que no podemos descartar una alteración de los drivers tálamo-corticales visuales en nuestro modelo de sordera a largo plazo.

En resumen, nuestros resultados apoyan que tras la desafereciación auditiva se produce una disminución a corto plazo de la activación neuronal en la CA, que se recupera a muy largo plazo, y que se acompaña de una reacción intermodal cuya consecuencia es una sobreactivación neuronal en la CV potencialmente compensada por un descenso en la excitabilidad de sus redes neuronales.

Actividad eléctrica evocada de la corteza visual

Los genes de expresión temprana expresan regulación de actividad neuronal tanto como plasticidad (regulación de factores tróficos c-Fos o regulación de excitabilidad Arc/Arg3.1), pero, a pesar de ello, deben ser considerados como evidencias indirectas del estado de activación de unas pocas células insertadas en las redes neuronales corticales. Sin embargo, los registros de potenciales evocados nos pueden hablar de la respuesta neuronal global de la corteza frente a una respuesta a un estímulo sensorial. En humanos con sordera tanto congénita (Neville y cols., 1983) como adquirida en el adulto (Campbell y Sharman, 2014), se ha demostrado mediante el registro de VEPs, un incremento de la amplitud de la onda N1, lo que apoya una sobreactivación de la CV en la sordera a largo plazo. En nuestro modelo de sordera a largo plazo, la media de la amplitud de la onda N1 incrementó un 156,39% con respecto a los animales controles, cambio que sólo se observó a los 90 dpl y no a los 15 dpl. Esta onda se detectó a los $0,046 \pm 0,004$ seg en los animales controles y a los $0,05 \pm 0,006$ seg en los animales sordos a los 90 dpl, y corresponde a la respuesta más cercana a la llegada de la estimulación de la vía ascendente a la CV (Creel, 1974). Por lo tanto, el incremento de la onda N1 que nosotros observamos puede reflejar un aumento de activación, tanto como el aumento en la expresión génica y en la inmunorreactividad de los genes dependientes de actividad (c-Fos y Arc/Arg3.1). Por ello sugerimos que, tal y como se observó en humanos, la sordera permanente conduce a una reacción intermodal cuyo resultado final es el aumento de la actividad en la CV.

MARCADORES DE EXCITACIÓN E INHIBICIÓN. REORGANIZACIÓN INTERMODAL

La sobreactivación de la CV a los 90 dpl observada en nuestro modelo debe ser la consecuencia de una alteración en el balance de excitación e inhibición en las cortezas sensoriales inducido por un cambio en la activación talámica auditiva. Por ello, para evaluar esta hipótesis, realizamos un análisis comparativo entre las cortezas auditiva y visual de marcadores relacionados con la excitación y la inhibición de los circuitos neuronales corticales.

Subunidades GluA2/3 de los receptores AMPA

En nuestros resultados para las subunidades de los receptores AMPA se observó un aumento de la expresión génica de *GluA2*, acompañado por un aumento de la inmunorreactividad para GluA2/3 en las capas 2/3 y 5 de la CA a los 90 dpl.

En un modelo de privación visual, donde los ratones crecieron en ausencia de luz, se demostró un incremento de la expresión génica de las subunidades GluA2 y 3 de los receptores AMPA en la CV (Tropea y cols., 2006). En estudios previos de privación sensorial ha sido demostrado el incremento de la excitabilidad de las neuronas de la capa 2/3 de la CA en un modelo de sordera por ablación coclear en jerbos, donde se observó un incremento de la amplitud de las *EPSCs* mediante registros electrofisiológicos con fijación de membrana (*patch-clamp*) (Kotak y cols., 2005). También, en un modelo de privación visual en ratas adultas, se han observado mediante *immunoblot*, cambios en la composición oligomérica de los receptores AMPA, además de un incremento en la amplitud de las *EPSCs* espontáneas de las pirámides de las capas 2/3 y 5 de la CV (Goel y cols., 2006). Estos trabajos sugieren que la privación sensorial visual o auditiva induce cambios en la composición oligomérica de los receptores AMPA que podrían generar una alteración en la excitabilidad y/o en la neurotransmisión de la corteza desafereciada. Debido a que las capas 2/3 y 5 reciben las conexiones cortico-corticales (Paperna y Malach, 1991; Ibrahim y cols., 2016; Teichert y Bolz, 2017) nuestros resultados

podrían estar relacionados con las conexiones que proceden de la CV más activada (como observamos por los VEPs).

Se ha descrito que las subunidades GluA2/3 son internalizadas tras la activación de Arc/Arg3.1 (Rial-Verde y cols., 2006). En la CA no observamos cambios ni en la inmunorreactividad ni en la expresión génica para Arc/Arg3.1, por lo que debemos considerar que, al no estar sobreexpresado no debe estar jugando un papel relevante en la regulación funcional de las subunidades GluA2/3 de los receptores AMPA en las neuronas de la CA. Por otro lado, se sabe que la permeabilidad al calcio de los receptores AMPA se ve reducida por la presencia de la subunidad GluA2 (Hollman y cols., 1991) y que, además, normalmente se encuentra ausente o en baja proporción en las interneuronas GABAérgicas (Geiger y cols., 1995; Kondo y cols., 1997). En estas condiciones, la ausencia de cambios en Arc/Arg3.1 con un aumento en la expresión génica y en la inmunorreactividad para GluA2/3 observado por nosotros a los 90dpl, sugiere de forma indirecta una disminución de la permeabilidad al calcio en las neuronas piramidales de la CA.

En la CV no se observaron cambios en la expresión génica de la subunidad *GluA2* ni en la inmunorreactividad de las subunidades GluA2/3 de los receptores AMPA, lo que en principio no contribuye a apoyar cambios reactivos en la síntesis de los receptores AMPA o, al menos, de aquellos que contienen estas subunidades. Como se explicó anteriormente, Arc/Arg3.1 regula la endocitosis de las subunidades de los receptores AMPA de glutamato (Rial-Verde y cols., 2006) y controla así el equilibrio de las redes neuronales sobreactivadas (Turrigiano y cols., 1998; Perez-Otaño y Ehlers, 2005). A diferencia de la CA, donde encontramos un incremento de GluA2/3, pensamos que la ausencia de cambios en estas subunidades y el incremento de Arc/Arg3.1 en la CV, puede asociarse con la necesidad de generar un equilibrio cuando media una sobreactivación funcional (nuestros resultados de VEPs y genes de expresión temprana) como consecuencia de un potencial descenso de la activación talámo-cortical (CA) inducido por la privación sensorial.

GAD65, GAD67 y receptores de GABA

En nuestro modelo experimental encontramos un incremento en la expresión génica de *Gad65* y *Gad67*, así como en la inmunorreactividad para GAD67 en las cortezas auditivas primarias y secundarias. Sin embargo, la CV mostró valores normales en la expresión génica para estos marcadores, observándose un incremento en la inmunorreactividad para GAD67 restringido solamente a la CV1.

GAD65 y GAD67 son las dos principales isoformas de la enzima GAD (Esclapez y cols., 1994), que mediante la descarboxilación del glutamato median la síntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA (Roberts y Frankel, 1950). Por lo tanto, la enzima GAD es considerada como un marcador de la síntesis de GABA en las neuronas (Ribak, 1978; Peters y cols., 1982). Por este motivo, un incremento en la expresión de los genes que codifican para estas enzimas, como el observado por nosotros en la CA a los 90 dpl, sugiere un aumento en la síntesis y un potencial incremento en la inhibición en la CA. Por otro lado, el incremento de la inmunorreactividad para GAD67 en las CAs demuestra un incremento efectivo en la síntesis de esta enzima e, indirectamente, en la síntesis de GABA. A la vista de estos resultados podemos establecer que hay un aumento en la producción del neurotransmisor GABA en las CAs a los 90 dpl que podría indicar un incremento neto en la inhibición.

Es bien sabido que la actividad de las redes neuronales puede ajustarse modificando el balance de excitación-inhibición mediado por cambios en la síntesis de neurotransmisores y de la regulación de los receptores postsinápticos (Turrigiano, 2012). Se han descrito cambios dependientes de actividad, con incremento en GAD 65 y 67 en el hipocampo tras la inducción de epilepsia en ratas (Esclapez y Houser, 1999). Las capas 3 y 5 son los lugares donde se observó el aumento de inmunorreactividad para GAD67, lo que sugiere que tras la sordera a largo plazo las conexiones horizontales cortico-corticales juegan un papel relevante tras la reorganización intermodal. Este planteamiento genera la hipótesis de trabajo de que un aumento en la inhibición en la CA, así como el incremento de las

subunidades GluA2/3, podrían representar un efecto intermodal de compensación inducido por un aumento en la activación de las conexiones horizontales procedentes de la CV sobreactivada (resultados de VEPs y de genes de expresión temprana).

Por otra parte, la sobreactivación de la CV podría también justificarse por los cambios en el balance de excitación e inhibición que se generan en la CA tras la alteración por la sordera de las aferencias talámicas. En condiciones normales, tras registros de whole-cell *in vivo*, Iurilli y cols. (2012) demostraron que la estimulación con sonido produce hiperpolarización en las pirámides de la CV. Los registros en rodajas realizados por Ibrahim y cols. (2016) demostraron que la estimulación por optogenética de la CA produce corrientes postsinápticas excitatorias en las interneuronas inhibitorias PV positivas de la CV, lo que puede justificar un efecto depresor de la CA sobre la CV (Ibrahim y cols., 2016). Como se justifica en el párrafo anterior, nuestros resultados para GAD sugieren un aumento de GABA en las capas 3 y 5 de la CA, lo que puede relacionarse con una mayor actividad depresora de las interneuronas de estas capas sobre sus neuronas piramidales. Por otro lado, el aumento en el número de interneuronas PV positivas en la CA, observado por nosotros (Fig. 17), justifica similar efecto al tratarse de neuronas *fast-spiking* que tradicionalmente se consideran centinelas para la inhibición de las neuronas piramidales. De este modo, considerando el papel fisiológico de la inhibición intermodal demostrado por Iurilli y cols. (2012) e Ibrahim y cols. (2016), nuestros datos apoyan una depresión de la actividad de las pirámides de la CA, cuyo efecto intermodal sería una menor activación de las interneuronas inhibitorias de la CV (demostrado por los experimentos en rodajas – Ibrahim y cols., 2016) y un incremento neto en la actividad de las redes neuronales de la CV (observado mediante los VEPs).

De todos los marcadores estudiados en la CV solamente se observó un incremento para GAD67 (validado por RT-qPCR e inmunocitoquímica) localizado en la CV1.

Un aumento en la activación de las aferencias tálamo-corticales se demostró en ratas sordas por ototoxicidad, mediante registros electrofisiológicos en rodajas de cerebro, donde se observó que en la capa 4 de la CV1 se produce un incremento de la amplitud de las *EPSCs*, lo que sugiere una sobreactivación de las aferencias talámicas visuales (Petrus y cols., 2014). La CV1 es la diana que recibe la mayor parte de las aferencias talámicas visuales (Kharazia y Weinberg, 1994), por lo que nuestra interpretación es que el incremento de la inmunorreactividad para GAD67 encontrado sólo en este área, podría deberse a una reacción a cambios en la activación tálamo-cortical visual en la sordera a largo plazo. No se encontraron cambios significativos en la expresión génica ni en la síntesis de proteína de las subunidades de los receptores GABA (*Gabaa1* y *Gababr2*) en la CA ni en la CV. Ha sido descrito que los receptores ionotrópicos GABAA y los metabotrópicos GABAB presentan velocidades altas de endocitosis y reciclaje (Kittler y cols., 2005; Maier y cols., 2010; Hannan y cols., 2011). Además, mediante estimulación eléctrica de neuronas en cultivo, se ha demostrado que las subunidades del receptor GABAA incrementan en la membrana celular, pero sin presentar cambios en la cantidad total de la proteína, lo cual sugiere un incremento en el tráfico de las subunidades sin producirse cambios en la transcripción o en la síntesis proteica (Rannals y Kapur, 2011). Por otro lado, se ha observado mediante *western blot* la disminución de los receptores GABAB después de la activación de los receptores AMPA de glutamato de neuronas en cultivo (Maier y cols., 2010). Por lo tanto, la ausencia de cambios en las subunidades de los receptores GABA estudiados en los animales sordos, podría deberse a que solo hay cambios en los procesos de anclaje en la membrana y de internalización de estos receptores. El incremento de la inhibición encontrado indirectamente por el incremento de GAD en la CA, sugiere que podría estar ocurriendo sin cambios relevantes en la expresión de los genes o en la síntesis de la proteína de los receptores para GABA.

Parvalbúmina

La inmunocitoquímica para PV demostró un incremento de neuronas inmunorreactivas en la CA1, pero no en las secundarias ni en las visuales.

Diversos estudios que se han realizado para evaluar por inmunocitoquímica las proteínas ligadoras de calcio (Celio, 1986; Celio, 1990) y los neuropéptidos (Hendry y cols., 1984) (PV, calbindina/somatostatina y calretinina/péptido vasointestinal), han permitido indentificar tres tipos principales de interneuronas GABAérgicas en la corteza cerebral (Kawaguchi y Kubota, 1997) encontrándose, aproximadamente un 40% de interneuronas PV inmunorreactivas (Celio, 1986; Lee y cols., 2010; Rudy y cols., 2011). Se ha descrito que las neuronas PV inmunopositivas presentan la morfología típica de las neuronas en cesto (*basket cells*) y de las neuronas en candelabro (*chandelier cells*). Además, se ha demostrado mediante la aplicación de pulsos de corriente despolarizantes y registros celulares (*whole-cell recordings*), que en las neuronas PV inmunorreactivas se producen potenciales de acción de corta duración sin frecuencia de adaptación (*fast-spiking neurons* - FS) (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi y Kubota, 1993). Las interneuronas FS-PV positivas (FS-PV) se encuentran regulando la velocidad de disparo de las neuronas piramidales, lo cual se ha demostrado en rodajas de cerebro mediante registros de *patch-clamp* pareados en la CV del gato (Tamás y cols., 1997). La estrecha relación entre las interneuronas FS-PV y las piramidales también ha sido demostrado recientemente en un estudio *in vivo* realizado en la CV del ratón, donde emplearon optogénica para modular la actividad de las FS-PV y registros pareados de estas interneuronas y de las piramidales postsinápticas. En este estudio demostraron que la supresión de la actividad de las FS-PV mediante la fotoestimulación del virus Arch produce un incremento de la velocidad de disparo de las piramidales, y el efecto contrario lo consiguieron activando las FS-PV con la fotoestimulación del virus ChR2 (Atallah y cols., 2012). Se ha descrito que las interneuronas PV inmunopositivas tienen la capacidad de disparar potenciales de acción a una velocidad elevada debido a que la PV se une con alta afinidad al calcio, y que, en consecuencia, actúa como una

proteína tamponadora de la concentración del calcio intracelular cuando la velocidad de disparo incrementa (Chard y cols., 1993). Dado que en la CA se encontró un incremento significativo de las interneuronas PV positivas, la detección inmunocitoquímica de un mayor número de somas y dendritas inmunorreactivos se debe a un incremento de la inmunotinción para esta proteína ligadora de calcio, lo que podría indicar un aumento de la activación de estas interneuronas. Esta hipótesis podría estar apoyada por registros realizados en el hipocampo de rodajas de cerebro de rata, donde se utilizaron quelantes para reducir la entrada de calcio a las interneuronas PV positivas y su activación, resultando una disminución de la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitorias (*IPSCs*) de las neuronas piramidales (Bucurenciu y cols., 2008). Por lo tanto, debido al rol de las FS-PV en la inhibición de las redes neuronales (Kawaguchi y Kubota, 1997), el incremento en el número e inmunorreactividad de estas interneuronas podría interpretarse como un incremento de la activación de los circuitos inhibitorios, que en efecto apoya los resultados del incremento de la inhibición en la CA de los animales sordos a largo plazo.

CONCLUSIONES

En un modelo de silenciamiento auditivo a largo plazo (90 dpl) en la rata:

1. La degeneración progresiva de las neuronas del ganglio espiral se correlaciona en el tiempo con la reacción intermodal entre las cortezas auditiva y visual.
2. Se produce una reorganización intermodal entre las cortezas auditiva y visual que sólo ocurre en periodos muy largos de tiempo (superiores a dos semanas).
3. El incremento de Arc/Arg3.1 en la corteza visual en combinación con los resultados de los receptores AMPA indican un potencial fenómeno de compensación homeostática tras la sobreactivación de esta corteza.
4. En la reacción intermodal las conexiones horizontales entre las cortezas auditiva y visual son las principales inductoras de la reorganización de las redes neuronales.
5. La sobreactivación de la corteza visual podría justificarse por una disminución sobre ella del efecto inhibitorio de la corteza auditiva.

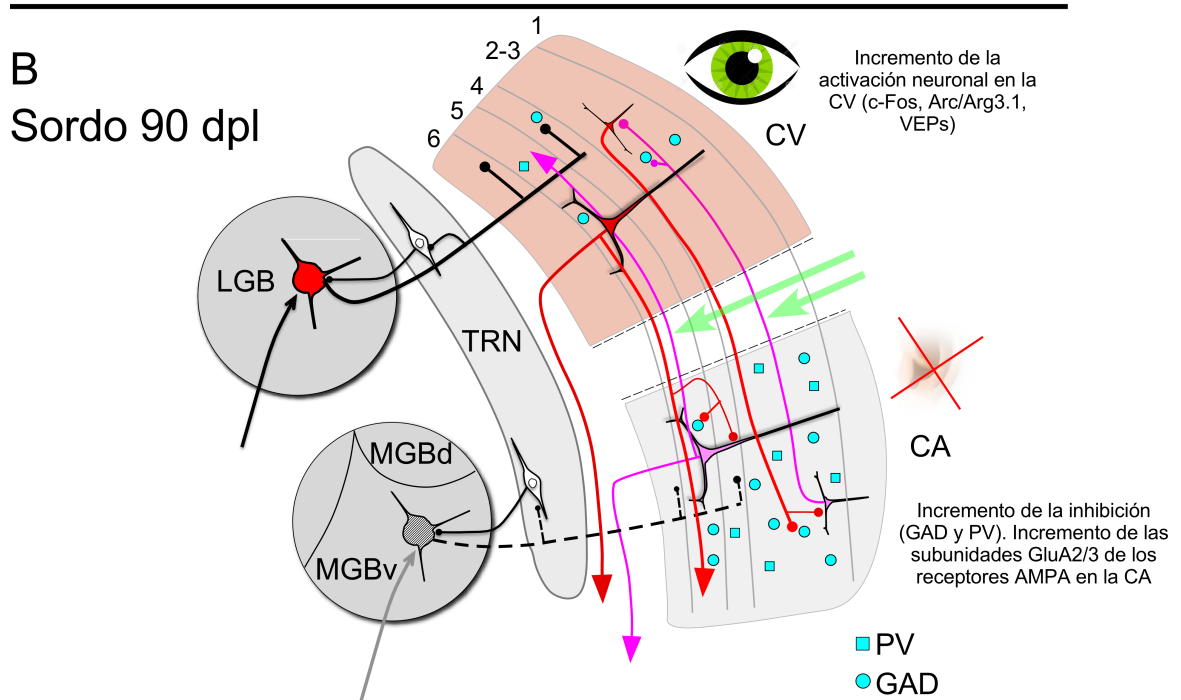
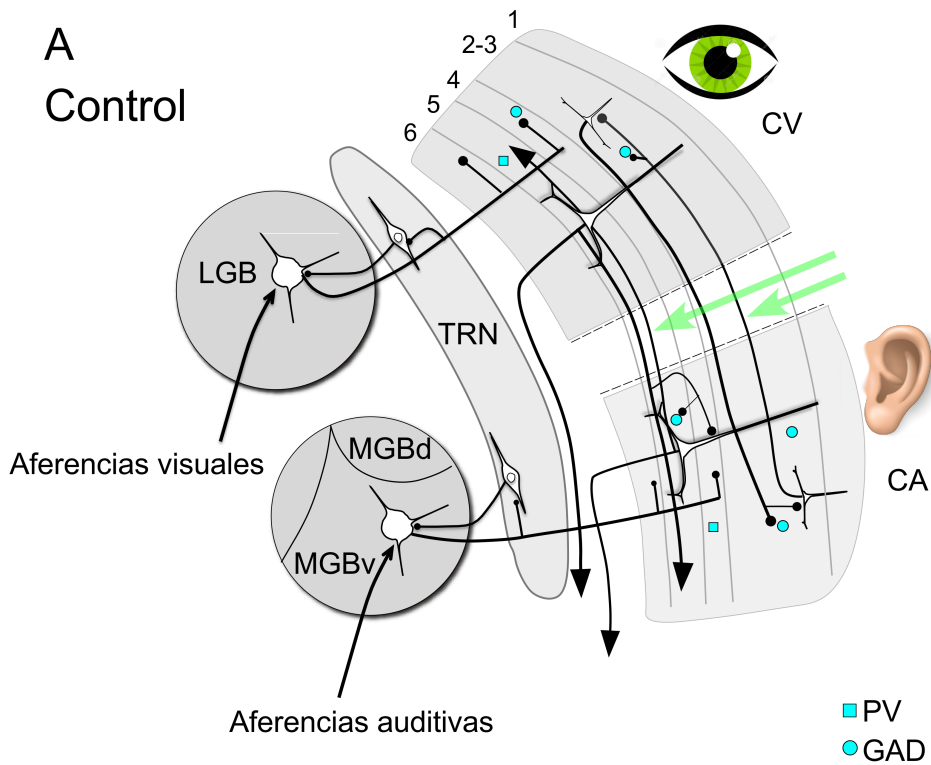
HIPÓTESIS DE TRABAJO

En nuestro modelo de sordera a largo plazo el incremento para GAD y GluA2/3 se observó principalmente en las capas 2/3 y 5 de la CA, las cuales reciben y envían las proyecciones horizontales desde y hacia la CV (Paperna y Malach, 1991; Ibrahim y cols., 2016). El aumento en la inhibición en la CA (representado por aumento de interneuronas – círculos y cuadrados azules en Fig. 19B), así como el incremento de las subunidades GluA2/3 (neuronas fucsia en la CA Fig. 19B), supone que la reacción intermodal observada en nuestro modelo está inducida por las conexiones horizontales (líneas de interconexión en las capas 2/3 y 5 Fig. 19B señaladas por flechas verdes). Ibrahim y cols. (2016) demostraron que la estimulación por optogenética de la CA produce *EPSCs* en las interneuronas inhibitorias PV positivas de la CV, lo que sugiere un efecto depresor de la CA sobre la CV. Una mayor inhibición sobre las neuronas piramidales de la CA que proyectan hacia la CV induce un incremento en la actividad de las redes neuronales de la CV (representado por fondo rojo y neuronas rellenas en rojo en la Fig. 19B). No obstante, el incremento en la activación de la CV (c-Fos, Arc/Arg3.1 y VEPs) también puede deberse a un cambio en la activación tálamo-cortical visual en nuestro modelo (representado por neurona rellena en rojo en el LGB – Fig. 19B).

Petrus y cols. (2014) demostraron mediante la estimulación optogenética del tálamo visual (LGB) de ratas sordas, que las neuronas de la capa 4 de la CV1 presentan un incremento en la amplitud de las *EPSCs*. El incremento que observamos en la inmunorreactividad para GAD en la CV1 podría interpretarse como un efecto reactivo a cambios en la activación y en consecuencia apoya una potencial sobreactivación del eje tálamo-cortical visual.

A pesar de que nuestros datos apoyan una fuerte reacción intermodal generada por las conexiones cortico-corticales, cambios plásticos subcorticales que pueden desencadenar una variación en los motores visuales talámicos no deben descartarse.

Para establecer una relación causal entre una potencial alteración de las aferencias talámicas y/o cortico-corticales y la reacción intermodal entre la CA y la CV, será necesario realizar en el futuro registros electrofisiológicos pareados entre el tálamo y la CV, el tálamo y la CA, y entre la CA y la CV.



CA: corteza auditiva. CV: corteza visual. MGB: cuerpo geniculado medial. MGBd: región dorsal del cuerpo geniculado medial. MGBv: región ventral del cuerpo geniculado medial. LGB: cuerpo geniculado lateral. TRN: núcleo reticular talámico.

Figura 19. Esquema explicativo de la hipótesis de trabajo sobre la reacción intermodal en las cortezas auditiva y visual en nuestro modelo de sordera a largo plazo.

A. Esquema representativo de las cortezas auditiva y visual, del tálamo auditivo y visual, de las conexiones tálamo-corticales y de las conexiones cortico-corticales en un animal control.

CA – corteza auditiva

CV – corteza visual

Capas de la corteza – números del 1 al 6

Líneas negras que atraviesan la corteza en ambas direcciones y acaban en puntos negros y puntas de flecha negras - Conexiones horizontales cortico-corticales (señaladas por flechas verdes)

Círculos y cuadrados azules - neuronas inhibitorias

Círculo gris MGB - Tálamo auditivo

Subdivisiones del MGB - MGBd: cuerpo geniculado medial dorsal, MGBv: cuerpo geniculado medial ventral

Círculo gris LGB – Tálamo visual

TRN – núcleo reticular talámico

Líneas negras que salen de los círculos grises (MGB y LGB) y acaban en puntos negros en la corteza - Conexiones tálamo-corticales

B. Hipótesis sobre los efectos en la reacción intermodal a los 90 días post lesión (dpl).

Área de la CV representada en color rojo – incremento de activación.

Neuronas rellenas en rojo y líneas rojas en la CV – sobreactivación neuronal.

Neuronas y líneas fucsias en la CA – incremento de las subunidades GluA2/3.

Círculos y cuadrados azules en la CA – aumento en interneuronas inhibitorias.

Neurona rellena en rojo en LGB – Potencial aumento de las proyecciones talámicas visuales.

BIBLIOGRAFÍA

Allman BL, Keniston LP, Meredith MA (2009) Adult deafness induces somatosensory conversion of ferret auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci* 106:5925–5930. doi: 10.1073/pnas.0809483106

Arckens L, Van Der Gucht E, Eysel UT, Orban GA, Vandesande F (2000). Investigation of cortical reorganization in area 17 and nine extrastriate visual areas through the detection of changes in immediate early gene expression as induced by retinal lesions. *J Comp Neurol* 425(4):531-44. doi: 10.1002/1096-9861(20001002)

Atallah BV, Bruns W, Carandini M, Scanziani M (2012) Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron* 73:159–170. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.013

Bardera A, Boada I, Feixas M, Sbert M (2009) Image segmentation using excess entropy. *J Signal Process Syst* 54:205–214. doi: 10.1007/s11265-008-0194-6

Bartel DP, Sheng M, Lau LF, Greenberg ME (1989) Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev* 3:304–313. doi: 10.1101/gad.3.3.304

Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The immediate early gene *Arc/Arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28:11760–11767. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008

Bucurenciu I, Kulik A, Schwaller B, et al (2008) Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and Ca²⁺ sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron* 57:536–545. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.026

Bullitt E (1990). Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296:517-530. doi: 10.1002/cne.902960402

Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189–198. doi: 10.1016/0896-6273(92)90120-3

Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N (2005) Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol* 5:1–13. doi: 10.1186/1472-6750-5-31

Byers CE, Barylko B, Ross J, Southworth DR, James NG, Taylor IV CA, Wang L, Collins KA, Estrada A, Waung M, Tassin TC, Huber KM, Jameson DM, Albansi JP. 2015. Enhancement of dynamin polymerization and GTPase activity by Arc/Arg3.1. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1850:1310-1318. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.03.002

Campbell J, Sharma A (2014) Cross-modal re-organization in adults with early stage hearing loss. *PLoS One* 9:e90594. doi: 10.1371/journal.pone.0090594

Campi KL, Bales KL, Grunewald R, Krubitzer L (2010). Connections of auditory and visual cortex in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*): evidence for multisensory processing in primary sensory areas. *Cereb Cortex* 20(1):89-108. doi: 10.1093/cercor/bhp082

Celio MR (1986) Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231:995-997. doi: 10.1126/science.3945815

Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475. doi: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90091-H](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-H)

Chard PS, Bleakman D, Christakos S, et al (1993) Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J Physiol* 472:341–357. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019950

Chen X, Shen J, Wang Y, Chen X, Yu S, Shi H, Huo K (2015). Up-Regulation of c-Fos associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol* 35:363-376. doi: 10.1007/s10571-014-0132-z

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54:541-52. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90076-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90076-1)

Chowdhury S, Shepherd J, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52:445-459. doi: 10.1016/j.neuron.2006.08.033

Clarkson C, Juárez JM, Merchán 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. doi: 10.3389/fnana.2010.00141

Creel D, Dustman RE, Beck EC (1974) Intensity of flash illumination and the visually evoked potential of rats, guinea pigs and rats. *Vision Res* 14:725-729. doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(74\)90070-4](https://doi.org/10.1016/0042-6989(74)90070-4)

Curran T, Morgan J, (1995) Fos: An immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol* 26: 403-412. doi: 10.1002/neu.480260312

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8:101-113. doi: 10.1038/nrn2055

Desgent S, Boire D, Ptito M (2010) Altered expression of parvalbumin and calbindin in interneurons within the primary visual cortex of neonatal enucleated hamsters. *Neuroscience* 171:1326–1340. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.016

Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, et al (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 14:1834–55. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01834.1994>

Esclapez M, Houser CR (1999). Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*. 412(3):488-505. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990927)

Firzlauff U, Schuller G (2001) Motion processing in the auditory cortex of the rufous horseshoe bat: role of GABAergic inhibition. *Eur J Neurosci* 14:1687-1701. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01797.x>

Fleige S, Walf V, Huch S, et al (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28:1601–1613. doi: 10.1007/s10529-006-9127-2

Fujimoto T, Tanaka H, Kumamaru E, Okamura K, Miki N (2004). Arc interacts with microtubules/microtubule-associated protein 2 and attenuates microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the dendrites. *J Neurosci Res* 76(1):51-63. doi: 10.1002/jnr.20056

Friedman LM, Dror AA, Avraham KB (2007). Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Vev Biol* 51(6-7):609-31. doi:10.1387/ijdb.072365lf

Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15(1):193-204. doi: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90076-4)

Goel A, Jiang B, Xu LW, et al (2006) Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nat Neurosci* 9:1001–1003. doi: 10.1038/nn1725

Gold JR, Bajo VM (2014). Insult-induced adaptive plasticity of the auditory system. *Front Neurosci* 8:110. doi: 10.3389/fnins.2014.00110

Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234:80–83. doi: 10.1126/science.3749894

Gull SF, Skilling J (1984) Maximum entropy method in image processing. *IEE Proc F Commun Radar Signal Process* 131:646-659. doi: 10.1049/ip-f-1.1984.0099

Hannan S, Wilkins ME, Dehghani-Tafti E, et al (2011) γ -aminobutyric acid type B (GABAB) receptor internalization is regulated by the R2 subunit. *J Biol Chem* 286:24324–24335. doi: 10.1074/jbc.M111.220814

Hauthal N, Thorne JD, Debener S, Sandmann P (2013). Source localisation of visual evoked potentials in congenitally deaf individuals. *Brain Topogr* 27:412-24. doi: 10.1007/s10548-013-0341-7

He HY, Rasmusson DD, Quinlan EM (2004) Progressive elevations in AMPA and GABAA receptor levels in deafferented somatosensory cortex. *J Neurochem* 90:1186–1193. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02590.x

Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, et al (1984) Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc Natl Acad Sci* 81:6526–6530. doi: 10.1073/pnas.81.20.6526

Henschke JU, Noesselt T, Scheich H, Budinger E (2014). Possible anatomical pathways for short-latency multisensory integration processes in primary sensory cortices. *Brain Struct Funct* 220(2):955-77. doi: 10.1007/s00429-013-0694-4

Hollmann M¹, Hartley M, Heinemann S (1991). Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252(5007):851-3. doi: 10.1126/science.1709304

Ibrahim LA, Mesik L, Ji X ying, et al (2016) Cross-modality sharpening of visual cortical processing through layer-1-mediated inhibition and disinhibition. *Neuron* 89:1031–1045. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.027

Lurilli G, Ghezzi D, Olcese U, et al (2012) Sound-driven synaptic inhibition in primary visual cortex. *Neuron* 73:814–828. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.026

Joo JY, Schaukowitch K, Farbiak L, et al (2015) Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nat Neurosci* 19:75–83. doi: 10.1038/nn.4170

Juiz J M, Rueda J, Merchán JA, Sala ML. 1989. The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear Res* 40, 65–74. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(89\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0378-5955(89)90100-7)

Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC. 2004. Activity dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 7:244-253. doi: 10.1038/nn1189

Kawaguchi Y (1993) Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 69:416–431. doi: 10.1152/jn.1993.69.2.416

Kawaguchi Y, Kubota Y (1993) Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 70:387–396. doi: 10.1152/jn.1993.70.1.387

Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476–486. doi: 10.1093/cercor/7.6.476

Keck T, Keller GB, Jacobsen RI, Eysel UT, Bonhoeffer T, Hübener M (2013). Synaptic scaling and homeostatic plasticity in the mouse visual cortex in vivo. *Neuron* 0(2):327-34. doi: 10.1016/j.neuron.2013.08.018

Kharazia VN, Weinberg RJ (1994). Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. *J Neurosci* 14: 6021-6032. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-10-06021>

Kiang NYS (1965). *Discharge patterns of single fibers in the cat's auditory nerve* (No. STR-13). MASSACHUSETTS INST OF TECH CAMBRIDGE RESEARCH LAB OF ELECTRONICS.

Kittler JT, Chen G, Honing S, et al (2005) Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory

synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci* 102:14871–14876. doi: 10.1073/pnas.0506653102

Kondo M, Sumino R, Okado H (1997). Combinations of AMPA receptor subunit expression in individual cortical neurons correlate with expression of specific calcium-binding proteins. *J Neurosci* 17(5):1570-81. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-05-01570.1997>

Kotak VC, Fujisawa S, Lee FA, et al (2005) Hearing loss raises excitability in the auditory cortex. *J Neurosci* 25:3908–18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5169-04.2005

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:e73585. doi: 10.1371/journal.pone.0073585

Lee S, Hjerling-Leffler J, Zaghera E, et al (2010) The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30:16796–808. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1869-10.2010

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta T}$ method. *Methods* 25: 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, et al (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433–445. doi: 10.1016/0896-6273(95)90299-6

Maier PJ, Marin I, Grampp T, et al (2010) Sustained glutamate receptor activation down-regulates GABAB receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation. *J Biol Chem* 285:35606–35614. doi: 10.1074/jbc.M110.142406

Martinez-Galan JR, Caminos E, Vale C, Juiz JM (2007). Auditory nerve input is not an absolute requirement for the expression, distribution and calcium permeability of AMPA receptors in the adult rat ventral cochlear nucleus. *Brain Res* 1138:21-9. doi: 10.1016/j.brainres.2006.12.015

Massé IO, Ross S, Bronchti G, Boire D (2017). Asymmetric Direct Reciprocal Connections Between Primary Visual and Somatosensory Cortices of the Mouse. *Cereb Cortex* 7(9):4361-4378. doi: 10.1093/cercor/bhw239

- Morgan JI, Curran T (1988) Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. *Cell Calcium* 9:303–311. doi: 10.1016/0143-4160(88)90011-5
- Morril RJ, Hasenstaub AR (2018). Visual Information Present in Infragranular Layers of Mouse Auditory Cortex. *J Neurosci* 38: 2854-2862. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3102-17.2018
- Murata K, Cramer H, Bach-y-Rita P (1965). Neuronal convergence of noxious, acoustic, and visual stimuli in the visual cortex of the cat. *J Neurophysiol* 28:1223-39. doi: 10.1152/jn.1965.28.6.1223
- Nelson SB, Turrigiano GG (2008). Strength through diversity. *Neuron* 60(3):477-82. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.020
- Neville HJ, Schmidt A, Kutas M (1983) Altered visual-evoked potentials in congenitally deaf adults. *Brain Res* 266:127–132. doi: 10.1016/0006-8993(83)91314-8
- Otsuka T, Kawaguchi Y (2009) Cortical inhibitory cell types differentially form intralaminar and interlaminar subnetworks with excitatory neurons. *J Neurosci* 29:10533–10540. doi: 10.1523/jneurosci.2219-09.2009
- Paperna T, Malach R (1991) Patterns of sensory intermodality relationships in the cerebral cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:432–456. doi: 10.1002/cne.903080310
- Paxinos G (2004) *The rat nervous system*. Sydney, Australia
- Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, USA
- Pérez-Otaño I, Ehlers MD (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28:229–238. doi: 10.1016/j.tins.2005.03.004
- Pernia M, Estevez S, Poveda C, et al (2017) c-Fos and Arc/Arg3.1 expression in auditory and visual cortices after hearing loss: Evidence of sensory crossmodal reorganization in adult rats. *J Comp Neurol* 525:2677–2689. doi: 10.1002/cne.24233
- Peters A, Proskauer CC, Ribak CE (1982) Chandelier cells in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 206:397–416. doi: 10.1002/cne.902060408
- Petrus E, Isaiah A, Jones AP, et al (2014) Crossmodal induction of thalamocortical potentiation leads to enhanced information processing in the auditory cortex. *Neuron* 81:664–673. doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.023

Popelář J, Syka J, Berndt H (1987) Effect of noise on auditory evoked responses in awake guinea pigs. *Hear Res* 26:239–247. doi: 10.1016/0378-5955(87)90060-8

Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC. 1996. Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol* 16:211–218. doi: 10.1128/mcb.16.1.211

Qiu CX, Salvi R, Ding D, Burkard R (2000) Inner hair cell loss leads to enhanced response amplitudes in auditory cortex of unanesthetized chinchillas: Evidence for increased system gain. *Hear Res* 139:153–171. doi: 10.1016/S0378-5955(99)00171-9

Rannals MD, Kapur J (2011) Homeostatic strengthening of inhibitory synapses is mediated by the accumulation of GABAA receptors. *J Neurosci* 31:17701–17712. doi: 10.1523/jneurosci.4476-11.2011

Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PFF, et al (2006) Increased expression of the immediate-early gene *Arc/Arg3.1* reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron* 52:461–474. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.031

Ribak CE (1978) Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol* 7:461–478. doi: 10.1007/BF01173991

Roberts E, Frankel S (1950) γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187:55-63. doi: <http://www.jbc.org/content/187/1/55.citation>

Rudy B, Fishell G, Lee SH, Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71:45–61. doi: 10.1002/dneu.20853

Rueda J, Sen C, Juiz J, Merchán JA. 1987. Neuronal loss in the spiral ganglion of young rats. *Acta Otolaryngol* 104:417-421. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/00016488709128269>

Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328-31. doi: 10.1126/science.3131879

Sarro EC, Kotak VC, Sanes DH, Aoki C (2008). Hearing loss alters the subcellular distribution of presynaptic GAD and postsynaptic GABAA receptors in the auditory cortex. *Cereb Cortex* 18(12):2855-67. doi: 10.1093/cercor/bhn044.

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73

Schormans AL, Typlt M, Allman BL (2017) Crossmodal plasticity in auditory, visual and multisensory cortical areas following noise-induced hearing loss in adulthood. *Hear Res* 343:92–107. doi: 10.1016/j.heares.2016.06.017

Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571–582. doi: 10.1016/0896-6273(90)90115-V

Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006). *Arc/Arg3.1* mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52(3):475-84. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.034

Song I, Huganir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trend Neurosci* 25:578-588. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02270-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02270-1)

Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG *Arc* to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751. doi: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80591-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80591-7)

Steward O, Farris S, Pirbhoy PS, et al (2015) Localization and local translation of *Arc/Arg3.1* mRNA at synapses: some observations and paradoxes. *Front Mol Neurosci* 7:1–15. doi: 10.3389/fnmol.2014.00101

Tamás G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol* 500:715–738. doi: 10.1113/jphysiol.1997.sp022054

Tan J, Rüttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, Schulze H, Kilian SB, Hadjab S, Zimmermann U, Köpschall I, Rohbock K, Knipper M (2007). Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and *Arg3.1/arc* in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience*. 145(2):715-26. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.11.067

Tanaka H, Grooms SY, Bennett MVL, Zukin RS (2000) The AMPAR subunit GluR2: Still front and center-stage. *Brain Res* 886:190–207. doi: 10.1016/S0006-8993(00)02951-6

Teichert M, Liebmann L, Hübner CA, Bolz J (2017). Homeostatic plasticity and synaptic scaling in the adult mouse auditory cortex. *Sci Rep* 7(1):17423. doi: 10.1038/s41598-017-17711-5.

Teichert M, Bolz J (2017). Simultaneous intrinsic signal imaging of auditory and visual cortex reveals profound effects of acute hearing loss on visual processing. *Neuroimage* 159:459-472. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.07.037

Tremere L, Hicks TP, Rasmusson DD (2001) Expansion of receptive fields in raccoon somatosensory cortex in vivo by GABA A receptor antagonism: implications for cortical reorganization. *Exp Brain Res* 136:447–455. doi: 10.1007/s002210000612

Tropea D, Kreiman G, Lyckman A, et al (2006) Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* 9:660–668. doi: 10.1038/nn1689

Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, et al (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-896. doi: 10.1038/36103

Turrigiano G (2012). Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(1): a005736. doi: 10.1101/cshperspect.a005736

Vogler DP, Robertson D, Mulders WH (2011). Hyperactivity in the ventral cochlear nucleus after cochlear trauma. *J Neurosci* 31(18):6639-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6538-10.2011.


Wall MJ, Corrêa SAL (2018) The mechanistic link between Arc/Arg3.1 expression and AMPA receptor endocytosis. *Semin Cell Dev Biol* 77:17–24. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.005

Welker E, Soriano E, Van der Loos H (1989). Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: effects of peripheral deprivation on GAD-immunoreactivity. *Exp Brain Res* 74(3):441-52.

APÉNDICE

(trabajos originales)

c-Fos and Arc/Arg3.1 expression in auditory and visual cortices after hearing loss: Evidence of sensory crossmodal reorganization in adult rats

M. Pernia¹ | S. Estevez¹ | C. Poveda² | I. Plaza¹ | J. Carro¹ | J.M. Juiz² |
M. A. Merchan¹ 

¹Laboratory of Neurobiology of Hearing, Institute of Neurosciences of Castilla y León (Instituto de Neurociencias de Castilla y León – INCYL), University of Salamanca (Universidad de Salamanca – US), Salamanca, Spain

²School of Medicine of Albacete, Institute for Research in Neurological Disabilities (Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas – IDINE), University of Castilla-La Mancha (Universidad de Castilla La Mancha – UCLM), Albacete, Spain

Correspondence

M. A. Merchan, Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Instituto de Neurociencias de Castilla y León. C. Pintor Fernando Gallego 1; 37007 Salamanca, Spain
Email: merchan@usal.es

Funding information

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. Grant numbers: SAF2016-78898-C1 and 2.

Abstract

Cross-modal reorganization in the auditory and visual cortices has been reported after hearing and visual deficits mostly during the developmental period, possibly underlying sensory compensation mechanisms. However, there are very few data on the existence or nature and timeline of such reorganization events during sensory deficits in adulthood. In this study, we assessed long-term changes in activity-dependent immediate early genes c-Fos and Arc/Arg3.1 in auditory and neighboring visual cortical areas after bilateral deafness in young adult rats. Specifically, we analyzed qualitatively and quantitatively c-Fos and Arc/Arg3.1 immunoreactivity at 15 and 90 days after cochlea removal. We report extensive, global loss of c-Fos and Arc/Arg3.1 immunoreactive neurons in the auditory cortex 15 days after permanent auditory deprivation in adult rats, which is partly reversed 90 days after deafness. Simultaneously, the number and labeling intensity of c-Fos- and Arc/Arg3.1-immunoreactive neurons progressively increase in neighboring visual cortical areas from 2 weeks after deafness and these changes stabilize three months after inducing the cochlear lesion. These findings support plastic, compensatory, long-term changes in activity in the auditory and visual cortices after auditory deprivation in the adult rats. Further studies may clarify whether those changes result in perceptual potentiation of visual drives on auditory regions of the adult cortex.

KEYWORDS

Arc/Arg3.1, RRID: AB_887694, auditory pathway, c-Fos, RRID: AB_2106755, deafness, plasticity

1 | INTRODUCTION

Reorganization of sensory cortical areas after deprivation is a key component of plastic mechanisms underlying adaptations to the loss of sensory input. Plastic reorganization of auditory and visual cortices after auditory or visual loss has been extensively studied during post-natal development (Barone, Lacassagne, & Kral, 2013; Bavelier & Neville, 2002; King, 2015; Kral, 2002; Kral et al., 2003; Kral & Eggermont, 2007; Lomber, Meredith, & Kral, 2010; Meredith et al., 2011; Merzenich, 2000). However, cross-modal reorganization after deafness in adults has been relatively overlooked (Barone et al., 2013;

Meredith et al., 2011; Allman, Keniston, & Meredith, 2009; Kok, Chabot, & Lomber, 2014), thereby limiting the understanding of functional recovery from or adaptation to deafness, once the developmental window of intervention is closed.

Sensory deprivation induces changes in the activity of mature cortical neurons (Bavelier & Neville 2002; Allman et al., 2009; Petrus et al., 2014). Also intermodal somatosensory conversion of the receptive field of neurons of the auditory cortex (AC) in the adult ferret has been shown by single-unit recordings after deafness (Bizley, Nodal, Bajo, Nelken, & King, 2007; Allman et al., 2009; Meredith & Allman, 2015). However, electrophysiological recordings provide limited information on spatial

domains. This may be partly overcome by anatomical mapping, specifically using neuronal activity markers. This immunolabeling method is suitable for a more global, spatial analysis of possible changes in neuronal activity patterns among cytoarchitectural areas of the cerebral cortex.

c-Fos is a powerful neuronal functional marker previously used by us to analyze time-dependent changes in activity in the inferior colliculus after ablation of the AC (Clarkson, Juíz, & Merchán, 2010). The immediate early gene *Arc/Arg3.1* is a key molecular tool for cortical plastic adaptations, which is involved in the turnover of fast excitatory AMPA glutamate receptor subunits, among other functions (Bramham, Worley, Moore, & Guzowski, 2008; Byers et al., 2015; Chowdhury et al., 2006; Derkach et al., 2007; Ju et al., 2004). Thus, after performing an immunocytochemical analysis of the activity-dependent immediate early genes c-Fos and *Arc/Arg3.1*, we suggest that spatiotemporal changes in the expression of their protein products in adult rat cortical neurons predict novel, long-term cellular mechanisms of cross-modal adaptation to deafness.

2 | MATERIALS AND METHODS

This study was conducted according to Spanish (Royal Decree 53/2013 - Law 32/2007) and European Union (Directive 2010/63/EU) guidelines for the care and use of laboratory animals. Protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Salamanca (Permit Number: 2012-265). Surgeries were performed under monitored anesthesia, and all available measures were taken to minimize suffering.

Young, 3-month-old male Wistar rats, weighing 250–300 g were used. After bilateral cochlear lesions (see below), the brains from two groups of animals euthanized at 15 ($n = 9$) and 90 ($n = 7$) days after the lesion (days postlesion, dpl) were analyzed as described in detail below. Controls were brains from normal age-matched rats ($n = 16$) processed in parallel with the lesioned animal groups.

2.1 | Cochlear lesions

Deep anesthesia was induced with intramuscular injections of ketamine chlorhydrate (30 mg/kg b.w.) and 5 mg/kg xylazine chlorhydrate (5mg/kg b.w.). Bilateral lesions were performed in the cochlea by puncturing the apex with a needle (gauge 20 g), after the middle ear ossicles were removed.

2.2 | Auditory evoked potential recordings

Auditory brainstem recordings (ABRs) were obtained from lesioned and control animals to show the effectiveness of cochlear puncture in inducing complete hearing loss.

ABRs were recorded from control animals and experimental animals right before surgery, after surgery and at the end of each experiment, immediately before euthanasia. Briefly, animals were anesthetized and placed in a stereotaxic frame using two hollow methacrylate ear bars. Closed-field recordings were obtained with a Tucker-Davis Technologies [TDT], System 3, (Alachua, FL, USA) following the protocol previously used in our laboratory and summarized below (see Lamas, Alvarado, Carro, & Merchán, 2013 for further information on ABRs and their analysis).

TABLE 1 Spiral ganglion neuron counts from the cochlea of the three experimental animal groups (ANOVA one way)

Experimental group	Mean of number of SGN	SD	Mean size of SGN (μm^2)	SD
Control	18,272	2950.2	139	19.2
15 dpl	15,071	2860.3	132	25.9
90 dpl	4,958 ^a	1423.8	104 ^a	1.7

^a $p < .001$

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-ms window with 1-ms pre-stimulus period and a 0.1-ms alternating polarity click at a repetition rate of 11 bursts/s, delivered in 10 dB ascending steps from 10 to 90 dB SPL. The stimuli were delivered using a magnetic speaker through tubal earphones inserted into the external auditory canal through the methacrylate bar. A 24-cm long tube resulted in a 0.75-ms air conduction time for stimulus arrival at the tympanic membrane. This delay was added to the 1 ms pre-stimulus period to calculate the onset of the ABR (1.7 ms). Responses were averaged 1,000 times. Evoked potentials were amplified and digitized using a Medusa RA16PA preamplifier and RA4LI headstage. The final signal was filtered with a 10 Hz high-pass filter and a 3 kHz low-pass filter.

2.3 | Fixation

Animals were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of 6% sodium pentobarbitone (60 mg/kg b.w.) and perfused transcardially with 4% p-formaldehyde in phosphate buffer (PB). Each experimental animal was processed simultaneously with a control.

2.4 | Spiral ganglion neuron counts

The number and size of spiral ganglion neurons (SGNs) were measured in histological sections through Rosenthal's canal to assess SGN degeneration after cochlear lesion.

The cochleae were dissected out and immersed in 5.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in 1% p-formaldehyde for 15 days at 4°C for decalcification. After cryoprotection for 48 hr in 30% sucrose, in 0.1 M PB, the cochleae were embedded in 10% gelatin + 15% sucrose. Serial, para-modiolar, 30- μm -thick frozen sections were prepared and stained with thionine.

Assembled digital images (mosaics) were captured from serial sections. Nissl stained SGN profiles were segmented by thresholding (see below), their areas were measured and their numbers counted using NIH Image J 1.48v (USA; RRID: SCR_003070) image analysis software. The numbers obtained by segmentation were corrected using the Abercrombie method to avoid double counting (Abercrombie, 1946; Guillery & Herrup, 1997). The estimated total number of SGNs (Table 1) largely coincides with those previously reported in adult Wistar rats (Rueda, Sen, Juíz, & Merchán, 1987; Juíz, Rueda, Merchán, & Sala, 1989).

TABLE 2 Summarised description of antibodies used

Antigen	Immunogen	Description	Dilution used
c-Fos	Synthetic peptide (SGFNADYEASSRC) corresponding to amino acids 4–17 of human c-Fos	Polyclonal Rabbit, Calbiochem Ab-5; RRID:AB_2106755	1:7,500 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0.3%
Arc/Arg3.1	Strep-Tag [®] fusion protein of full-length mouse ARC. Enriched synaptosome fraction of rat brain(P2)	Polyclonal Rabbit, Synaptic Systems 156003; RRID:AB_887694	1:1,000 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0.3%

2.5 | Immunocytochemistry procedure

After perfusion fixation, as described above, brains were dissected, post-fixed and serially sectioned in the coronal plane at 40 μm with a sliding freezing microtome. Alternate, 40- μm coronal sections were immunostained for c-Fos (RRID:AB_2106755) and Arc/Arg3.1 (RRID:AB_887694). Free-floating sections were washed in 0.1 M PB pH 7.6 and endogenous peroxidase activity was subsequently inhibited by incubation in 10% methanol + 3% H_2O_2 in 0.1 M PB for 10 min. Sections were washed in PB and 0.05 M Tris-buffered saline, pH 8.0 + Triton X-100, 0.5% (T9284 Sigma, St. Louis, MO, USA; TBS-Tx). Sections were then incubated in primary antisera (Table 2), for 48 hr at 4°C. Nonspecific labeling was blocked using fetal calf serum (10%). After washing three times in TBS-Tx, for 15 min, all sections were incubated with an anti-rabbit biotinylated secondary antibody (biotinylated anti-rabbit IgG H + L, BA-1000; Vector, Burlingame, CA, USA) at 1:200 dilution in TBS-Tx for 120 min at room temperature. Brain sections from animals in each lesioned experimental group were processed simultaneously with its own control to limit confounding differences in gray level measurements caused by immunocytochemical processing.

Sections were then washed with TBS-Tx and incubated for 180 min in avidin/biotin peroxidase (ABC complex, Vectastain Standard ABC kit PK-4000; Vector, Burlingame, CA, USA) and further with TBS-Tx, followed by Tris HCl, pH 8.0. They were then incubated in 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; D-9015; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 0.006% H_2O_2 and 0.4% nickel ammonium sulfate to visualize the peroxidase reaction. One section per case was used as a negative control, by processing without the primary antibody to test the specificity of the immunostaining detection system.

2.6 | Antibody characterization

The specific pattern of cellular labeling for the antibodies used in this article is described below in the results section. Previously published results using the same antibodies match the immunolabeling shown in our material (c-Fos—Tsuneoka et al., 2013; Arc/Arg3.1—Glasper, Kozorovitskiy, Pavlic, & Gould, 2011).

2.7 | Quantitative immunocytochemistry

Assembled panoramic digital photomicrographs in the form of mosaics of the whole brain cortex were captured from five sections per case (IA coordinates: 2.76, 3.12, 3.48, 3.84, 4.20 mm—Paxinos & Watson, 2005) with a 10 \times objective (Leica Plan Apo). Mosaics were taken and

assembled using the "Virtual slice" module of NeuroLucida 8.0 (MBF-Bioscience, Williston, Vermont, USA) and adjusting the microscope illumination source before each image capture by using a stepped density filter ([®]Eo Edmund industrial optics - ref 32599, Karlsruhe, Germany). Final digital resolution of our mosaic images was 19.6 pixels/ μm^2 assessed by counting the number of pixels inside a standard square. This resolution allowed unambiguous quantification and image analysis. Photomicrographs of c-Fos immunostained sections were analyzed with Image J software, using the maximum entropy thresholding segmentation algorithm (Gull & Skilling, 1984; Bardera, Boada, Feixas, & Sbert, 2009). The mean and standard deviation of gray levels were assessed in the total extension of the cortex, in all captured mosaics, to cancel out differences in immunostaining intensities within and among experiments. Cases with average gray levels above or below the total mean gray level \pm the standard deviation were dropped from the analysis.

After segmentation of c-Fos immunopositive neurons, the coordinates, perimeter, and mean immunolabeling intensity values of segmented particles were analyzed. These metrics (coordinates, intensity, and perimeter) were combined to generate graphical representations of sections using MatLab software (The MathWorks, Inc, Natick, MA, USA, RRID: SCR_001622). Details of the procedure may be found in Clarkson et al. (2010). Each dot in our MatLab maps corresponds to one segmented neuron. Differences in dot size express differences in perimeter and the color of the dots encodes the immunostaining intensity of segmented particles. This graphic representation generates highly intuitive maps to assess at a glance changes in c-Fos immunostaining across full panoramic brain sections.

Arc/Arg3.1 labels dendrites and dendritic spines of pyramidal neurons, precluding accurate thresholding segmentation of neuronal somata and morphometric analysis of this immunostained material. Therefore, Arc/Arg3.1 immunostaining was independently evaluated by three experienced observers.

2.8 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the IBM[®] SPSS[®] software, version 20 (IBM Crp. and SPSS Inc., Chicago, IL, USA, RRID: SCR_002865). Quantitative values obtained in each section from every case were averaged for each sensory cortex (ACA and VCA) separately. Differences between groups were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Fisher-PLSD-test and the Bonferroni test. The Pearson product-moment coefficient was used to determine correlations among distribution, labeling intensity and perimeter of

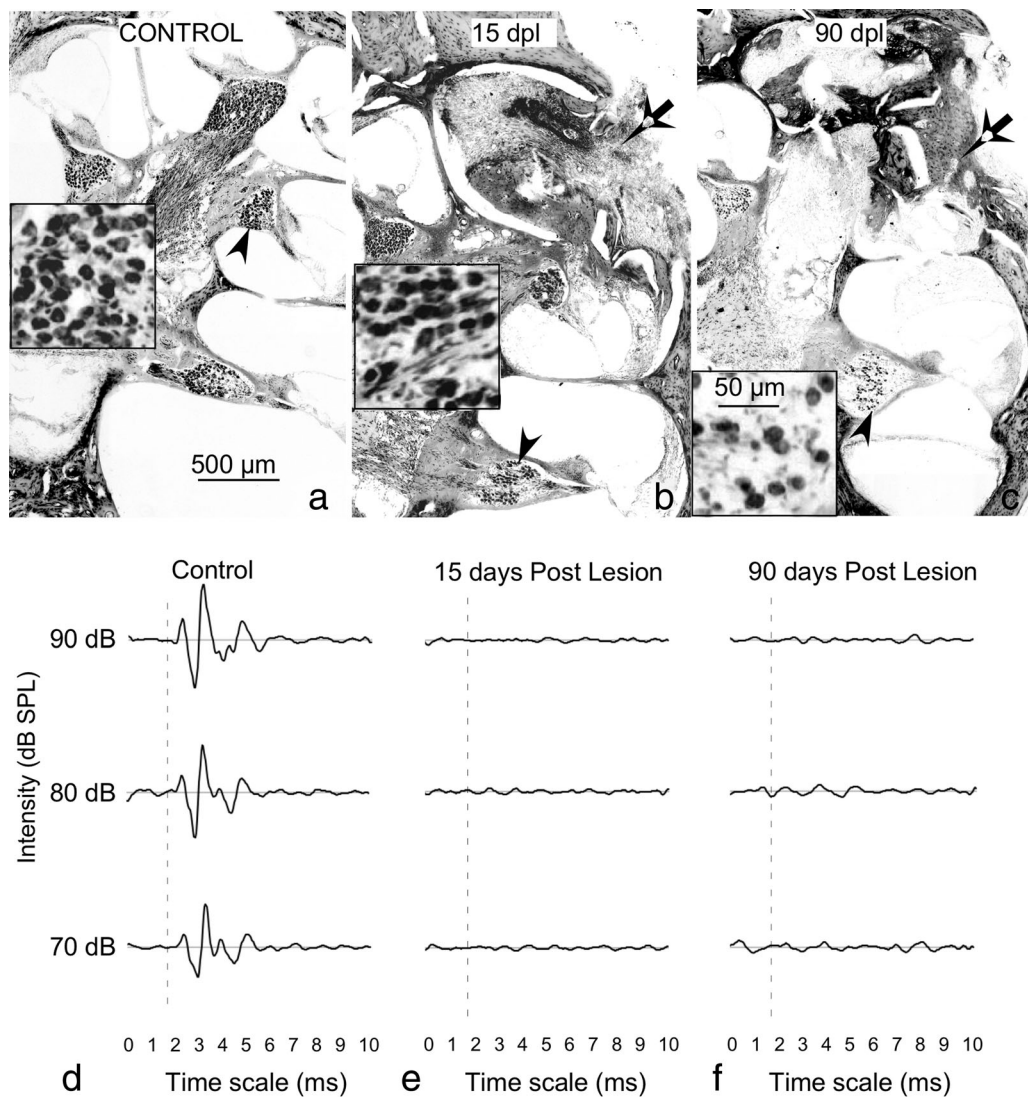


FIGURE 1 Representative Nissl-stained, mid-modiolar cochlear sections from (a) control, (b) 15 dpl and (c) 90 dpl rats after cochlear lesion. Arrows indicate the site of the lesion in the apex of the cochlea. Insets show higher magnifications of spiral ganglion neurons. Arrowheads indicate the region from which insets were taken. (d) Example of ABRs from a control and short- and long-term lesioned animal groups. Control recordings show thresholds, amplitudes and latencies typical of normal Wistar rats. At 15 and 90 dpl, ABRs show no evoked activity

c-Fos immunolabeled neurons at different times after the cochlear lesion. Differences and correlations were considered statistically significant at the $p < .05$ level.

2.9 | Additional technical considerations

The real thickness of sections (sectioned nominally at 40 μm), calculated using NeuroLucida software, MBF 8.1) with a 100× oil immersion objective, was $17.5 \mu\text{m} \pm 3 \mu\text{m}$. As a control for antibody penetration, 1-μm z-stack images were taken from one section per animal group. Immunostained neurons were present throughout the section.

The present study uses the terms ACA and VCA to refer to both primary and secondary auditory and visual cortices, respectively. The ACA and VCA boundaries were defined according to Paxinos and Watson atlas coordinates (Paxinos & Watson, 2005). For convenience, the interposed parietal postero-dorsal and parietal post-rostral subdivisions were included in the VCA. We followed Palomero, Gallagher, and Zilles

guidelines (Paxinos, 2004) to define the ACA and VCA layers at any rostro-caudal level.

3 | RESULTS

3.1 | Auditory deprivation testing: ABRs and SGNs counts

ABRs from lesioned animals showed no evoked activity at any sound intensity, nor at 15 or at 90 dpl. Auditory thresholds, wave amplitudes and latencies in control animals and in recordings made before surgery in the deafened groups were similar to those previously reported by us in normal healthy rats (Lamas et al., 2013).

A loss 72.8% of the neurons in the spiral ganglion, along with a 25.1% decrease in the mean area of the remaining SGNs profiles was observed in the 90 dpl experimental group (Figure 1, Table 1).

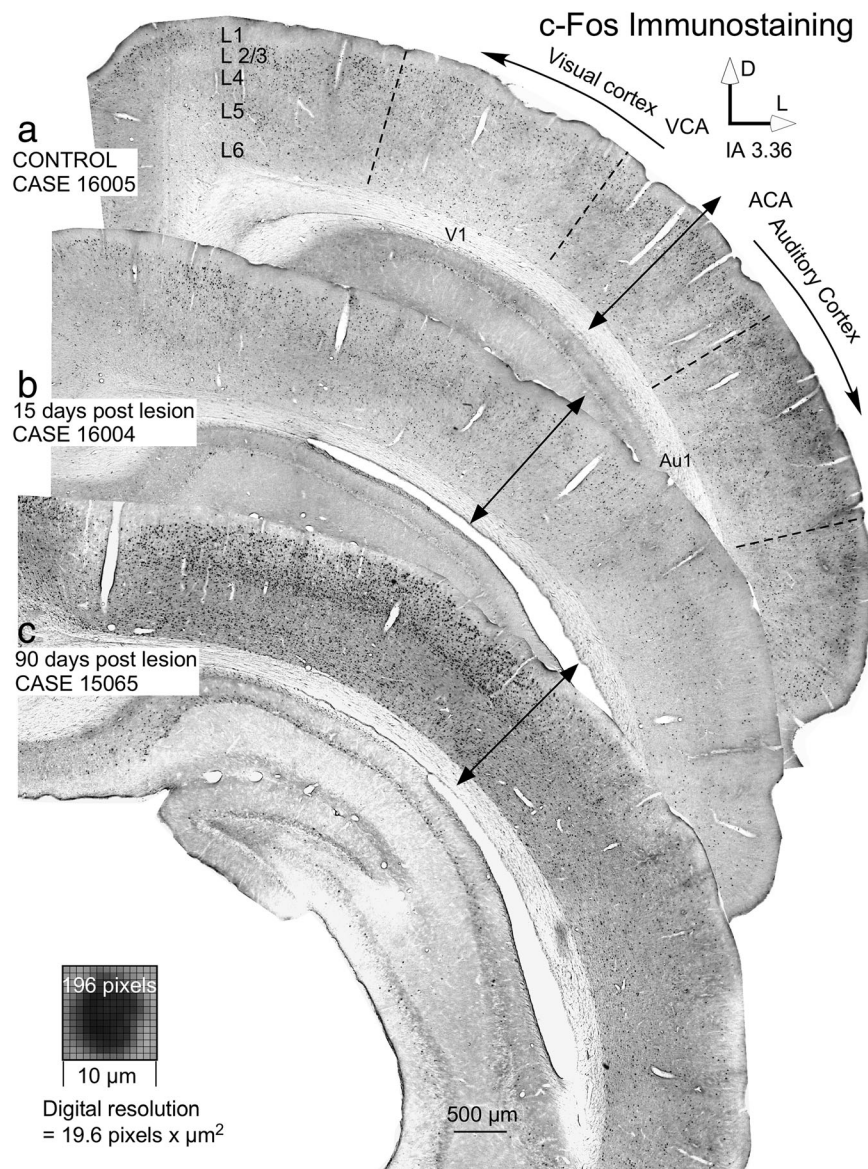


FIGURE 2 Representative c-Fos immunostained coronal sections from (a) control, (b) 15 dpl and (c) 90 dpl animal groups at similar rostro-caudal levels. Dotted lines in (a) represent cytoarchitectural subdivisions. These limits have been drawn by overlapping the images of the 3.36 IA from Paxinos and Watson (2005) on an equivalent rostro-caudal immunostained coronal section. These limits roughly match boundaries defined by changes in labeling intensity and distribution of immunoreactive neurons across layers. The double-headed arrow indicates the border between the auditory cortex area (ACA) and visual cortex area (VCA). Note the decrease in immunoreactivity in ACA in the 15 dpl group (b) and the increase in number and intensity of neurons in the 90 dpl group in the VCA (c - left of the double headed arrow). Digital resolution in pixels/ μm^2 of the mosaics captured is shown in the bottom left of the picture. Abbreviation of cortical subdivisions: V1 = Primary visual cortex. Au1 = Primary auditory cortex. (L1 = Layer 1, L2/3 = Layers 2/3, etc.)

Altogether, these results support permanent long-term deprivation of acoustic input in our experimental animal model.

3.2 | c-Fos immunocytochemistry

The highest concentration of c-Fos-immunolabeled neurons in control animals was found in layers 2/3, 4, and 6, in both the ACA and VCA (Figures 2a and 3a,b). Regional differences in distribution, immunolabeling intensity and perimeter of c-Fos immunolabeled neuronal nuclei represented in our MatLab maps allows to differentiate, at any rostro-

caudal level, the primary and secondary cortices, in both the visual and auditory regions (Figure 4a). Similarly, the boundaries of the ACA and VCA are well defined by differences in immunostaining in layers 2/3 (Figure 4a, double arrow). After overlapping MatLab maps with drawings of sections from the cytoarchitectural atlas at similar interaural levels, changes in the number of immunolabeled neurons and gray level intensities between layers allow defining approximately coincident boundaries of cortex subdivisions (see Paxinos & Watson, 2005), which are represented by dotted lines in Figure 4a. In particular, the dorsal border of ACA was relatively easy to recognize by changes

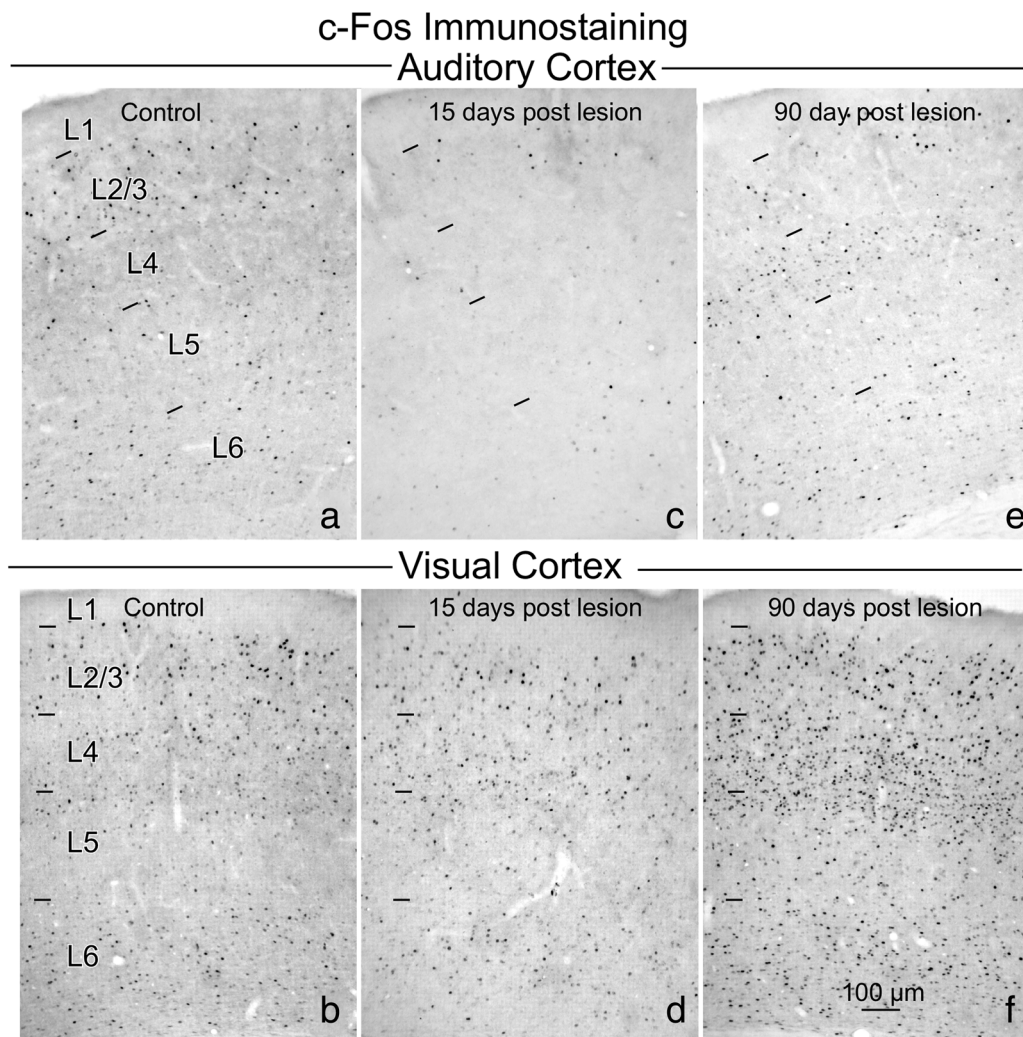


FIGURE 3 High-magnification details of c-Fos immunostaining comparing the intensity and number of immunoreactive neurons between layers of the three experimental groups at similar rostro-caudal levels of the primary auditory (upper part of the panel) and visual (lower part of the panel) cortex. (a, b) Control, (c, d) 15 dpl and (e, f) 90 dpl. Note the loss of immunoreactive neurons in all layers of the auditory cortex at 15 dpl (c) compared with the control (a). The 90 dpl picture shows an increase in immunoreactive neurons, mainly concentrated in layer 4 (e), in contrast to control sections (a). Compared with 15 dpl (d) and control (b) sections, the increase in number and intensity of staining in the visual cortex is evident in all layers at 90 dpl in (f). (L1 = Layer 1, L2/3 = Layers 2/3, among others)

in the intensity of c-Fos immunoreactive neurons in layer 2/3 between the ACA and the VCA (see double arrow in Figure 4a), as previously mentioned.

Microscopic inspection of ACA in the 15 dpl experimental group (Figure 2b) showed fewer c-Fos-immunoreactive neurons in all cortical layers compared with controls (Figure 3a,c). The counts and gray level maps of c-Fos-immunostained neurons confirmed this observation, with fewer immunopositive neurons and loss of visible layering in the ACA (Figure 4b). Neuronal counts clearly showed significantly fewer c-Fos-immunoreactive neurons in the ACA in this post-lesion time group (Figure 5a left). Also, average gray level in neurons was significantly brighter (higher values; Figure 5b left). In the VCA, at 15 dpl no differences from controls were found in the number or gray intensity values of c-Fos immunostained neurons (Figures 2a,b, 5a,b - right).

c-Fos labeling of ACA in sections from the 90 dpl experimental group (Figure 2c) showed a clearly higher number of immunoreactive neurons than that found at 15 dpl (Figures 2b,c, and 4b,c). Labeled neurons were distributed mainly in layers 2/3, 4 and 6 (Figure 3c,e). Actually, the average number of c-Fos immunoreactive neurons in the ACA in the 90 dpl group returned to values closer to the control values, with counts significantly higher than those at 15 dpl (Figure 5a left). Furthermore, the average gray level intensity of immunolabeling in neurons at 90 dpl was darker (lower numerical values) than that at 15 dpl (Figure 5b left).

In contrast to the findings at 15 dpl, a high concentration of c-Fos immunoreactive neurons was found in the VCA at 90 dpl, as shown in both photomicrographs (Figure 2c) of sections and MatLab map representations (Figure 4c). The increase in number and intensity labeling of immunoreactive neurons affects all cortical layers in the VCA, but

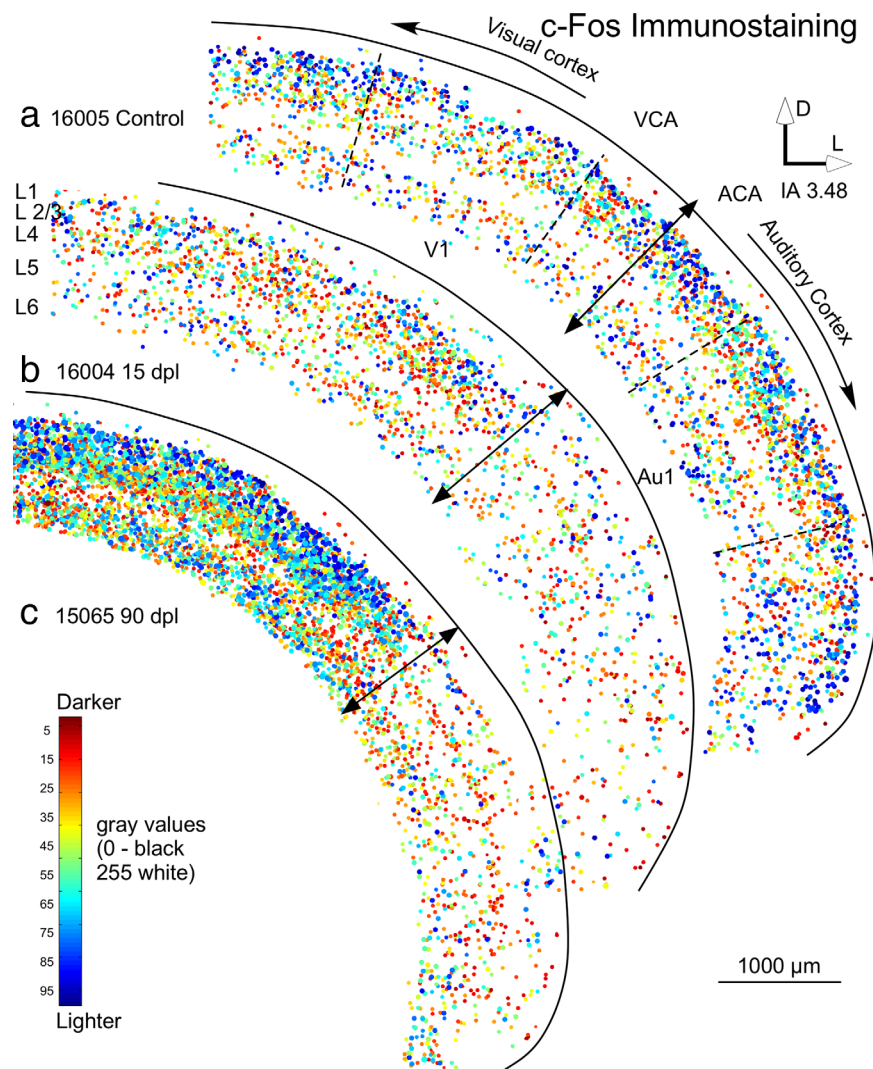


FIGURE 4 Topographic maps built with MatLab, representing gray intensity values of segmented individual c-Fos immunoreactive neurons. Maps from representative coronal c-Fos immunostained sections of (a) control, (b) 15 dpl and (c) 90 dpl groups. In the maps, each dot corresponds to an immunoreactive neuron and its color represents the intensity of the immunoreaction (calibration bar on the bottom left of the figure shows the correspondence of colors with gray intensity values). The size of the dots encodes the perimeter of the immunoreactive nuclei. The maps clearly show an increase in all measures (number, labeling intensity and perimeter) of immunoreactive neurons in VCA at 90 dpl (c) compared with the control and 15 dpl (a, b). The ACA shows a lower number of immunolabeled neurons at 15 dpl (compare a with b), which partially recovers in the 90 dpl group (Compare b with c). Abbreviation of cortical subdivisions: V1 = Primary visual cortex. Au1 = Primary auditory cortex

preferentially layers 4 and 6 (compare control in Figure 3b with 90 dpl Figure 3f). The average number of immunoreactive neurons in the VCA exceeded by 3-fold the mean at 15 dpl and in control animal groups (Figure 5a right). Furthermore, significantly darker gray intensities (lower mean numerical values) were found when comparing the 90 dpl group with controls (Figure 5b right). Accordingly, neurons represented by colored dots in MatLab maps showed differences in red and yellow (more intense staining) when compared to 90 dpl sections with 15 dpl and control sections (Figure 4—compare c with a or b). The Pearson product-moment correlation coefficient showed significant positive correlations with neuronal counts (+0.744**), average intensity values (+0.656**) and perimeter (+0.594**) as observed when ACA and VCA data from 15 and 90 dpl groups were analyzed together (Table 3).

3.3 | Arc/Arg3.1 immunocytochemistry

In control animals, Arc/Arg3.1 immunoreactivity was detected in the cell bodies and dendrites of large- and medium-size pyramidal neurons from all layers across auditory and visual cortices (Figure 6). Changes in the labeling intensity, number and distribution of immunoreactive pyramidal neurons and its dendritic trees throughout the cortex enabled recognizing the cytoarchitectural borders, as established in the conventional rat brain atlas (Paxinos & Watson, 2005; dotted lines in Figure 6a).

A global decrease in Arc/Arg3.1 immunoreactive neuronal somata and dendrites was evident in all subdivisions of the ACA in the 15 dpl group (Figures 6b and 7b). However, immunoreactivity, particularly in pyramidal cell dendrites, recovers in ACA at 90 dpl (Figures 6c and 7c).

Quantitative immunocytochemistry for c-Fos after cochlear lesions

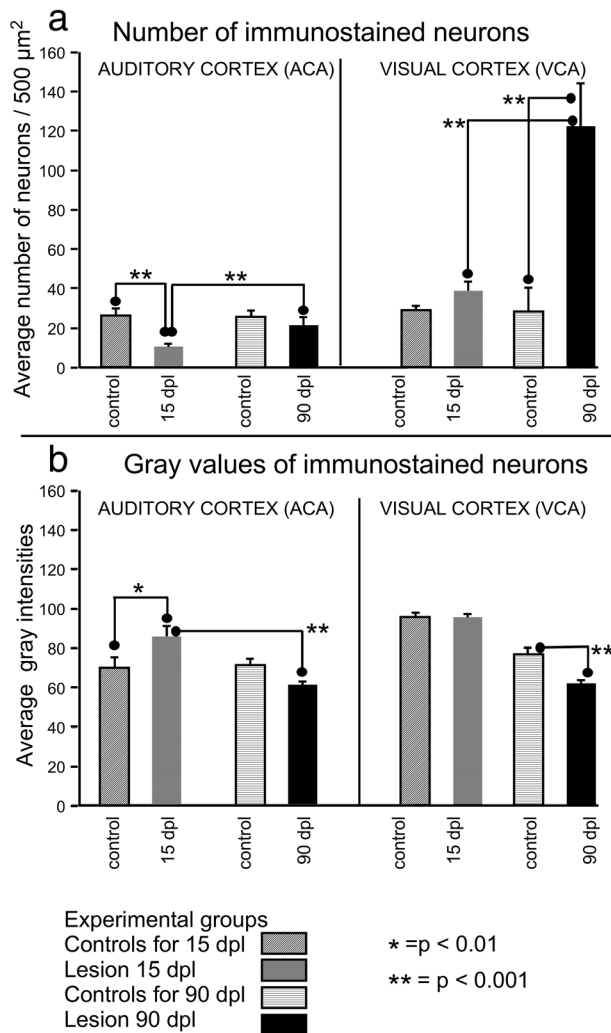


FIGURE 5 Bar charts illustrating changes in the number of c-Fos immunoreactive neurons (upper panel - a) and their gray intensity values (lower panel - b), in the ACA (left) and VCA (right). Lines ending in dots represent statistically significant differences between groups (* = $p < .01$; ** = $p < .001$). Sections from each experimental group were incubated simultaneously with their own controls (controls = filled striped bars) to cancel out differences in intensity measurements caused by differences in processing. In the ACA, the average number of neurons immunolabeled for c-Fos in the 15 dpl group is significantly lower than that in control sections. The average number of neurons in the 90 dpl group is significantly higher than that in the 15 dpl group, with values similar to its corresponding control (a left). The average neuron gray level intensities in the 15 dpl group were significantly higher (lower immunolabeling intensity) than the average intensities of their corresponding controls. The average gray level values of the 90 dpl group are lower than those of the 15 dpl (b left). In the VCA, the average number of immunolabeled neurons shows no significant changes between the 15 dpl and the control groups, albeit significantly increasing in the 90 dpl group (a right). The gray intensity values of the 90 dpl group sections are significantly lower (higher immunolabeling intensity) than the intensity values of the controls (b right)

Conversely, in the VCA, dendritic Arc/Arg3.1 immunostaining and the number of immunopositive neurons increased in lesioned animals, at 15 and 90 dpl, most noticeably in layers 2/3 and 6, in the 90 dpl group (Figures 6c and 7c).

4 | DISCUSSION

Adaptative crossmodal plasticity occurs after the loss of a sensory input, not only contributing to compensating deprivation but also expanding the remaining modalities (Bavelier & Neville, 2002; Merabet & Pascual-Leone, 2010; Frasnelli, Collignon, Voss, & Lepore, 2011). Our c-Fos and Arc/Arg3.1 immunoreactivity results support a global, two-stage reorganization of auditory and visual cortices after deafness: short-term loss of neuronal activation in the ACA, characterized by diminished immunoreactivity for both markers, followed by a long-term recovery in the ACA, with both markers returning to immunostaining levels close to control and increased labeling in the VCA.

4.1 | Auditory deprivation model by cochlear puncture

Maturity in male rats occurs approximately at P45–P48 (Sengupta, 2013). Age-related hearing loss in Wistar rats starts at 12–14 months (Alvarado, Fuentes-Santamaría, Gabaldón-Ull, Blanco, & Juiz, 2014). In our animal model, cochlear lesions were performed in 3-month-old animals (P90), with a total survival time of 6 months, which is long enough to develop hearing loss due to the lesion, but still short enough to avoid confounding age-related hearing loss. The maturation timelines and lifespan of rats and humans are different. Considering all relevant interspecies differences, 1 day of life in rats approximately corresponds to 34.8 days of life in humans (Sengupta, 2013). Therefore, the deafness time window used in this study corresponds to 8–17 years of age in humans.

Postlesion flat ABR recordings at intensities up to 80 dBs, together with a massive loss of SGNs, over 70% at 3 months after the lesion, clearly indicate profound and persistent bilateral deafness after the cochlear lesion. The gradual decrease in size of SGNs (Table 1) indicates progressive degeneration of the auditory nerve with time after cochlear damage. Thus, our model reproduces an abrupt cessation of peripheral synaptic auditory input, accompanied by progressive structural damage of first order neurons and their central synapses (Butler & Lomber, 2013; Wang, O'Donohue, & Manis, 2011). Animal models of deafness induced by cochlear mechanical lesion have been previously used to investigate post-lesion plasticity in the auditory pathway (Vale & Sanes, 2002; Illing, Kraus, & Meidinger, 2005; Rubio, 2006; Alvarado, Fuentes-Santamaría, & Henkel, 2009).

4.2 | c-Fos immunocytochemistry

The activity-dependent expression of the immediate early gene c-Fos is induced and modulated by a broad range of stimuli including neuronal depolarization and firing, neurotransmitter release, synaptic stimulation or changes in growth factors regulation (Sheng & Greenberg, 1990; Joo, Schaukowitz, Farbiak, Kilaru, & Kim, 2015). In the auditory

TABLE 3 Pearson product-moment correlation analysis of combined Auditory cortex area (ACA) and Visual cortex area (VCA) data

Pearson Correlation test - All lesioned group (AVA and ACA)						
	NoP ACA	NoP VCA	Gray ACA	Per ACA	Gray VCA	Per VCA
NoP ACA						
NoP VCA	0.744**					
Gray ACA	-0.148	-0.304				
Per ACA	0.256	0.262	0.171			
Gray VCA	-0.461*	-0.480*	0.656**	0.252		
Per VCA	0.374**	0.710**	-0.094	0.594**	0.156	

Note. Number of neurons (NoP), mean gray intensity values (Gray) and neuronal nuclei perimeter (Per).

**Significant to 0.01

*Significant to 0.05

NS = nonsignificant.

system, coincident overexpression of c-Fos immunoreactivity and 2-deoxyglucose autoradiography labeling in the same tonotopic laminae of the inferior colliculus after pure tone stimulation supports using this

immediate early expression gene as an auditory activity marker (Marie, Luo, & Ryan, 1999). Although c-Fos expression in the central nervous system is also associated with apoptosis (Preston et al., 1996) or

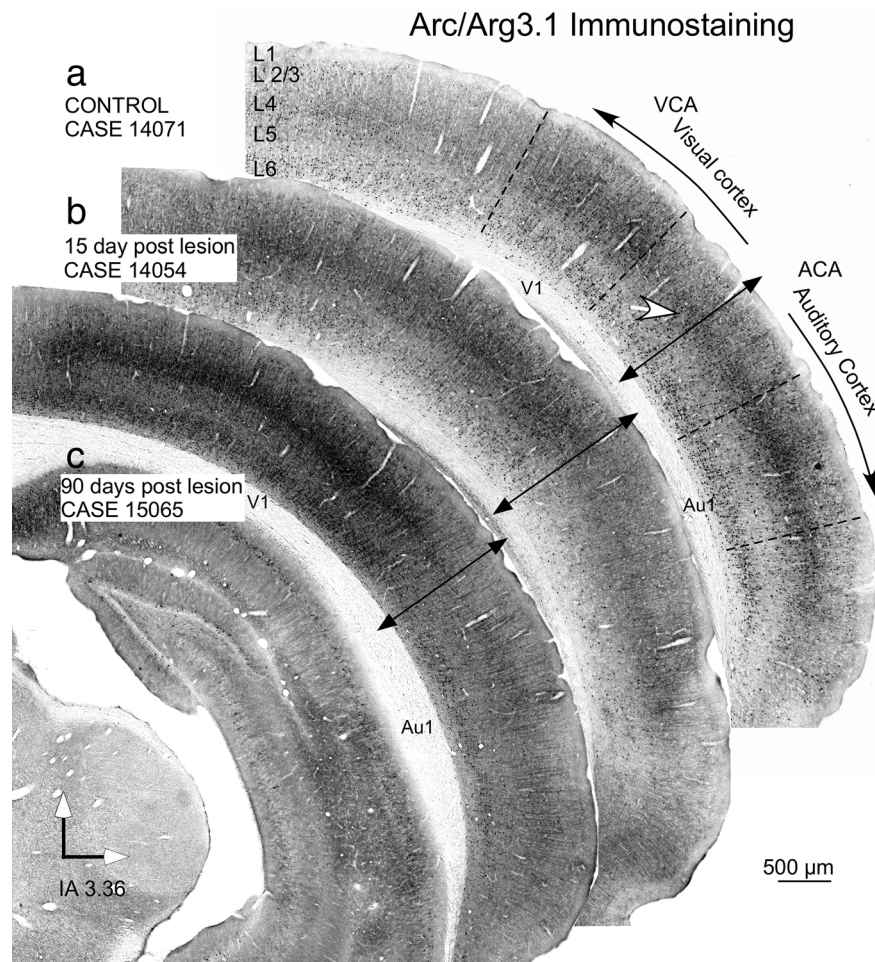


FIGURE 6 Representative Arc/Arg3.1 immunostaining in coronal sections from (a) control, (b) 15 dpl and (c) 90 dpl animal groups at equivalent rostro-caudal levels. Dotted lines in (a) represent cytoarchitectural subdivisions. These limits have been drawn by overlapping the images of the 3.36 IA from Paxinos and Watson (2005) on an equivalent rostro-caudal immunostained coronal section. Double headed arrow represents the border between the auditory cortex area (ACA) and visual cortex area (VCA). Note the decrease in immunoreactivity in ACA in the 15 dpl group (b) and the increase in the number and labeling intensity of neurons in layers 2/3 and 6 in the 90 dpl group in the VCA (c - left of the double headed arrow). Abbreviation of cortical subdivisions: V1 = Primary visual cortex. Au1 = Primary auditory cortex

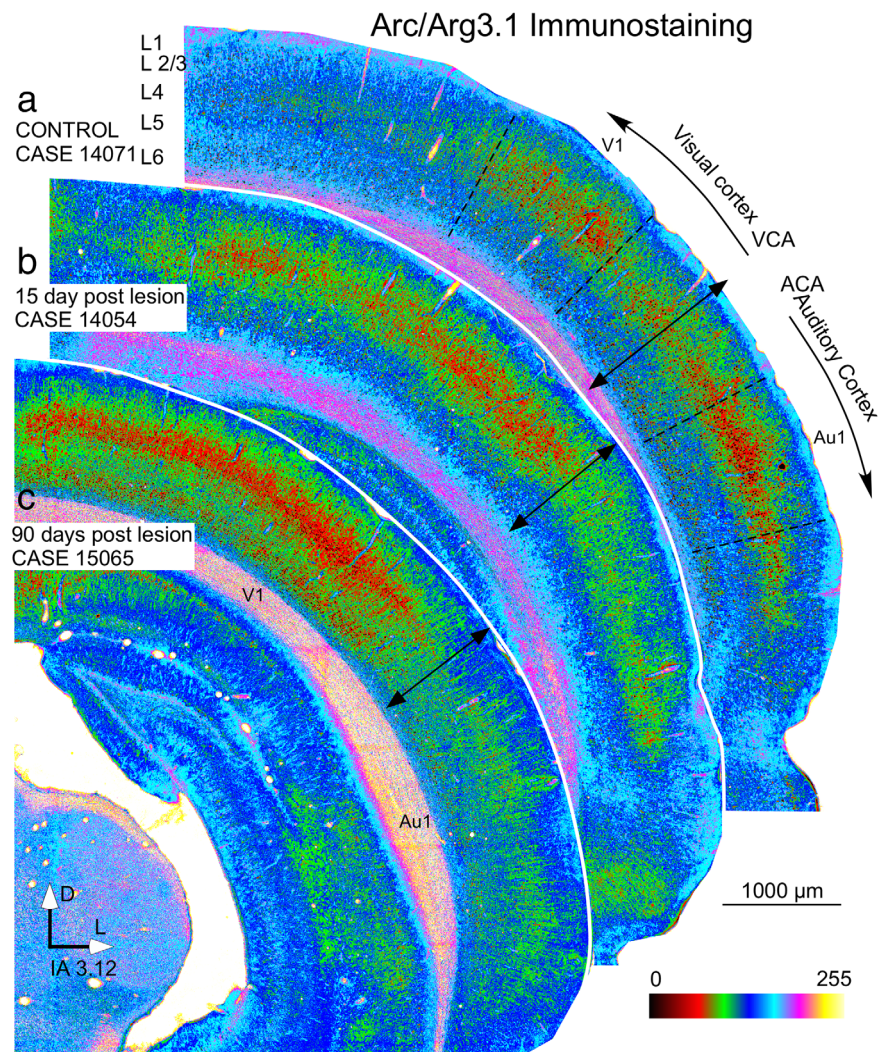


FIGURE 7 Pseudocolor representation of Arc/Arg3.1 immunostained coronal sections from (a) control, (b) 15 dpl and (c) 90 dpl groups made after threshold segmentation of neuronal somata and dendrites (sections similar to Figure 6). Dendritic immunolabeling displays increased intensity in the VCA at 90 dpl (c). Note the maximum immunostaining intensity in layers 4, 5, and 6 (c). Calibration bar for colors with respect to intensity values in the bottom left of the figure. Abbreviation of cortical subdivisions: V1 = Primary visual cortex. Au1 = Primary auditory cortex

neuronal injury (Bullitt, 1990; Chen et al., 2015), chromatolytic c-Fos immunoreactive nuclei or changes in their shape suggestive of cell death were not observed in our material. Thus, changes in number, topographical distribution and intensity labeling of c-Fos immunoreactive neurons shown here in ACA and VCA after hearing deprivation indicate post-lesion cortical plastic reorganizations, originated by changes in electrical, metabolic or neurotrophic activity, or a combination thereof, as discussed below.

The immediate early gene c-Fos was previously used to analyze changes in crossmodal activation in the cortex in an experimental paradigm of blindness. In cats, 3 days after photocoagulation of area centralis of the visual field of the retina, the expression of c-Fos and zif268 (EGR-1), which is another activity-dependent transcriptional regulator, shows a decrease in visual cortical areas of the cortex, partially recovering two or more months after the lesion (Arckens, Van der Gicht, Eysel, Orban, & Vandesande, 2000).

4.3 | Arc/Arg3.1 immunocytochemistry

Arc/Arg3.1, is an immediate early gene related to excitatory glutamatergic neurotransmission through synaptic regulation of AMPA glutamate receptor trafficking and internalization (Ju et al., 2004; Chowdhury et al., 2006; Derkach, Oh, Guire, & Soderling, 2007; Bramham et al., 2008; Byers et al., 2015). Arc/Arg3.1-mediated activity-dependent endocytosis of AMPA GluR2 subunits, and the subsequent reduction of AMPA receptor mediated currents have been shown in hippocampal slices (Rial Verde, Lee-Osbourne, Worley, Malinow, & Cline, 2006). AMPA receptors devoid of GluR2 subunits increase calcium inflow to neurons. c-Fos accumulation in nuclei depends on intracellular Ca^{2+} and second messenger increases due to changes in neuronal activity (Morgan & Curran, 1988; Sheng & Greenberg, 1990). Accordingly, a parallel increase in both genes, shown in our material, expresses a metabolic increase after neuronal activation (c-Fos expression) and homeostatic compensation for an increase in glutamatergic

excitation (Arc/Arg 3.1 expression). Thus, the decrease in immunopositive neurons at 15 dpl in the ACA may be related with changes in ascending excitation supported by the loss of immunoreactive neurons in layer 4, which is a key target for glutamatergic thalamic connections (Kharazia & Weinberg, 1994). Decreased levels of Arc/Arg3.1 have been shown in primary AC of Wistar rats following deafness induced by acoustic trauma, thereby suggesting a reduced excitability after hearing loss 6 days after noise exposure (Tan et al., 2007). Similarly, changes reported herein also show a decrease in c-Fos and Arc/Arg3.1 in the ACA, at a similar time window (15 dpl). Based on its role in AMPA receptor internalization and calcium second messenger activation, the increase in Arc/Arg3.1 and c-Fos positive neurons in layers 2/3, 4, and 6 (see Figures 3f and 7c) at 90 dpl suggests glutamatergic overactivation of the visual cortex.

Layers 4 and 6 are known to be the main target of thalamic glutamatergic ascending connections (Kharazia & Weinberg, 1994). Thus, the increase in c-Fos and Arc/Arg3.1 immunoreactivity in the VCA shown herein suggests a homeostatic response after thalamic glutamatergic overactivation of the VCA, most likely after intermodal reorganization. A crossmodal invasion from LGN (lateral geniculate nucleus) to MGN (medial geniculate nucleus) has been shown by tract tracing experiments after early extensive removal of visual inputs, providing an anatomical substrate for understanding polymodal conversion of thalamo cortical inputs (Angelucci, Clascá, & Sur, 1998). Accordingly, recent studies have indicated an effective induction of thalamic plasticity in adult cortices (Cooke & Bear, 2010; Heynen & Bear, 2001; Montey & Quinlan, 2011; Oberlaender, Ramirez, & Bruno, 2012; Yu et al., 2012). In particular, electrophysiological experiments made after visual deprivation indicate strengthened thalamocortical inputs in primary AC (Petrus et al., 2014).

Layer 2/3, which largely houses cortical horizontal connectivity, showed increased Arc/Arg3.1 immunoreactivity at 90 dpl in the VCA (Figure 6f). A homeostatic increase in intrinsic excitability compensating visual deprivation by lid suture or TTX blockade has been shown in layers 2/3, in rat brain slices (Maffei & Turrigiano 2008). Synaptic plasticity in the cerebral cortex consensually operates by inducing stable structural and functional changes in its intrinsic "horizontal" microcircuits. The capacity to reorganize horizontal connections has been shown after inducing innervation of the medial geniculate body by retinal axons during development. After providing the auditory pathway with visual information, tracer injections in layer 2/3 of the AC showed changes in the size and shape of cortical horizontal terminal fields (Gao & Pallas, 1999). Accordingly, the increase of Arc/Arg3.1 and c-Fos positive neurons in the VCA, in the 90 dpl group, could also result from VCA overactivation of intrinsic microcircuits.

In conclusion, our results indicate a short-term decrease in auditory activation and a long-term overactivation of the visual cortex with a partial recovery of activation in the AC after bilateral chronic auditory deprivation in the adult rat. Our data suggest that intermodal, long-term changes in c-Fos and Arc/Arg3.1 expression may result from a new, stable, long-term reorganization of thalamo-cortical inputs and horizontal microcircuits between sensory cortices, thereby suggesting

the potentiation of cortical visual drivers after hearing deprivation in adult rats. Physiological and behavioral implications remain unexamined.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. Grant numbers: SAF2016-78898-C1 and 2.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study concept and design: Merchán MA and Pernia M. Acquisition of data: Pernia M, Estevez S, Plaza I, Poveda C. Drafting of the manuscript: Merchán MA, Juiz JM, Pernia M. Statistical analysis: Carro J. Obtained funding: Merchán MA and Juiz JM. Study supervision: Merchán MA.

REFERENCES

- Abercrombie, M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical Record*, 94, 239–247.
- Allman, B. L., Keniston, L. P., & Meredith, M. A. (2009). Adult deafness induces somatosensory conversion of ferret auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 5925–5930.
- Alvarado, J. C., Fuentes-Santamaría, V., & Henkel, C. K. (2009). Rapid modifications in calretinin immunostaining in the deep layers of the superior colliculus after unilateral cochlear ablation. *Hearing Research*, 247, 78–86.
- Alvarado, J. C., Fuentes-Santamaría, V., Gabaldón-Ull, M. C., Blanco, J. L., & Juiz, J. M. (2014). Wistar rats: A forgotten model of age-related hearing loss. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 1–20.
- Angelucci, A., Clascá, F., & Sur, M. (1998). Brainstem inputs to the ferret medial geniculate nucleus and the effect of early deafferentation on novel retinal projections to the auditory thalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 400(3), 417–439.
- Arckens, L., Van der Gicht, E., Eysel, U. T., Orban, G. A., & Vandesande, F. (2000). Investigation of cortical reorganization in Area 17 and nine extrastriate visual areas through the detection of changes in immediate early gene expression as induced by retinal lesions. *Journal of Comparative Neurology*, 425, 531–544.
- Bardera, A., Boada, I., Feixas, M., & Sbert, M. (2009). Image segmentation using excess entropy. *Journal of Signal Processing Systems*, 54, 205–214.
- Barone, P., Lacassagne, L., & Kral, A. (2013). Reorganization of the connectivity of cortical field DZ in congenitally deaf cat. *PLoS One*, 8, e60093.
- Bavelier, D., & Neville, H. J. (2002). Cross-modal plasticity: Where and how? *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 443–452.
- Bizley, J. K., Nodal, F. R., Bajo, V. M., Nelken, I., & King, A. J. (2007). Physiological and anatomical evidence for multisensory interactions in auditory cortex. *Cerebral Cortex*, 17, 2172–2189.
- Bramham, C. R., Worley, P. F., Moore, M. J., & Guzowski, J. F. (2008). The immediate early gene arc/arg3.1: Regulation, mechanisms, and function. *Journal of Neuroscience*, 28, 11760–11767.
- Bullitt, E. (1990). Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 296, 517–530.
- Butler, B. E., & Lomber, S. G. (2013). Functional and structural changes throughout the auditory system following congenital and early-onset deafness: Implications for hearing restoration. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 92.

- Byers, C. E., Barylko, B., Ross, J., Southworth, D. R., James, N. G., Taylor, C. A., IV, ... Albansi, J. P. (2015). Enhancement of dynamin polymerization and GTPase activity by Arc/Arg3.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850, 1310–1318.
- Chen, X., Shen, J., Wang, Y., Chen, X., Yu, S., Shi, H., & Huo, K. (2015). Up-regulation of c-Fos associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35, 363–376.
- Chowdhury, S., Shepherd, J., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., ... Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52, 445–459.
- Clarkson, C., Juiz, J. M., & Merchán, M. A. (2010). Transient down-regulation of sound-induced c-Fos protein expression in the inferior colliculus after ablation of the auditory cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4, 141.
- Cooke, S. F., & Bear, M. F. (2010). Visual experience induces long-term potentiation (LTP) in the primary visual cortex. *Journal of Neuroscience*, 30(48), 16304–16313.
- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., Soderling, T. R. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 101–113.
- Frasnelli, J., Collignon, O., Voss, P., & Lepore, F. (2011). Crossmodal plasticity in sensory loss. *Progress in Brain Research*, 191, 233–249.
- Gao, W. J., & Pallas, S. L. (1999). Cross-modal reorganization of horizontal connectivity in auditory cortex without altering thalamocortical projections. *Journal of Neuroscience*, 19, 7940–7950.
- Glasper, E. R., Kozorovitskiy, Y., Pavlic, A., & Gould, E. (2011). Paternal experience suppresses adult neurogenesis without altering hippocampal function in *Peromyscus californicus*. *Journal of Comparative Neurology*, 519, 2271–2281.
- Guillery, R. W., & Herrup, K. (1997). Quantification without pontification: Choosing a method for counting objects in sectioned tissues. *Journal of Comparative Neurology*, 386, 2–7.
- Gull, S. F., & Skilling, J. (1984). Maximum entropy method in image processing. *IEE Proceedings*, 131, 646–659.
- Heynen, A. J., & Bear, M. F. (2001). Long-term potentiation of thalamocortical transmission in the adult visual cortex in vivo. *Journal of Neuroscience*, 21(24), 9801–9813.
- Illing, R. B., Kraus, K. S., & Meidinger, M. A. (2005). Reconnecting neuronal networks in the auditory brainstem following unilateral deafening. *Hearing Research*, 206, 185–199.
- Joo, J.-Y., Schaukowitz, K., Farbiak, L., Kilaru, G., & Kim, T.-K. (2015). Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nature Neuroscience*, 19, 75–83.
- Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., ... Malenka, R. C. (2004). Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nature Neuroscience*, 7, 244–253.
- Juiz, J. M., Rueda, J., Merchán, J. A., & Sala, M. L. (1989). The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hearing Research*, 40, 65–74.
- Kharazia, V. N., & Weinberg, R. J. (1994). Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. *Journal of Neuroscience*, 14(10), 6021–6032.
- King, A. J. (2015). Crossmodal plasticity and hearing capabilities following blindness. *Cell and Tissue Research*, 361, 295–300.
- Kok, M. A., Chabot, N., & Lomber, S. G. (2014). Cross-modal reorganization of cortical afferents to dorsal auditory cortex following early- and late-onset deafness. *Journal of Comparative Neurology*, 522, 654–675.
- Kral, A. (2002). Hearing after congenital deafness: Central auditory plasticity and sensory deprivation. *Cerebral Cortex*, 12, 797–807.
- Kral, A., Schröder, J.-H., Klinke, R., & Engel, A. K. (2003). Absence of cross-modal reorganization in the primary auditory cortex of congenitally deaf cats. *Experimental Brain Research*, 153, 605–613.
- Kral, A., & Eggermont, J. J. (2007). What's to lose and what's to learn: Development under auditory deprivation, cochlear implants and limits of cortical plasticity. *Brain Research Reviews*, 56, 259–269.
- Lamas, V., Alvarado, J. C., Carro, J., & Merchán, M. A. (2013). Long-term evolution of brainstem electrical evoked responses to sound after restricted ablation of the auditory cortex. *PLoS One*, 8, e73585.
- Lomber, S. G., Meredith, M. A., & Kral, A. (2010). Cross-modal plasticity in specific auditory cortices underlies visual compensations in the deaf. *Nature Neuroscience*, 13, 1421–1427.
- Maffei, A., & Turrigiano, G. G. (2008). Multiple modes of network homeostasis in visual cortical layer 2/3. *Journal of Neuroscience*, 28(17), 4377–4384.
- Marie, R. L., Luo, L., & Ryan, A. F. (1999). Effects of stimulus frequency and intensity on c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. *Journal of Comparative Neurology*, 404, 258–270.
- Merabet, L. B., & Pascual-Leone, A. (2010). Neural reorganization following sensory loss: The opportunity of change. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(1), 44–52.
- Meredith, M. A., Kryklywy, J., McMillan, A. J., Malhotra, S., Lum-Tai, R., & Lomber, S. G. (2011). Crossmodal reorganization in the early deaf switches sensory, but not behavioral roles of auditory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 8856–8861.
- Meredith, M. A., & Allman, B. L. (2015). Single-unit analysis of somatosensory processing in the core auditory cortex of hearing ferrets. *European Journal of Neuroscience*, 41, 686–698.
- Merzenich, M. (2000). Cognitive neuroscience. Seeing in the sound zone. *Nature*, 404, 820–821.
- Montey, K. L., & Quinlan, E. M. (2011). Recovery from chronic monocular deprivation following reactivation of thalamocortical plasticity by dark exposure. *Nature Communications*, 2, 317.
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1988). Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. *Cell Calcium*, 9(5–6), 303–311.
- Oberlaender, M., Ramirez, A., & Bruno, R. M. (2012). Sensory experience restructures thalamocortical axons during adulthood. *Neuron* 74(4), 648–655.
- Paxinos, G. (2004). *Isocortex*. In G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (3th ed., pp. 745–746). Sydney (Australia): Elsevier.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (5th ed.). San Diego (USA): Elsevier.
- Petrus, E., Isaiah, A., Jones, A. P., Li, D., Wang, H., Lee, H. K., & Kanold, P. O. (2014). Crossmodal induction of thalamocortical potentiation leads to enhanced information processing in the auditory cortex. *Neuron*, 81, 664–673.
- Preston, G. A., Lyon, T. T., Yin, Y., Lang, J. E., Solomon, G., Annab, L., ... Barrett, J. C. (1996). Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 211–218.
- Rial Verde, M. E., Lee-Osbourne, J., Worley, P. F., Malinow, R., & Cline, H. T. (2006). Increased expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*, 52, 461–474.
- Rueda, J., Sen, C., Juiz, J., & Merchán, J. A. (1987). Neuronal loss in the spiral ganglion of young rats. *Acta Oto-Laryngologica*, 104, 417–421.

- Rubio, M. E. (2006). Redistribution of synaptic AMPA receptors at glutamatergic synapses in the dorsal cochlear nucleus as an early response to cochlear ablation in rats. *Hearing Research*, 216–216, 154–167.
- Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4, 624–630.
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, 477–485.
- Tan, J., Rüttiger, L., Panford-Walsh, R., Singer, W., Schulze, H., Kilian, S. B., ... Knipper, M. (2007). Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1/arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience*, 145, 715–726.
- Tsuneoka, Y., Maruyama, T., Yoshida, S., Nishimori, K., Kato, T., Numan, M., & Kuroda, O. (2013). Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 521, 1633–1663.
- Vale, C., & Sanes, D. H. (2002). The effect of bilateral deafness on excitatory and inhibitory synaptic strength in the inferior colliculus. *European Journal of Neuroscience*, 16(12), 2394–2404.
- Wang, Y., O'Donohue, H., & Manis, P. (2011). Short-term plasticity and auditory processing in the ventral cochlear nucleus of normal and hearing-impaired animals. *Hearing Research*, 279(1–2), 131–139.
- Yu, X., Chung, S., Chen, D. Y., Wang, S., Dodd, S. J., Walters, J. R., ... Koretsky, A. P. (2012). Thalamocortical inputs show post-critical-period plasticity. *Neuron*, 74(4), 731–742.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Pernia M, Estevez S, Poveda C, et al. c-Fos and Arc/Arg3.1 expression in auditory and visual cortices after hearing loss: Evidence of sensory crossmodal reorganization in adult rats. *J Comp Neurol*. 2017;0525:2677–2689. <https://doi.org/10.1002/cne.24233>

Brain Structure and Function

CROSSMODAL REACTION OF AUDITORY AND VISUAL CORTICES AFTER LONG TERM BILATERAL HEARING DEPRIVATION IN THE RAT

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BSAF-D-19-00158	
Full Title:	CROSSMODAL REACTION OF AUDITORY AND VISUAL CORTICES AFTER LONG TERM BILATERAL HEARING DEPRIVATION IN THE RAT	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	visual evoked potentials, RT-qPCR, quantitative immunocytochemistry, GluA2/3 (RRID:AB_90710), GAD67 (RRID: AB_2278725), parvalbumin (AB_10000344)	
Corresponding Author:	Miguel Angel Merchan Instituto de Neurociencias de Castilla y Leon Salamanca, Salamanca SPAIN	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Instituto de Neurociencias de Castilla y Leon	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Marianny Pernia	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Marianny Pernia	
	Iván Díaz	
	Ana Cecilia Colmenárez Raga	
	Casto Rivadulla	
	Javier Cudeiro	
	Ignacio Plaza	
	Miguel Angel Merchan	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-78898-C2-2-R and BFU2017-82375-R)	Prof. Miguel Angel Merchan
	Junta de Castilla y León (SA070P17)	Prof. Miguel Angel Merchan
Abstract:	<p>Visual cortex (VC) overactivation analyzed by evoked responses has been demonstrated in congenital deafness and after long-term acquired hearing loss in humans. However, as permanent hearing deprivation has not yet been explored in animal models, the main aim of the present paper was to shed light on functional and molecular changes underlying the visual and auditory crossmodal reaction. To do so, we analyzed cortical visual evoked potentials (VEPs) and gene expression (RT-qPCR) of a set of markers for neuronal activation (c-Fos) and activity-dependent homeostatic compensation (Arc/Arg3.1). In order to explore the state of excitation and inhibition, we performed RT-qPCR and quantitative immunocytochemistry for receptor subunits (GluA2/3, GABAA-α1, GABAB-R2), and markers for inhibition (GAD65/67 and parvalbumin-PV). VC overactivation is demonstrated by a significant increase in VEPs wave N1 and by upregulation of the activity-dependent early genes c-Fos and Arc/Arg3.1 (confirming by RT qPCR our previously published immunocytochemical results). A significant increase in the synthesis of GluA2 receptor subunit in the auditory cortex (AC) was shown by its gene expression and by the overstaining of GluA2/3 in layers 2/3 and 5 pyramidal neurons. Moreover, as inhibitory markers (GAD65/67 and PV-GABA interneurons) showed significantly higher values in the AC,</p>	

	<p>a concurrent potential increase in inhibition can also be assumed for the AC. After permanent hearing loss in the rat, VC is overactivated but also potentially balanced by a homeostatic regulation. Furthermore, persistent imbalance in excitatory and inhibitory markers was shown in the AC, most probably as a result of changes in horizontal intermodal feedbacks.</p>
<p>Suggested Reviewers:</p>	<p>Hey-Kyoung Lee Johns Hopkins University, Baltimore, USA heykyounglee@jhu.edu</p>
	<p>Stephen G. Lomber University of Western Ontario, Canada steve.lomber@uwo.ca</p>
	<p>Brian L. Allman School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, Canada brian.allman@schulich.uwo.ca</p>
	<p>Yasuo Kawaguchi National Institute for Physiological Sciences (NIPS), Japan yasuo@nips.ac.jp</p>
<p>Opposed Reviewers:</p>	

[Click here to view linked References](#)

CROSSMODAL REACTION OF AUDITORY AND VISUAL CORTICES AFTER LONG-TERM BILATERAL HEARING DEPRIVATION IN THE RAT

Pernia M.¹, Díaz I.¹, Colmenárez-Raga A.C.¹, Rivadulla C.², Cudeiro J.², Plaza I.¹, Merchán M.A.¹

¹Instituto de Neurociencias of Castilla y León-INCyL, Universidad de Salamanca, Spain

²Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Facultad de Ciencias de la Salud Universidad de A Coruña and Instituto de Investigaciones Biomédicas de A Coruña (INIBIC), Spain

Corresponding author:

Dr. Miguel A. Merchán

merchan@usal.es

ABSTRACT

Visual cortex (VC) overactivation analyzed by evoked responses has been demonstrated in congenital deafness and after long-term acquired hearing loss in humans. However, as permanent hearing deprivation has not yet been explored in animal models, the main aim of the present paper was to shed light on functional and molecular changes underlying the visual and auditory crossmodal reaction. To do so, we analyzed cortical visual evoked potentials (VEPs) and gene expression (RT-qPCR) of a set of markers for neuronal activation (c-Fos) and activity-dependent homeostatic compensation (Arc/Arg3.1). In order to explore the state of excitation and inhibition, we performed RT-qPCR and quantitative immunocytochemistry for receptor subunits (GluA2/3, GABAA- α 1, GABAB-R2), and markers for inhibition (GAD65/67 and parvalbumin-PV). VC overactivation is demonstrated by a significant increase in VEPs wave N1 and by upregulation of the activity-dependent early genes c-Fos and Arc/Arg3.1 (confirming by RT-qPCR our previously published immunocytochemical results). A significant increase in the synthesis of GluA2 receptor subunit in the auditory cortex (AC) was shown by its gene expression and by the overstaining of GluA2/3 in layers 2/3 and 5 pyramidal neurons. Moreover, as inhibitory markers (GAD65/67 and PV-GABA interneurons) showed significantly higher values in the AC, a concurrent potential increase in inhibition can also be assumed for the AC. After permanent hearing loss in the rat, VC is overactivated but also potentially balanced by a homeostatic regulation. Furthermore, persistent imbalance in excitatory and inhibitory markers was shown in the AC, most probably as a result of changes in horizontal intermodal feedbacks.

Keywords: visual evoked potentials, RT-qPCR, quantitative immunocytochemistry, GluA2/3 (RRID:AB_90710), GAD 67 (RRID: AB_2278725), parvalbumin (AB_10000344)

Acknowledgments

The authors would like to thank to Antonio Sánchez-Garrido (from SICNOVA) for the graphic design and printing of the 3D mask used in the tissue extraction, Javier Herrero-Turrión for his technical assistance in the RT-qPCR protocol and Heather Fulwood for her careful revision of the syntax and grammar of the manuscript.

Funding

This study was supported by a grant from the Ministry of Economy and Competitiveness of the Spanish Government SAF2016-78898-C2-2-R and BFU2017-82375-R, and from Junta de Castilla Y León SA070P17.

Abbreviation list

ABRs= auditory brainstem recordings

AC= auditory cortex

AC1= primary auditory cortex

ACD= dorsal auditory cortex

ACV= ventral auditory cortex

AMPA Rs= AMPA receptors

dpl= days post lesion

FS= fast-spiking

FS-PV= fast-spiking parvalbumin

IA= interaural

OD= optical density

PB= phosphate buffer

PtPD= parietal postero-dorsal cortex

PtPR= parietal postero-rostral cortex

PV= parvalbumin

SSC= somatosensory cortex

TBS-Tx= Tris-Buffered saline + 0.5% Triton X-100

VC= visual cortex

VC1= primary visual cortex

V2L= secondary lateral visual cortex

V2M= secondary medial visual cortex

V2MM= secondary medio-medial visual cortex

V2ML= secondary medio-lateral visual cortex

VEP= visual evoked potential

INTRODUCTION

Mammals have developed neural circuits, specialized in analyzing and mixing different sources of information, in order to build the perceptual sensory scene (Teichert and Bolz 2018). Such an ability for mixing requires a dynamic multimodal interchange of information along all the stations of the sensory pathways, from brainstem to the cerebral cortex. When one sensory system fails, the brain cortex reorganizes its neural network to preserve intermodal processing, known as crossmodal reaction. In deafened ferrets, *de novo* emergent somatosensory responses have been shown by single units recorded in the auditory cortex (AC), undoubtedly demonstrating a multimodal sensory conversion in the brain cortex after sensory deprivation (Allman et al. 2009). Since receptive fields arise as a result of inhibitory GABA interaction, demonstrated by iontophoresis (Fizlaff and Schuller 2001; Tremere et al. 2001), such sensory conversion may reflect an imbalanced neurotransmission between cortices. Crossmodal cortical interactions after deafness have been analyzed from many different points of view (Finney et al. 2001; Bizley et al. 2007; Allman et al. 2009; Meredith and Lomber 2011; Kok et al. 2014; among others); however, little evidence is available on how sensory cortices rebalance neuronal networks intermodally in the long term. Thus, the general aim of this paper was to set the functional state of the cortex (by visual evoked potential-VEP recordings) and to analyze the molecular and gene expression changes in markers for excitation and inhibition underlying crossmodal reactivity after permanent hearing deprivation in the rat.

We demonstrated that, after bilateral deafness, there was a significant increase in c-Fos and Arc/Arg3.1 immunostained neurons in the visual cortex (VC) and a decrease in the AC, suggesting a deep cortical reorganization in the long term (Pernia et al. 2017). It is known that the activity-dependent early gene c-Fos is linked basically to a broad range of stimuli including neuronal depolarization and firing, neurotransmitter release, synaptic stimulation and changes in regulation of growth factors (Bartel et al. 1989; Sheng et al. 1990; Curran and Morgan 1995; Joo et al. 2015). Increases in Arc/Arg3.1 in the VC, previously demonstrated by us, also point to a potential regulation of neural excitability in our animal model; this is indicated by the well-known role of this early gene in the activity-dependent homeostatic compensation induced by AMPA receptors (AMPA Rs) internalization (Bramham et al. 2008; Wall and Correa 2018). Therefore, our previous results of early gene immunocytochemistry would suggest a VC overactivation (suggested by c-Fos results), potentially rebalanced (suggested by Arc/Arg3.1 results), after loss or alteration of the auditory thalamic inputs by hearing deprivation. The first aim of this paper was to explore this hypothesis by analyzing long latency cortical VEP recordings to flash-light repetitive stimulation after permanent hearing deprivation.

Stability or imbalance of cortical circuits largely depends on synaptic plasticity in neuronal networks and, consequently, regulation of AMPA Rs, analyzed here by us, may be helpful in understanding the crossmodal reaction after sensory deprivation. In cortical pyramidal neurons, excitability and calcium cell permeability depend on the oligomeric composition of AMPA Rs (for a review, see Tanaka et al. 2000; Song and Huganir 2002). In brain slices of dark-reared rats it has been shown that, in the somatosensory cortex (SSC), alterations in EPSCs amplitude could be correlated with changes in AMPA R subunit composition shown by immunoblot analysis (Goel et al. 2006). Furthermore, after dark rearing in mice, microarray analysis has demonstrated an increase in gene expression for GluA2 and GluA3 AMPA R

subunits (Tropea et al. 2006). Similarly, an increase in GluA2 AMPA R subunit was shown by immunoblotting in SSC in adult raccoons in a model of digital deafferentation (He et al. 2004). In summary, electrophysiological and biochemical evidences support the hypothesis that sensory deprivation could induce changes in neuronal excitability related to the subunit composition of synaptic AMPA Rs. Moreover, it has been reported that the GluA2 and GluA3 AMPA R subunits endocytosis are mediated by Arc/Arg3.1 (Rial-Verde et al. 2006). Given the role of GluA2 and GluA3 AMPA R subunits in calcium permeability of AMPA Rs (Burnashev et al. 1992; Tanaka et al. 2000), membrane excitability (Goel et al. 2006) and receptor internalization mediated by Arc/Arg3.1 (Rial-Verde et al. 2006), the second goal of this paper was to compare changes in gene expression (by RT-qPCR for *GluA2*) and synthesized proteins (by quantitative immunocytochemistry) of GluA2/3 AMPA R subunits in the AC and VC.

A suppressive effect by hyperpolarization in crossmodal interactions has been demonstrated *in vivo* in primary VC of mice, after activation of AC by light spot optogenetic stimulation (Iurilli et al. 2012). Since this effect was abolished by transections between both cortices and by pharmacological blocking with gabazine, an effective GABA inhibition imbalance must be considered after intermodal interactions (Iurilli et al. 2012). Thus, third aim of this paper was to make a comparative analysis of inhibitory markers in AC and VC in long-term deafness, by analyzing *Gad65* and *Gad67* gene expression and immunocytochemistry for GAD67, as well as gene expression of receptors subunits *Gabaa- α 1* and *Gabab-r2*.

Parvalbumin (PV) immunoreactive neurons (GABA interneurons) showed altered distribution in the VC after bilateral enucleation in hamsters (Desgent et al. 2010). From the three defined immunocytochemical phenotypes of interneurons detected in the cortex (PV, Calbindin/somatostatin and calretinin/vasointestinal peptide), PV immunoreactive represent about 40% of the all GABA neurons in the cerebral cortex (Celio 1986; please see a review in Rudy et al. 2011). PV interneurons are well characterized by their morphological features, membrane properties and electrophysiological responses and are directly involved in cortical column microcircuit inhibition of pyramidal cells (Kawaguchi and Kubota 1997; Otsuka and Kawaguchi 2009). Indeed, PV positive GABA interneurons, known as fast-spiking (FS) neurons, can be considered as sentinels in charge of shaping pyramidal neuron responses by generating restricted interlaminar and intralaminar inhibition (Kawaguchi 1993; Kawaguchi and Kubota 1997). Therefore, the final aim of this paper was to analyze gene expression and immunocytochemistry in AC and VC of PV interneurons in our model of auditory deprivation at a long term.

MATERIAL AND METHODS

This study was conducted according to Spanish (Royal Decree 53/2013 - Law 32/2007) and European Union (Directive 2010/63/EU) guidelines for the care and use of laboratory animals. Protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Salamanca (Permit Number: 2012-265). Surgery was performed under monitored anesthesia and all precautions were taken to minimize suffering. In this study a total of 37 Wistar rats, 3-month-old weighing 250–300g were used.

Experimental groups

Group 1. VEP recordings. Control group n = 3; bilateral deafened animals n= 6.

Group 2. RT-qPCR to analyze the gene expression of *GluA2* AMPA R subunit, *Gad65*, *Gad67*, *Parvalbumin*, *Gabaa- α 1* and *Gabab-r2.*, and early genes *c-Fos* and *Arc/Arg3.1*. Control group n = 6; bilateral deafened animals n = 6.

Group 3. GluA2/3 AMPA R subunits immunocytochemistry. Control group n = 4; bilateral deafened animals n = 4.

Group 4. GAD67 and PV immunocytochemistry. Control group n = 3; bilateral deafened animals n = 5.

Surgery

Details about surgery and hearing loss validation in this animal model of long-term hearing deprivation was extensively detailed in a previous paper published by our laboratory (please see Pernia et al. 2017). Deep anesthesia was induced with intramuscular injections of ketamine chlorhydrate (30 mg/kg b.w.) and 5 mg/kg xylazine chlorhydrate (5 mg/kg b.w.). Animals were placed on a heating pad to maintain a temperature of 37°C and eyes were protected by applying a drop of ophthalmic gel. Using a surgical microscope, bilateral lesions were performed by puncturing the cochlea through the ears with a sterile straight needle (gauge 20 g) after middle ear ossicular chain removal. Animals were kept on the heating pad after surgery until they awoke. Buprenorphine was subcutaneously injected in the rat's back (0.05 mg/kg) for analgesia 1 h after the surgery and then every 8 hours during the following 72 hours.

Deafness assessment: Auditory brainstem recordings

Auditory brainstem recordings (ABRs) were carried out in deafened and control animals to show the effectiveness of cochlear puncture in inducing profound hearing loss.

In all the four experimental groups ABRs were performed before surgery, after surgery and immediately before euthanasia. Bilateral recordings were performed under anesthesia (ketamine-xylazine) using a close-field real-time signal processing (Tucker- Davis Technologies [TDT], System RZ- 6, Alachua, FL, USA) for groups 2, 3 and 4. In group 1, anesthesia protocol for ABRs was similar to that used for VEPs recordings (see below).

Three subcutaneous needle electrodes were used for the recordings, placed at the vertex (active electrode), the mastoid ipsilateral to the stimulated ear (reference) and the mastoid contralateral to the stimulated ear (ground electrode). Sound stimuli of a 5 milliseconds (msec) window with 0.1 msec alternating polarity click with a repetition rate of 11 bursts/s were delivered in 10-dB ascending steps from 10 to 90 dB SPL. The stimuli were performed in close field using a magnetic speaker (TDT – MF1 Multi-Field Magnetic Speaker) connected through a plastic tube of 10 cm long, inserted into the external auditory canal. This approach resulted in a delay of 1.4 msec for stimulus arrival at the tympanic membrane. Responses were averaged 1000 times. Evoked potentials were amplified and digitized using a Medusa RA16PA preamplifier and RA4LI head stage. The final signal was filtered with a 500 Hz high-pass filter and a 3000 Hz low-pass filter.

No sound evoked auditory brain stem activity was shown in any of the four deafened animal groups (for an example please see Fig. 1).

Visual evoked potentials

Animals from group 1 were placed in a cage for anesthesia induction by applying 5% sevoflurane. Once the hind paw and corneal reflexes disappeared, the animals were placed in a stereotaxic frame to implant stainless screws (1.2-mm diameter, 4-mm length). A small guide hole was created using a hand drill; screwing was then started by lowering the screws through the bone without touching the cortex and permanently attaching them with dental acrylic cement. Pedestal provided an excellent and stable signal to noise ratio and avoided potential movement along experiments (Makowiecki et al. 2015).

The active electrode was placed on the VC coordinates (AP: -7.5; ML 3.5) and the reference electrode was placed in the contralateral hemisphere (AP: -5.5; ML 3.5).

EEG recordings started a week after screw implantation and 90 days after cochlear puncture. EEG recording in the control group were made after the same time lapse as the bilateral deafened group. Animals were anaesthetized (1.5-2% of sevoflurane) to maintain stable slow-wave activity. The body temperature was maintained at 37°C by mean of a homeothermic blanket system with a rectal thermometer probe (Harvard Apparatus). For VEP recordings, the animals were placed in a dark cage, and allowed to adapt to darkness for 5 minutes. Visual stimulation consisted of flashes at 0.5Hz. VEPs were obtained after averaging 150 stimulus presentation. A differential amplifier (Model 1700 A-M System, LLC, Calsborg, WA, USA) was used continuously to record the EEG signal. The signal was amplified (x1000) filtered (1 Hz - 500 Hz), digitized at 20 KHz by a 1401 CED A/D convertor card (Cambridge Electronic Design, UK) and stored using Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, UK) in a PC for online checking and posterior analysis. The N1 wave latency was defined as time in seconds (sec) from the stimulus onset to the positive peak of the wave. The amplitude of wave N1 was measured as the peak-to-peak amplitude between the preceding negative to the subsequent N1-positive peak. To identify significant differences in wave amplitude (mV) and latencies (sec), a student t-test was employed. The results were considered significant at $p < .05$. Statistical analysis was performed using the SPSS_IBM software, version 25.0.0.0 (IBM Crp. and SPSS Inc., Chicago, IL, USA, RRID: SCR_002865).

Tissue extraction for RT-qPCR gene expression analysis

Animals from group 2 were anesthetized and decapitated and, after quick brain extraction (less than 4 minutes), AC and VC were delimited by superimposing a 3D printed mask. The mask was designed by us using digitalized drawing lines of coronal serial sections from the Paxinos and Watson atlas (from IA 0.12 to 12.24) (Figs. 2a and b). Plastic brain matrix was digitally built after delimiting AC and VC landmarks in stereotaxic atlas digital pictures (Design X® program) and printed with a 3D System 3510SD (Visijet M3 Crystal). The 3D plastic matrix was positioned carefully on the brain surface using a guide needle inserted in the brain in IA 0.00 (Fig. 2c). After being quickly frozen in liquid nitrogen, both brain and plastic matrix were precisely extracted using a small (0.7 mm) ad hoc trowel (Fig. 2d). Subsequently, AC and VC tissue was stored at -71°C until use.

To ensure the accuracy of AC and VC tissue extraction, serial sections of brains after tissue extraction were stained with 1% cresyl violet (C-violet 1791; Sigma-Aldrich) as described below. Stained sections were photographed using a Leica DMRB microscope and the “Virtual slice” module of NeuroLucida 8.0 (MBF-Bioscience, Williston, Vermont, USA) (Fig. 2e). Photomicrographs were superimposed with Paxinos and Watson atlas coordinates (2005) to determine dorso-ventral and rostro-caudal limits of extracted AC and VC (Fig. 2f). All the areas of tissue extraction (holes in the Nissl stained sections) were shown inside the coordinates of visual and auditory cytoarchitectural limits (Figs. 2e and f).

Cresyl violet staining

Coronal serial sections were 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 increasing concentrations of alcohol from 50% to 100%, followed by clearing in xylene (3 minutes).

RNA isolation

Total RNA was purified from the collected and homogenized cortices to study the gene expression of target mRNAs using RNAqueous-micro kit® performed according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations and quality were assessed using an RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and an Agilent 2100 Bioanalyzer to assess the integrity of the 18S and 28S rRNA bands, as well as an RNA integrity number (RIN), with 0 corresponding to fully degraded RNA and 10 corresponding to intact RNA. For all the RT-qPCR analyses, only RNA samples with a RIN of at least 7.5 were used; the vast majority of samples had a RIN of at least 8.0, thus fulfilling one of the requirements of an optimal RT-qPCR experiment according to Fleige et al. (2006).

Quantitative reverse transcription real-time PCR (RT-qPCR)

Total RNA (1 µg) primed with oligo-dT and random hexamer primers was reverse-transcribed into cDNA at 37°C for 2h using the first-strand cDNA synthesis kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) in a 20 µl volume and stored at -20°C until use, according to the manufacturer's instructions. In all cases, a reverse transcriptase negative control was used to test for genomic DNA contamination.

RT-qPCR was performed using the SYBR-Green method with a 2x master mix (Applied Biosystems). Each reaction contained 10 µl of Master Mix, 0.8 µl of each primer, 3 µl of each cDNA sample in a different serial cDNA quantity for each gene, and Milli-Q water up to 20 µl. The amplification reaction was made in the QuantStudio 7 Flex Real-Time RT-qPCR System (Applied Biosystems) with the following conditions: 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 30 sec at 60°C depending on each pair of primers. Three RT-qPCR reactions were performed for each sample per plate, and each experiment was repeated twice. An RNA-free (negative) control sample was also used. The list of primers used is provided in Table 1. All primers had at least one primer crossing an exon–exon boundary and were designed to have similar melting temperatures and to give similar amplicon sizes.

To decide which was the most stable gene as endogenous reference for RT-qPCR data normalization, three candidates [β -actin (*Actb*), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) and ribosomal protein L19 (*Rpl19*)] were selected and their expression was also measured by RT-qPCR. The

Norm-Finder software (Andersen et al., 2004) was used to calculate intra and inter-group expression. Our results indicated that *Rpl19* was the most stable gene, whereas *Actb* and *Gapdh* are less stable (data not shown). The mean of threshold cycle (Ct) value and primer efficiency value of *Rpl19* were used for normalization.

The comparative Ct method was used to obtain quantitative data (Schmittgen and Livak 2008). Following the removal of outliers according to Burns et al. (2005), raw fluorescence data were used to determine the RT-qPCR amplification efficiency (E) according to the equation $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] * 100$. All amplifications had an E value of $100 \pm 10\%$, with an E value close to 100% being an indicator of efficient amplification. The relative gene expression value (fold change, FC) for each transcript was calculated according to equation $2^{-(\Delta C_t \text{ "condition 1"} - \Delta C_t \text{ "condition 2"})}$, where “condition 1” corresponds to experimental samples (90 dpl), “condition 2” to the samples of control animals, and the ΔC_t of each “condition” is $C_t \text{ "experimental gene"} - C_t \text{ "endogenous gene"}$ (Livak and Schmittgen 2001; Schmittgen and Livak 2008). Standard deviation for each relative level of gene expression value was calculated as a measure of data variation. The significance of the RT-qPCR analysis results was determined using a one-tailed t-test for each gene, considering $|FC| > 1$ as significant ($p < .05$). Statistical analysis was performed using the SPSS_IBM software, version 25.0.0.0 (IBM Crp. and SPSS Inc., Chicago, IL, USA, RRID: SCR_002865).

Immunocytochemistry

Animals of group 3 and 4 were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of 6% sodium pentobarbitone (60 mg/kg b.w.) and perfused transcardially with 4% p-formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB).

Brains were dissected, post-fixed and serially sectioned in the coronal plane at with a sliding freezing microtome. Coronal serial sections (40 μm thickness) were immunostained for GluA2/3 AMPA R subunits in group 3, and in alternate serial sections for GAD67 and PV in group 4 (for a description of the antibodies see Table 2).

Our methodological approach was designed to examine markers investigated for gene expression by RT-qPCR and in parallel its synthesized protein by quantitative immunocytochemistry. Thus, we tested a set of antibodies for GABA receptor subunits; however, with the current panel of available commercial antibodies we did not obtain appropriate results for a valid quantitative immunocytochemical analysis.

In our staining procedure, paired sections from control and deafened animal groups were processed simultaneously in order to limit confusing differences in gray level measurements caused by immunocytochemical processing. Free-floating sections were washed in 0.1 M PB pH 7.6 and endogenous peroxidase activity was subsequently inhibited by incubation in 10% methanol + 3% H_2O_2 in 0.1 M PB for 10 min. Sections were washed in PB and 0.05 M Tris-buffered saline, pH 8.0 + Triton X-100, 0.5% (T9284 Sigma, St. Louis, MO, USA; TBS-Tx). Sections were then incubated in primary antisera (Table 2), for 48 hours at 4°C. Nonspecific labeling was blocked using fetal calf serum (10%). After washing three times in TBS-Tx, for 15 min, all sections were incubated with an anti-rabbit biotinylated secondary antibody (biotinylated anti-rabbit IgG H1L, BA-1000; Vector, Burlingame, CA, USA) at 1:200 dilution in TBS-Tx for 120 min at room temperature. Sections were then washed with TBS-Tx and incubated for 180 min in avidin/biotin peroxidase (ABC complex, Vectastain Standard ABC

kit PK-4000; Vector, Burlingame, CA, USA) and further with TBS-Tx, followed by Tris HCl, pH 8.0. They were then incubated in 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; D-9015; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 0.006% H₂O₂ and 0.4% nickel ammonium sulfate to visualize the peroxidase reaction. One section per case was used as a negative control, by processing without the primary antibody to test the specificity of the immunostaining detection system.

Quantitative immunocytochemistry

Panoramic mosaics of the entire cortex were captured from six coronal sections per case at fixed interaural coordinates (IA: 0.96, 2.16, 3.00, 4.20, 4.44, 4.80 - Paxinos and Watson coordinates). Digital photomicrographs (mosaics) were taken using a Leica DMRB microscope with a X10 objective (Leica Plan Apo). Mosaics were taken and assembled using the “Virtual slice” module of NeuroLucida 8.0 (MBF-Bioscience, Williston, Vermont, USA) and adjusting the microscope illumination source before each image capture by using a stepped density filter (11 levels) (© Eo Edmund industrial optics - ref 32599, Karlsruhe, Germany).

Photomicrographs of GluA2/3 AMPA R subunits and GAD67 immunostained sections were analyzed with Image J 2.0 software (USA; RRID:SCR_003070), using the default thresholding segmentation in order to measure optical density (OD) separately for the primary and secondary ACs and VCs.

PV immunostained sections displayed well defined contours of neurons (good background to noise relation) which enabled good delimitation of individual neurons by density gradient segmentation. Segmentation for PV immunoreactive sections was performed by using the maximum entropy thresholding algorithm (Gull and Skilling 1984; Bardera et al. 2009). The number of segmented neurons was normalized at N/ 10,000 μm².

The mean and standard deviation of gray levels were assessed globally in all sections to cancel out differences in immunostaining intensities within and among cases. Cases with average gray levels above or below the total mean gray level +/- the standard deviation (SD) were eliminated from the analysis (only in one case from group 3).

The boundaries of AC and VC were defined according to Paxinos and Watson atlas coordinates (Paxinos and Watson 2005). We followed Palomero-Gallagher and Zilles guidelines (Paxinos 2004) to define the AC and VC layers at any rostro-caudal level.

Immunocytochemistry statistical analysis

Statistical analysis was performed using the IBM® SPSS® software, version 25.0.0.0 (IBM Crp. and SPSS Inc., Chicago, IL, USA, RRID: SCR_002865). Quantitative values obtained in each section from every case were averaged separately for each sensory cortex: primary AC (AC1), secondary dorsal AC (ACD), secondary ventral AC (ACV), primary VC (VC1), secondary lateral VC (V2L) and secondary medial VC (V2M, which contain V2MM and V2ML). Differences between groups were analyzed by general linear model univariate analysis followed by the post hoc Scheffe-test and the Bonferroni test. Differences were considered significant at the $p < .05$ level.

RESULTS

Visual evoked potentials

By showing flat waves in ABRs with 90 dB click stimulation we ensure sensory deprivation at 90 days after cochlear puncture (90 days post lesion - dpl) (Fig. 1). VEPs from VC after a repetitive flash stimulation protocol allowed us to distinguish a primary (P1-N1) and a secondary component (P2-N2-P3) (Fig. 3a) as described by Creel et al. (1974). Figure 3a shows a representative VEP from a control animal (top) and a deaf one at 90 dpl (bottom); the increase in the VEP in the deafened animal is evident by visual comparison.

For the whole population (n=6) a significant increase of 156.39% was shown after comparing the mean of amplitudes between control and bilateral deafened animal groups (deafened animals mean N1 wave amplitude \pm SE = 0.0062 ± 0.0004 mV versus 0.0024 ± 0.000022 mV in control ones) (Fig. 3b). No differences in N1 mean latency between groups were obtained (Fig. 3c). These results are compatible with a long-term increased activation of VC in deafened animals.

RT-QPCR analysis

Tissue samples from AC and VC were obtained using our 3D printed mask apposed on the surface of the brain cortex (please see material and methods section) (Fig. 2). After superimposing drawings from the Paxinos atlas over the Nissl staining sections, empty areas of tissue extraction were always shown inside the cytoarchitectural limits of AC and VC (Figs. 2e and f). This approach allowed to ensure RT-qPCR tissue samples for analyzing the expression levels of selected group of genes (*Arc/Arg3.1*, *c-Fos*, *GluA2*, *Gad65*, *Gad67*, *Gabaa- α 1*, *Gabab-r2* and *Parvalbumin*) separately for the AC and the VC.

In the deafened animals of experimental group 2, the expression level showed a significant increase for *c-Fos* (fold change 1.96 – $p < .01$) (Fig. 4a) and *Arc/Arg3.1* (fold change 1.46 – $p < .05$) in the VC (Fig. 4b).

The expression level of *GluA2* AMPA R subunit showed a statistically significant increase of 1.42-fold ($p < .05$) in the AC but not in the VC (Fig. 4c). Levels of *Gad65* and *Gad67* significantly increased respectively 1.59- and 1.99- fold change ($p < .01$) in the AC of the deafened animals from group 2 (Figs. 4d and e). However, AC and VC did not show any significant change after RT-qPCR analysis for *Gabaa- α 1*, *Gabab-r2* or *Parvalbumin* by comparing controls with the hearing deprived animal group (Figs. 4f to h).

Immunocytochemistry

GluA2/3 AMPA receptor subunits

GluA2/3 AMPA R subunits immunostaining was observed throughout the cortex with differences in immunostaining which allowed us to distinguish layers and cytoarchitectural subdivisions of ACs and VCs. (Fig. 5a dotted lines in coronal sections from control and deaf animal). Immunoreactivity was denser in the soma and dendrites of medium and large pyramidal neurons in layers 2/3 and 5 when comparing deafened animals (Figs. 5b and c) with controls (Figs. 5d and e). In layers 2/3 of sections from deafened animals the increase in density of immunoreactivity was very high, making impossible to perform density gradient segmentation (Fig. 5b).

An increased immunoreactivity in layer 5 in large pyramidal neurons was also evident (Fig. 5c - arrow). Due to difficulties in individual neuronal segmentation, analysis of OD values was measured as the whole for immunostained cytoarchitectural subdivisions of primary and secondary AC and VC. From all subdivisions analyzed, only OD values of AC1 and ACD were statistically significantly increased in the deafened animal (Fig. 5f). However, no significant differences were observed in any of the other analyzed cortices between controls and deafened animals (Fig. 5f).

GAD67

Microscopically, a denser immunoreactive neuropil in layers 2/3 and 5 allowed us to define cortical layers and cytoarchitectural subdivisions along the cortex (Fig. 6a). In particular, AC1 and VC1 were easily distinguished due to their darker immunostaining compared with the surrounding secondary subdivisions (Fig. 6a in both coronal sections from control and deaf animal). The majority of immunoreactive neurons shown in our material could be identified as medium and large interneurons (details in Fig. 6b).

In sections from the deafened animal, AC1 and VC1 exhibited denser immunoreactive neuronal soma and neuropil, mainly in layers 3 and 5 (Fig. 6b). Quantitative immunocytochemical analysis permitted confirmation that both primary and secondary areas of AC showed statistically significant higher values of normalized OD in the deafened animal group (Fig. 6c). However, in the VC, only VC1 showed a statistically significant increase (Fig. 6c).

Parvalbumin

Microscopically, PV immunostained sections showed small and medium sized labeled cell bodies and dendrites allowing us to identify the majority of stained neurons as medium and large interneurons along layers (Figs. 7a to c). Immunoreactive terminals are usually seen to be denser and more abundant in the neuropil of layers 2/3 and 5 (Fig. 7a in coronal sections from control and deaf animal) and around medium and large infragranular pyramidal neurons, which was more evident in layer 5 (Figs. 7b and c arrows). Immunoreactive somata were observed, distributed homogenously along cortical subdivisions interspersed across all layers (Figs. 7b and c in AC1 details). In particular, AC1 and VC1 stood out from other cortical subdivisions, including secondary cortices, by their denser PV immunoreaction (higher in the AC1). An increased PV immunoreactivity was observed by microscopic inspection in the neuropil of AC in the sections from the deafened animal group (comparison between Figs. 7b and c). Nevertheless, these differences were not significant when OD values of the AC and VC subdivisions taken as a whole were compared morphometrically (data not shown). However, the good signal to noise (background to immunostaining) ratio of PV positive neurons (Figs. 7b and c, AC1 details) allowed an easy segmentation of neurons by density gradients. After neuronal counting analysis, a significant increase of PV immunoreactive neurons was shown in the AC1 of deafened animals (90 dpl) (Fig. 7d).

DISCUSSION

We demonstrated an increase in VC activity at 90 days after bilateral cochlear puncture evidenced by significant increases in c-Fos expression and in wave N1 amplitudes of VEP recordings. Such an increase has been shown to coincide with an overexpression of Arc/Arg3.1 in the VC, an early gene which is involved in homeostatic plasticity compensation of neuronal network. All these functional and structural changes in the VC were simultaneous with an imbalance in excitation and inhibition in the AC, affecting pyramidal neurons as well as PV interneurons, as shown by the molecular markers we used.

Visual cortex plastic reaction

In congenital deafness (Neville et al. 1983) and after acquired hearing loss (Campbell and Sharma 2014), VEPs recordings showed increases of N1 wave amplitude, suggesting VC overactivation after long-term deafness in humans. In our experimental animal model, the mean of peak to peak N1 wave amplitude was 156.39% higher in deafened animals than in controls. N1 wave amplitude after VEP recordings reflects a higher global electrical responses and VC overactivation after visual stimulation.

c-Fos is a marker for neuronal activity which is rapidly induced after neuronal depolarization (Greenberg et al. 1986; Morgan and Curran 1988; Bartel et al. 1989; Joo et al. 2016). Accordingly, VC increased activation is reinforced by showing overexpression of the activity-dependent early gene c-Fos (present results) and by the significant increases in immunoreactive neurons in the VC shown previously by us (Pernia et al. 2017). Furthermore, a link between Arc/Arg3.1 expression and neuronal electrical activity has been demonstrated by induction of this gene after high frequency stimulation of the hippocampus (Lyford et al. 1995; Steward et al. 1998; Steward et al. 2015). Thus, indirect evidence for VC overactivation in our animal model arises from significant increases in expression of activity-dependent early genes c-Fos and Arc/Arg3.1.

Homeostatic plasticity of brain neuronal network regulation implies that any change in its activation may induce a response in regulation of receptor synthesis, trafficking and internalization, which work in combination to adjust synaptic strength and/or neuronal membrane excitability to a prefixed balanced set point of functioning (Turrigiano et al. 1998 - for review see Perez-Otaño and Ehlers 2005).

An increase in Arc/Arg3.1 immunoreactivity (Pernia et al. 2017) and in its gene expression (present data) has been shown in the VC in combination with increases in electrical activation, as shown by VEPs. The role of Arc/Arg3.1 in balancing excitability of neuronal networks by AMPA R regulation was analyzed in mice hippocampal slices, showing that, after electric stimulation, Arc/Arg3.1 mediates removal of GluA2/3 AMPA R subunits from the neuronal membrane and reduces the EPSCs amplitude (Rial-Verde et al. 2006). In our results, increases in activation and Arc/Arg3.1 expression in the VC do not seem to coincide with any changes of GluA2 and GluA3 AMPA R subunits. Accordingly, with their well-recognized role in synaptic plasticity regulation, the increase in Arc/Arg3.1 would suggest a homeostatic molecular feedback compensation for VC neuronal networks stabilization after overactivation (Rial-Verde et al. 2006; Bramham et al. 2008; Wall and Correa 2018). In our results from all the neuronal markers explored in the VC, we only found an increase of GAD67 immunostaining restricted to VC1 with no changes in gene expression in VC analyzed as a whole. Because VC1 is the main recipient for visual primary thalamic inputs (Kharazia and Weinberg 1994), this single change could

be interpreted as a reactive response to changes in thalamocortical activation after deafness. Indeed, increased EPSC amplitude in VC1 layer 4 has been shown after deafness by recordings in mice brain slices, which is in accordance with a potential overactivation of visual thalamic primary afferents after deafness (Petrus et al. 2014). Triggers for VC overactivation and homeostatic responses must be searched, both in changes in the visual thalamic drivers' regulation (suggested by restricted markers reactivity in VC1) and in AC horizontal imbalanced interactions, supported by increases in GluA2/3 AMPA R subunits immunocytochemistry shown in our material, specifically in layers 2/3 and 5.

Auditory cortex plastic reaction

It has been shown that the short-term loss of auditory inputs due to noise overexposure induce an increase in amplitudes of auditory evoked potentials in guinea pigs, which suggest a functional gain enhancement of the AC after hearing deprivation (Popelar et al. 1987). Similar increases have also been observed in chinchillas after damaging inner hair cells by ototoxicity (Qiu et al. 2000). By extracellular electrophysiological field recordings 2 weeks after auditory deprivation by traumatic noise-exposure, hyperactivity of the AC was also demonstrated in rats, shown by increases of the auditory-evoked sink amplitudes in the secondary dorsal AC (Schormans et al. 2017). It has been shown that hearing loss in cochlear ablated gerbils also raises excitability in layers 2/3 of AC, demonstrating increases of EPSC amplitude by whole-cell recording in brain slices (Kotak et al. 2005). Moreover, after visual deprivation in mice, an upregulation in gene expression for GluA2 and GluA3 AMPA R subunits in the VC has been demonstrated (Tropea et al. 2006). Changes in GluA1 - GluA2 AMPA R subunits, along with increased amplitude of spontaneous EPSCs in VC layers 2/3 pyramidal cells, have been shown in rats by immunoblot, which would indicate an increased cortical excitability in horizontal neuronal connections also after visual deprivation (Goel et al. 2006). In the AC of our deafened animals, an increased cellular stock of GluA2/3 AMPA R subunits in pyramidal neurons of layers 2/3 and 5 is evidenced by significantly higher OD values of immunoreactive product and by microscopic inspection of sections (Fig. 5c). However, to evaluate if these results effectively reflect increased excitability of the AC in our animal model, an *in vivo* combination of molecular analysis and recordings in the AC after thalamic implantation of stimulation electrodes will be necessary.

It is known that layers 2/3 and 5 are the main recipient for horizontal crossmodal circuits in the brain cortex (Paperna and Malach 1991; Ibrahim et al. 2016). It has also been seen that horizontal connections are able to regulate crossmodal activation, by the demonstration of elicited EPSCs in pyramidal and PV interneurons in the VC layers 2/3 after light spot stimulation of the AC axons (Ibrahim et al. 2016). As mentioned above, recordings made in brain slices after visual (Goel et al. 2006) or auditory deprivation (Kotak et al. 2005) showed increased excitability of layers 2/3 neurons. Our data suggest that the resultant overactivation of VC (as shown by our VEP analysis) in our model may be related to increased excitability of layers 2/3 and 5 of the AC, as was indicated, albeit indirectly, by our results of AMPA R subunits analysis. However, it is well known that balance in sensory cortex stimulation arises as a consequence of the interplay of horizontal connectivity and thalamic inputs, which in fact drives the cortical response and triggers plastic crossmodal changes. Indirect evidence of plastic effect in evolution along time of thalamic drivers in deafness was previously found in our model after analyzing c-Fos

immunoreactive neurons (Pernia et al 2017). In these previous results, the AC was seen to be practically devoid of positive neurons at 15 days after deafness; however, the number of immunopositive neurons increases at 90 days after deafness specifically in layers 4 and 6, suggesting a thalamic reactivation in the long term in our model (Pernia et al. 2017).

In our material, markers for inhibition (*Gad 65* and *67*) in the AC increases in group 4 of deafened animals. GABA neurotransmitter is synthesized by decarboxylation of glutamate by GAD (Roberts and Frankel 1950), which coexists in neurons as two major isoforms (*GAD65* and *GAD67*) (Esclapez et al. 1994). GAD is widely accepted as a marker for GABA inhibitory neurotransmission in the brain cortex (Ribak 1978; Peters et al. 1982). Accordingly, upregulation of *Gad65* and *Gad67* gene expression found only in the AC (Figs. 4d and e) would indicate a rebound in GABA synthesis in the AC, probably as a result of compensation, after VC horizontal crossmodal overstimulation. Such GAD rebound in gene expression, and consequently an increased inhibition, was confirmed also for protein synthesis in primary and secondary AC, after showing significant increase of its OD values in immunostained sections (Fig. 6c). In summary, changes shown by us, speak in favor of a global increase in GABA inhibition in the AC after permanent long-term hearing loss. However, no significant changes were detected by RT-qPCR in GABA receptors (*Gabaa-a1* and *Gabab-r2*) gene expression. GABAA ionotropic receptors have rapid rates of constitutive endocytosis (Kittler and Moss 2003; Kittler et al. 2005). Also, GABAB metabotropic receptors present a fast-constitutive internalization (Maier et al. 2010; Hannan et al. 2011), whose rate appears to depend on the GABAB-R2 subunit (Duthey et al. 2002; Margeta-Mitrovic et al. 2001; Hannan et al. 2011). After depolarizing conditions by electric stimulation in cultured neurons, increases of GABAA receptor subunit on the membrane surface occur without changes of the total quantity of protein, suggesting an increase of subunit trafficking without changes in transcription or synthesis (Rannals and Kapur 2011). Additionally, it has been observed in cortical cell cultures that activation of AMPA glutamate receptors induces a downregulation of GABAB receptors shown by western blot (Maier et al. 2010). Thus, by rates of internalization and recycling of these receptors, increased inhibition, as shown by GAD analysis, may occur with no relevant changes in gene expression of GABA receptor subunits as shown by our RT-qPCR results.

Immunocytochemistry for calcium binding proteins (Celio 1986; Celio 1990) and neuropeptides (Hendry et al. 1984) (PV, Calbindin/somatostatin and calretinin/vasointestinal peptide) identified three main phenotypes for GABA interneurons in the cerebral cortex (Kawaguchi and Kubota 1997). As shown by quantitative immunohistochemistry in rat cerebral cortex, about 40% of interneurons are immunoreactive to PV (Celio 1986; Lee et al. 2010; please see a review in Rudy et al. 2011). Moreover, it has been shown that PV reactive interneurons will correlate with the classical neuronal types of Basket and Chandelier cells (Kawaguchi and Kubota 1997). Thus, in our PV quantitative immunocytochemical analysis we have explored approximately 40% of GABA interneurons of VC and AC and the two major short axon neuronal types involved in inhibitory regulation of cortical columns (Basket and Chandelier neurons). After demonstrating, by depolarizing current pulse and whole-cell recordings in rat brain slices, that PV cells have short-duration action potentials and fire repetitively without frequency adaptation, they were called fast-spiking (FS) neurons (Kawaguchi 1993; Kawaguchi and Kubota 1993). That fast spiking parvalbumin positive (FS-PV) interneurons closely regulate the discharge rate of pyramidal neurons was

well demonstrated with electrophysiology by paired patch clamp recordings in brain slices of cat VC (Tamás et al. 1997). Similar tight regulation has been shown after *in vivo* patch clamp recordings following optogenetic stimulation of Arch virus (Atallah et al. 2012). The FS property of these interneurons is due to the high calcium affinity of the PV, which responds to increases in neuronal firing rate by buffering intracellular free Ca^{2+} concentration (Chard et al. 1993). Consequently, significant increases in the number of FS-PV interneurons, as shown by us in the AC, would indicate that neuronal soma and dendrites are best detected by their higher immunoreactivity as a result of an increased activation. Such an assertion is also supported by experiments made in rat hippocampal slices, by showing that a reduced Ca^{2+} inflow in FS-PV neurons by calcium chelators, decrease IPSCs amplitude of pyramidal neurons (Bucurenciu et al. 2008). Due to the common phenotype of FS-PV and GABA neurons (Kawaguchi and Kubota 1997) and the known functional role of these interneurons, the increase in immunoreactivity of FS-PV interneurons that we demonstrated could be related to an increase in GABA neurotransmission and in fact reinforces increased inhibition in the AC. However, as we explained above, a global rise in inhibition is primarily supported by GAD increases, both in gene expression and its immunoreactivity in the AC.

CONCLUDING REMARKS AND WORKING HYPOTHESIS

Our data indicate that, after permanent hearing loss in the rat, VC is overactivated but also potentially balanced by a homeostatic regulation of its neuronal networks. Furthermore, the changes in molecular markers for excitation and inhibition that we have demonstrated leads us to conclude that a long-term persistent unbalanced neuroplasticity reaction occurs in the AC, most probably as a consequence to changes in horizontal intermodal feedbacks.

To establish a causal relationship between changes shown in both sensory cortices paired recordings from thalamic / AC and AC / VC should be made in the future in our animal model.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving animals/ethical approval

All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted. The project received the Spanish (Royal Decree 53/2013 - Law 32/2007) and European Union (Directive 2010/63/EU). Protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of Salamanca (Permit Number: 2012-265).

REFERENCES

- Allman BL, Keniston LP, Meredith MA (2009) Adult deafness induces somatosensory conversion of ferret auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci* 106:5925–5930. doi: 10.1073/pnas.0809483106
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-

- PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64:5245-5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Atallah BV, Bruns W, Carandini M, Scanziani M (2012) Parvalbumin-expressing interneurons linearly transform cortical responses to visual stimuli. *Neuron* 73:159–170. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.013
- Bardera A, Boada I, Feixas M, Sbert M (2009) Image segmentation using excess entropy. *J Signal Process Syst* 54:205–214. doi: 10.1007/s11265-008-0194-6
- Bartel DP, Sheng M, Lau LF, Greenberg ME (1989) Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev* 3:304–313. doi: 10.1101/gad.3.3.304
- Bizley JK, Nodal FR, Bajo VM, et al (2007) Physiological and anatomical evidence for multisensory interactions in auditory cortex. *Cereb Cortex* 17:2172–2189. doi: 10.1093/cercor/bhl128
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The immediate early gene *Arc/Arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28:11760–11767. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3864-08.2008
- Bucurenciu I, Kulik A, Schwaller B, et al (2008) Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and Ca²⁺ sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron* 57:536–545. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.026
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189–198. doi: 10.1016/0896-6273(92)90120-3
- Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N (2005) Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol* 5:1–13. doi: 10.1186/1472-6750-5-31
- Campbell J, Sharma A (2014) Cross-modal re-organization in adults with early stage hearing loss. *PLoS One* 9:e90594. doi: 10.1371/journal.pone.0090594
- Celio MR (1986) Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231:995-997. doi: 10.1126/science.3945815
- Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475. doi: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90091-H](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-H)
- Chard PS, Bleakman D, Christakos S, et al (1993) Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J Physiol* 472:341–357. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019950
- Creel D, Dustman RE, Beck EC (1974) Intensity of flash illumination and the visually evoked potential of rats, guinea pigs and rats. *Vision Res* 14:725-729. doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(74\)90070-4](https://doi.org/10.1016/0042-6989(74)90070-4)
- Curran T, Morgan J, (1995) Fos: An immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol* 26: 403-412. doi: 10.1002/neu.480260312
- Desgent S, Boire D, Ptito M (2010) Altered expression of parvalbumin and calbindin in interneurons within the primary visual cortex of neonatal enucleated hamsters. *Neuroscience* 171:1326–1340.

- doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.10.016
- Duthey B, Caudron S, Perroy J, et al (2002) A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABAB receptor. *J Biol Chem* 277:3236–3241. doi: 10.1074/jbc.M108900200
- Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, et al (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 14:1834–55. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01834.1994>
- Finney EM, Fine I, Dobkins KR (2001) Visual stimuli activate auditory cortex in the deaf. *Nat Neurosci* 4:1171–1173. doi: 10.1038/nm763
- Firzlaff U, Schuller G (2001) Motion processing in the auditory cortex of the rufous horseshoe bat: role of GABAergic inhibition. *Eur J Neurosci* 14:1687–1701. doi: <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01797.x>
- Fleige S, Walf V, Huch S, et al (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28:1601–1613. doi: 10.1007/s10529-006-9127-2
- Goel A, Jiang B, Xu LW, et al (2006) Cross-modal regulation of synaptic AMPA receptors in primary sensory cortices by visual experience. *Nat Neurosci* 9:1001–1003. doi: 10.1038/nm1725
- Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234:80–83. doi: 10.1126/science.3749894
- Gull SF, Skilling J (1984) Maximum entropy method in image processing. *IEE Proc F Commun Radar Signal Process* 131:646–659. doi: 10.1049/ip-f-1.1984.0099
- Hannan S, Wilkins ME, Dehghani-Tafti E, et al (2011) γ -aminobutyric acid type B (GABAB) receptor internalization is regulated by the R2 subunit. *J Biol Chem* 286:24324–24335. doi: 10.1074/jbc.M111.220814
- He HY, Rasmusson DD, Quinlan EM (2004) Progressive elevations in AMPA and GABAA receptor levels in deafferented somatosensory cortex. *J Neurochem* 90:1186–1193. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02590.x
- Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, et al (1984) Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc Natl Acad Sci* 81:6526–6530. doi: 10.1073/pnas.81.20.6526
- Ibrahim LA, Mesik L, Ji X ying, et al (2016) Cross-modality sharpening of visual cortical processing through layer-1-mediated inhibition and disinhibition. *Neuron* 89:1031–1045. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.027
- Iurilli G, Ghezzi D, Olcese U, et al (2012) Sound-driven synaptic inhibition in primary visual cortex. *Neuron* 73:814–828. doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.026
- Joo JY, Schaukowitz K, Farbiak L, et al (2015) Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nat Neurosci* 19:75–83. doi: 10.1038/nn.4170
- Kawaguchi Y (1993) Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 69:416–431. doi: 10.1152/jn.1993.69.2.416

- Kawaguchi Y, Kubota Y (1993) Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 70:387–396. doi: 10.1152/jn.1993.70.1.387
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476–486. doi: 10.1093/cercor/7.6.476
- Kharazia VN, Weinberg RJ (1994). Glutamate in thalamic fibers terminating in layer IV of primary sensory cortex. *J Neurosci* 14: 6021-6032. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-10-06021>
- Kittler JT, Chen G, Honing S, et al (2005) Phospho-dependent binding of the clathrin AP2 adaptor complex to GABAA receptors regulates the efficacy of inhibitory synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci* 102:14871–14876. doi: 10.1073/pnas.0506653102
- Kittler JT, Moss SJ (2003) Modulation of GABA receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: Implications for the efficacy of synaptic inhibition. *Curr Opin Neurobiol* 13:341–347. doi: 10.1016/S0959-4388(03)00064-3
- Kok MA, Chabot N, Lomber SG (2014) Cross-modal reorganization of cortical afferents to dorsal auditory cortex following early- and late-onset deafness. *J Comp Neurol* 522:654–675. doi: 10.1002/cne.23439
- Kotak VC, Fujisawa S, Lee FA, et al (2005) Hearing loss raises excitability in the auditory cortex. *J Neurosci* 25:3908–18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5169-04.2005
- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zaghera E, et al (2010) The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30:16796–808. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1869-10.2010
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔT} method. *Methods* 25: 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, et al (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433–445. doi: 10.1016/0896-6273(95)90299-6
- Maier PJ, Marin I, Grampp T, et al (2010) Sustained glutamate receptor activation down-regulates GABAB receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation. *J Biol Chem* 285:35606–35614. doi: 10.1074/jbc.M110.142406
- Makowiecki K, Garrett A, Clark V, et al (2015) Reliability of VEP Recordings Using Chronically Implanted Screw Electrodes in Mice. *Transl Vis Sci Technol* 4:15. doi: 10.1167/tvst.4.2.15
- Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY (2001) Function of GB1 and GB2 subunits in G protein coupling of GABAB receptors. *Proc Natl Acad Sci* 98:14649–14654. doi: 10.1073/pnas.251554498
- Meredith MA, Lomber SG (2011) Somatosensory and visual crossmodal plasticity in the anterior auditory field of early-deaf cats. *Hear Res* 280:38–47. doi: 10.1016/j.heares.2011.02.004
- Morgan JJ, Curran T (1988) Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. *Cell Calcium* 9:303–311. doi: 10.1016/0143-4160(88)90011-5
- Neville HJ, Schmidt A, Kutas M (1983) Altered visual-evoked potentials in congenitally deaf adults. *Brain Res* 266:127–132. doi: 10.1016/0006-8993(83)91314-8
- Otsuka T, Kawaguchi Y (2009) Cortical inhibitory cell types differentially form intralaminar and

- interlaminar subnetworks with excitatory neurons. *J Neurosci* 29:10533–10540. doi: 10.1523/jneurosci.2219-09.2009
- Paperna T, Malach R (1991) Patterns of sensory intermodality relationships in the cerebral cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:432–456. doi: 10.1002/cne.903080310
- Paxinos G (2004) *The rat nervous system*. Sydney, Australia
- Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, USA
- Pérez-Otaño I, Ehlers MD (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 28:229–238. doi: 10.1016/j.tins.2005.03.004
- Pernia M, Estevez S, Poveda C, et al (2017) c-Fos and Arc/Arg3.1 expression in auditory and visual cortices after hearing loss: Evidence of sensory crossmodal reorganization in adult rats. *J Comp Neurol* 525:2677–2689. doi: 10.1002/cne.24233
- Peters A, Proskauer CC, Ribak CE (1982) Chandelier cells in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 206:397–416. doi: 10.1002/cne.902060408
- Petrus E, Isaiah A, Jones AP, et al (2014) Crossmodal induction of thalamocortical potentiation leads to enhanced information processing in the auditory cortex. *Neuron* 81:664–673. doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.023
- Popelář J, Syka J, Berndt H (1987) Effect of noise on auditory evoked responses in awake guinea pigs. *Hear Res* 26:239–247. doi: 10.1016/0378-5955(87)90060-8
- Qiu CX, Salvi R, Ding D, Burkard R (2000) Inner hair cell loss leads to enhanced response amplitudes in auditory cortex of unanesthetized chinchillas: Evidence for increased system gain. *Hear Res* 139:153–171. doi: 10.1016/S0378-5955(99)00171-9
- Rannals MD, Kapur J (2011) Homeostatic strengthening of inhibitory synapses is mediated by the accumulation of GABAA receptors. *J Neurosci* 31:17701–17712. doi: 10.1523/jneurosci.4476-11.2011
- Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PFF, et al (2006) Increased expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron* 52:461–474. doi: 10.1016/j.neuron.2006.09.031
- Ribak CE (1978) Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol* 7:461–478. doi: 10.1007/BF01173991
- Roberts E, Frankel S (1950) γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187:55–63. doi: <http://www.jbc.org/content/187/1/55.citation>
- Rudy B, Fishell G, Lee SH, Hjerling-Leffler J (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71:45–61. doi: 10.1002/dneu.20853
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3:1101–8. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Schormans AL, Typlt M, Allman BL (2017) Crossmodal plasticity in auditory, visual and multisensory cortical areas following noise-induced hearing loss in adulthood. *Hear Res* 343:92–107. doi: 10.1016/j.heares.2016.06.017
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571–582. doi:

10.1016/0896-6273(90)90115-V

- Song I, Huganir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trend Neurosci* 25:578-588. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02270-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02270-1)
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751. doi: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80591-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80591-7)
- Steward O, Farris S, Pirbhoy PS, et al (2015) Localization and local translation of Arc/Arg3.1 mRNA at synapses: some observations and paradoxes. *Front Mol Neurosci* 7:1–15. doi: [10.3389/fnmol.2014.00101](https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00101)
- Tamás G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurone in the cat visual cortex. *J Physiol* 500:715–738. doi: [10.1113/jphysiol.1997.sp022054](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp022054)
- Tanaka H, Grooms SY, Bennett MVL, Zukin RS (2000) The AMPAR subunit GluR2: Still front and center-stage. *Brain Res* 886:190–207. doi: [10.1016/S0006-8993\(00\)02951-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02951-6)
- Teichert M, Bolz J (2018) How Senses Work together: Cross-modal interactions between primary sensory cortices. *Neural Plast* 2018:1–11. doi: [10.1155/2018/5380921](https://doi.org/10.1155/2018/5380921)
- Tremere L, Hicks TP, Rasmusson DD (2001) Expansion of receptive fields in raccoon somatosensory cortex in vivo by GABA A receptor antagonism: implications for cortical reorganization. *Exp Brain Res* 136:447–455. doi: [10.1007/s002210000612](https://doi.org/10.1007/s002210000612)
- Tropea D, Kreiman G, Lyckman A, et al (2006) Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci* 9:660–668. doi: [10.1038/nn1689](https://doi.org/10.1038/nn1689)
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, et al (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-896. doi: [10.1038/36103](https://doi.org/10.1038/36103)
- Wall MJ, Corrêa SAL (2018) The mechanistic link between Arc/Arg3.1 expression and AMPA receptor endocytosis. *Semin Cell Dev Biol* 77:17–24. doi: [10.1016/j.semcdb.2017.09.005](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.005)

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 An example of auditory brainstem recordings made before surgery (left) and 90 days after cochlear puncture (90 days post lesion - right). No waves were detected after click stimulus presentations from 10 to 90 dB, which ensure long-term deafness of the animals in our model of bilateral hearing deprivation

Fig. 2 Method for printing a 3D mold of the rat brain, designed for a precise and controlled tissue extraction of separate samples from auditory cortex (AC) and visual cortex (VC). **(A)** Digitized stacked drawings from coronal serial sections obtained from Paxinos atlas. Please note holes defined for delimiting AC (in blue) and VC (in green) in the stack reconstruction. **(B)** Resultant solid model after 3D printing of the mask. Surface holes precisely delimits AC) and VC. **(C)** Tissue extraction procedure. Printed mask was placed carefully on the brain surface. For defining a correct position of the matrix respect to stereotaxic coordinates, a guide needle was inserted in interaural (IA) 0.00 in the brain (arrow).

(D) Mask and brain together were immersed in liquid nitrogen. After careful demarcation with a small scalpel, AC and VC (arrows) were delineated on the surface of the brain before tissue extraction. (E) Method of checking the accuracy of tissue extraction. Example of a coronal Nissl stained section after AC and VC extraction guided by the 3D mask. (F) Superimposition to the section silhouette of cytoarchitectural landmarks taken from an equivalent IA section of Paxinos atlas. This approach allows confirmation of precision and accuracy of the extraction of the two sensory cortices in separate samples for RT-qPCR analysis. AC1 primary auditory cortex, ACD dorsal auditory cortex, ACV ventral auditory cortex, VC1 primary visual cortex, V2MM secondary medio medial visual cortex, V2ML secondary mediolateral visual cortex, LV lateral ventricle

Fig. 3 (A) Representative VEP recording of control (top) and deafened animal at 90 days post lesion (90 dpl) (bottom). N1 wave amplitude (by peak to peak voltage measurements) increases three-fold after long-term deafness. (B) Graphic representation of the mean N1 wave amplitude, standard error and statistical analysis of N1 after hearing deprivation (control animals n = 3; deafened animals n = 6; *= p < .05; **= p < .01). These data confirm a significant increase in N1 wave amplitude in our animal model. (C) Bar representation of mean N1 wave latencies, standard error and statistical analysis of N1 after hearing deprivation (control animals n = 3; deafened animals n = 6; *= p < .05; **= p < .01)

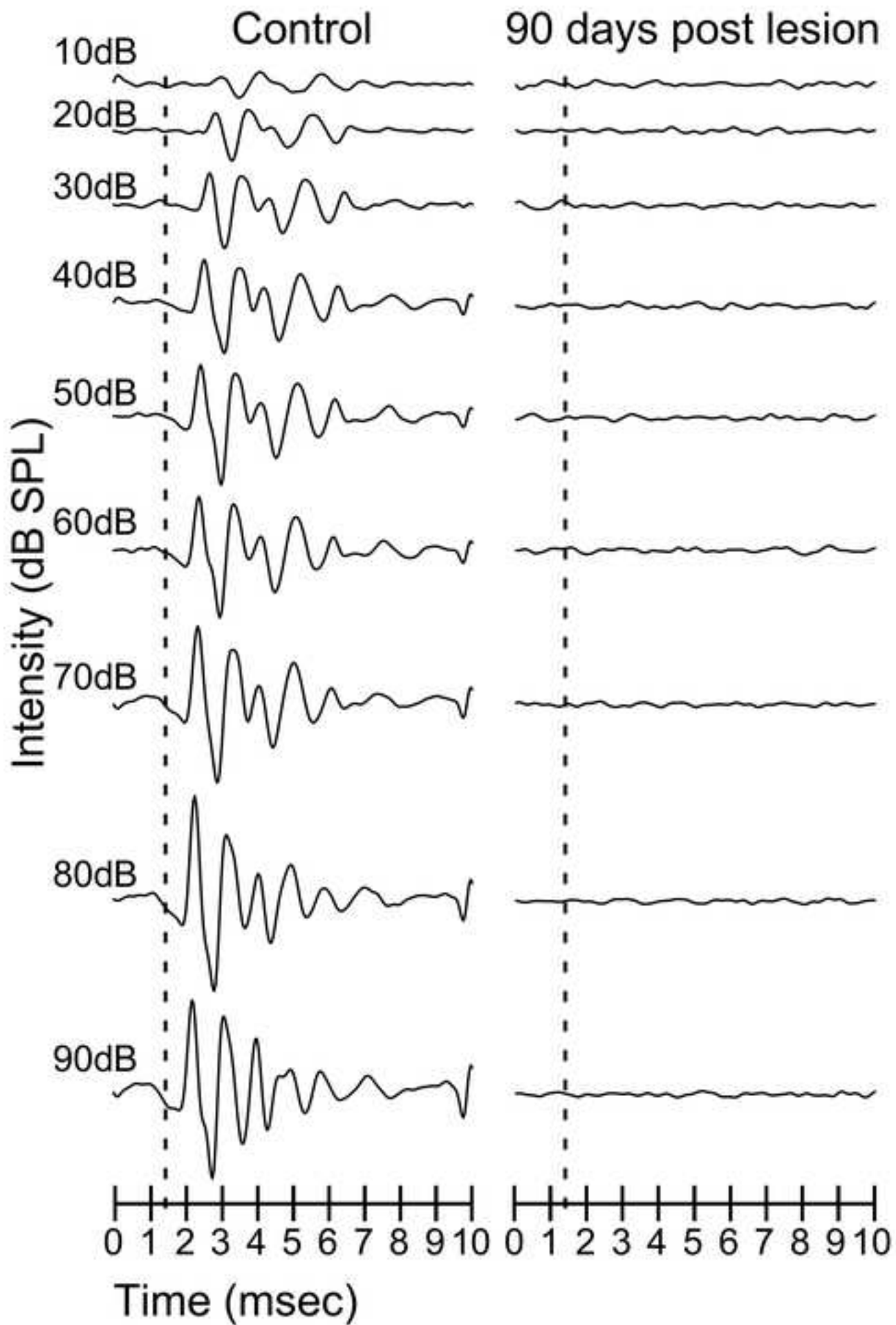
Fig. 4 (A) Bar charts illustrating changes in mRNA levels of genes in control (white columns) and deafened group (gray columns) at 90 days post lesion (90 dpl). Results are represented by the mean ± standard error of the fold change. Asterisks represent statistically significant differences between groups (*= p < .05; **= p < .01). Activity-dependent early genes (A) *c-Fos* and (B) *Arc/Arg3.1*. (C) *GluA2* AMPA receptor (AMPA R) subunit, (D) *Gad65*, (E) *Gad67*, (F) *Gabaa-α1* subunit, (G) *Gabab-r2* subunit, (H) *Parvalbumin*

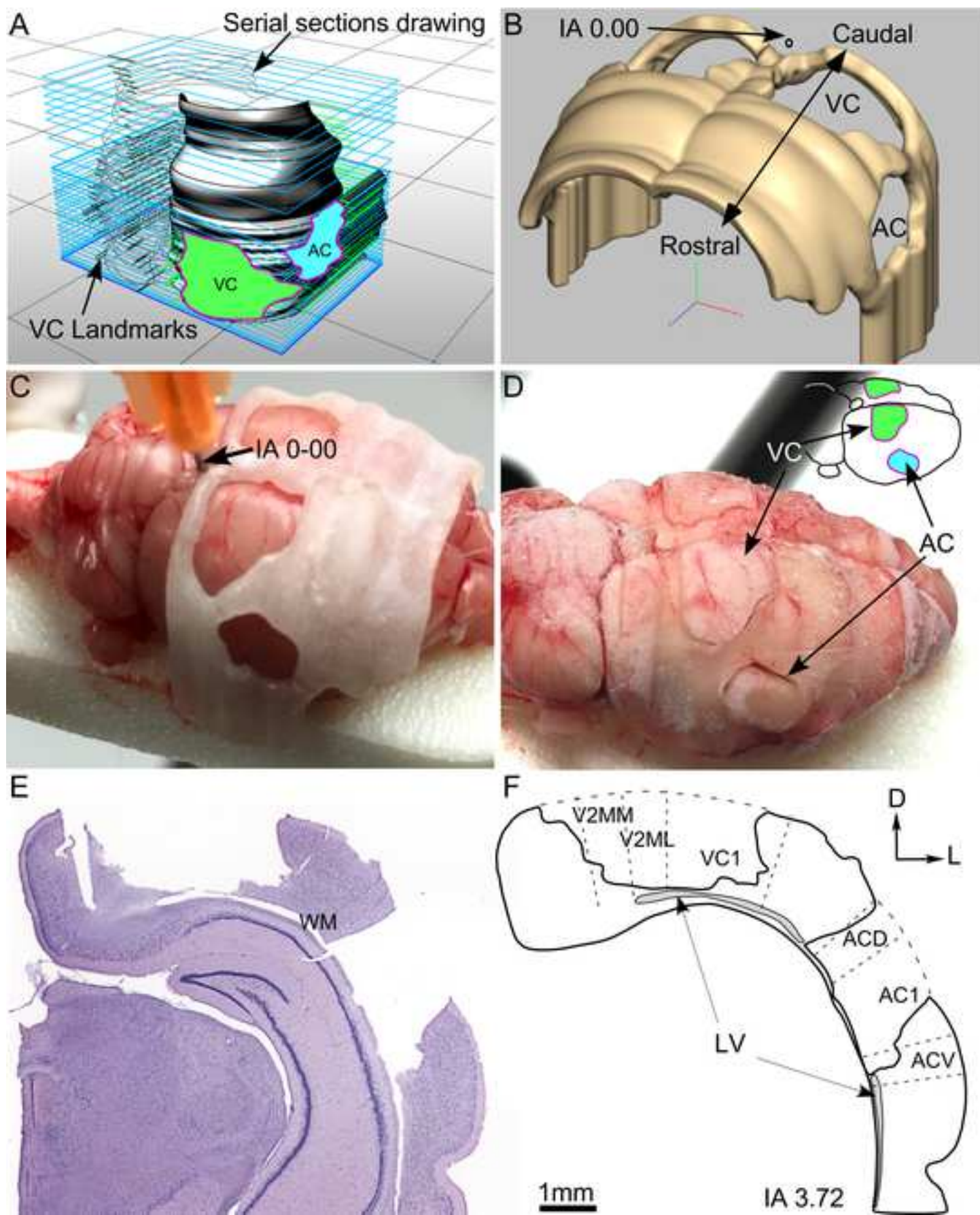
Fig. 5 (A) Representative GluA2/3 AMPA receptor (R) subunits immunostained coronal sections from control and deafened group at 90 days post lesion (90 dpl) at an equivalent rostro caudal level (IA 3.60). Square inset labels the areas of layers L2/3 and L5 shown at a higher magnification in (B to E). (B to E) Details of primary auditory cortex (AC1). Notice a global increase in immunoreactivity of pyramidal cells (C - arrow) after comparing section of deprived animals (B and C) with its controls (D and E) immunostained in parallel. (F) Bar charts illustrate quantitative changes in normalized optical density (OD) of GluA2/3 AMPA R subunits immunoreactivity in auditory cortex (AC) (left) and visual cortex (VC) (right) of control (white columns) and deafened group at 90 dpl (gray columns). Quantitative analyses were made separately for AC1, secondary ventral AC (ACV), secondary dorsal AC (ACD), primary VC (VC1), secondary lateral VC (V2L) and secondary medial VC (V2M, which contain V2MM and V2ML). Asterisks represent statistically significant differences between groups (*= p < .05; **= p < .01). Results are represented by the mean ± standard error. Sections from each experimental group were incubated simultaneously with their own controls to cancel out differences in intensity measurements caused by differences in processing. GluA2/3 AMPA R subunits OD analysis shows a significant

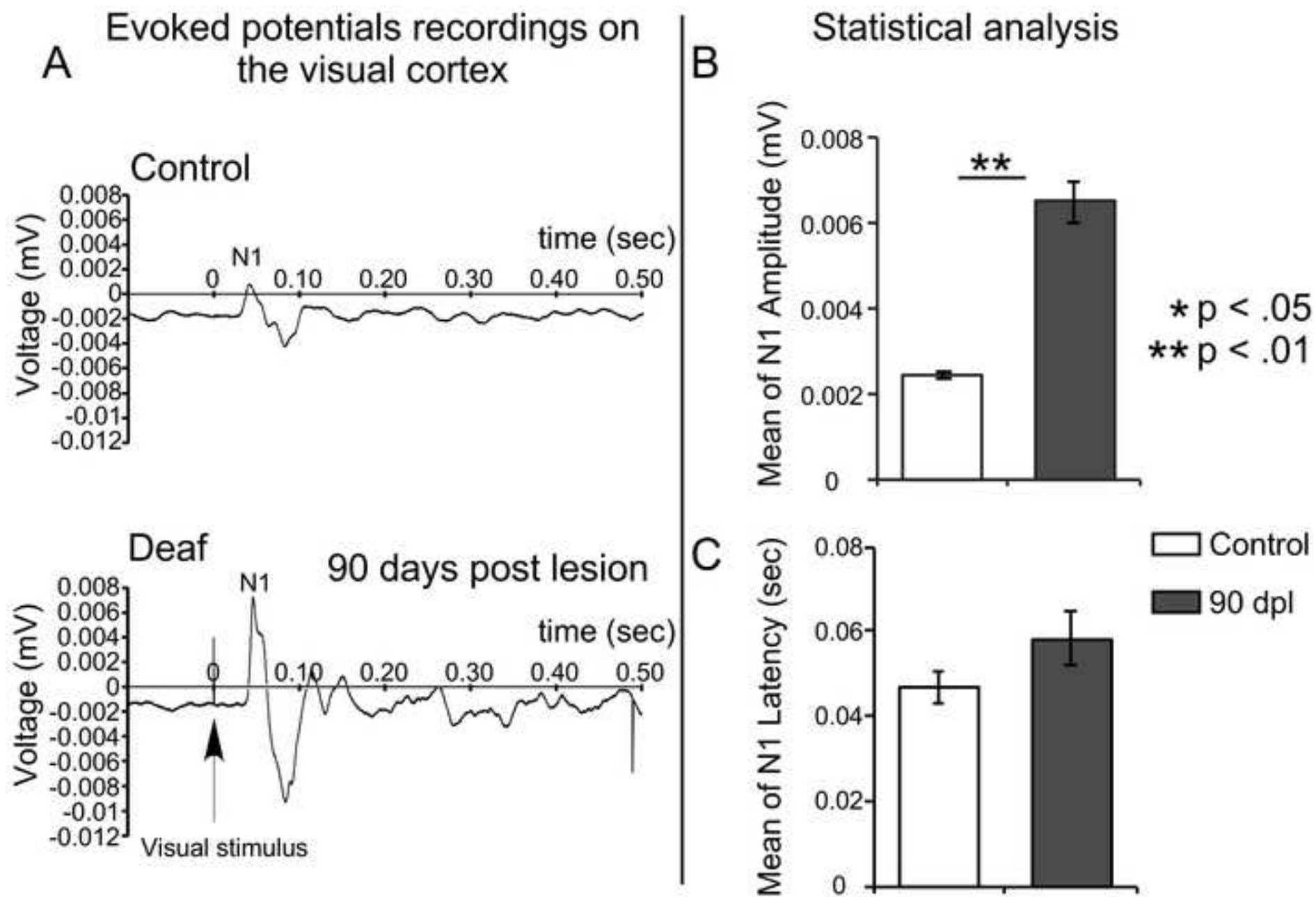
increased immunostaining in the AC1 and ACD of deafened group. PtPD parietal postero-dorsal cortex, PtPR parietal postero-rostral cortex

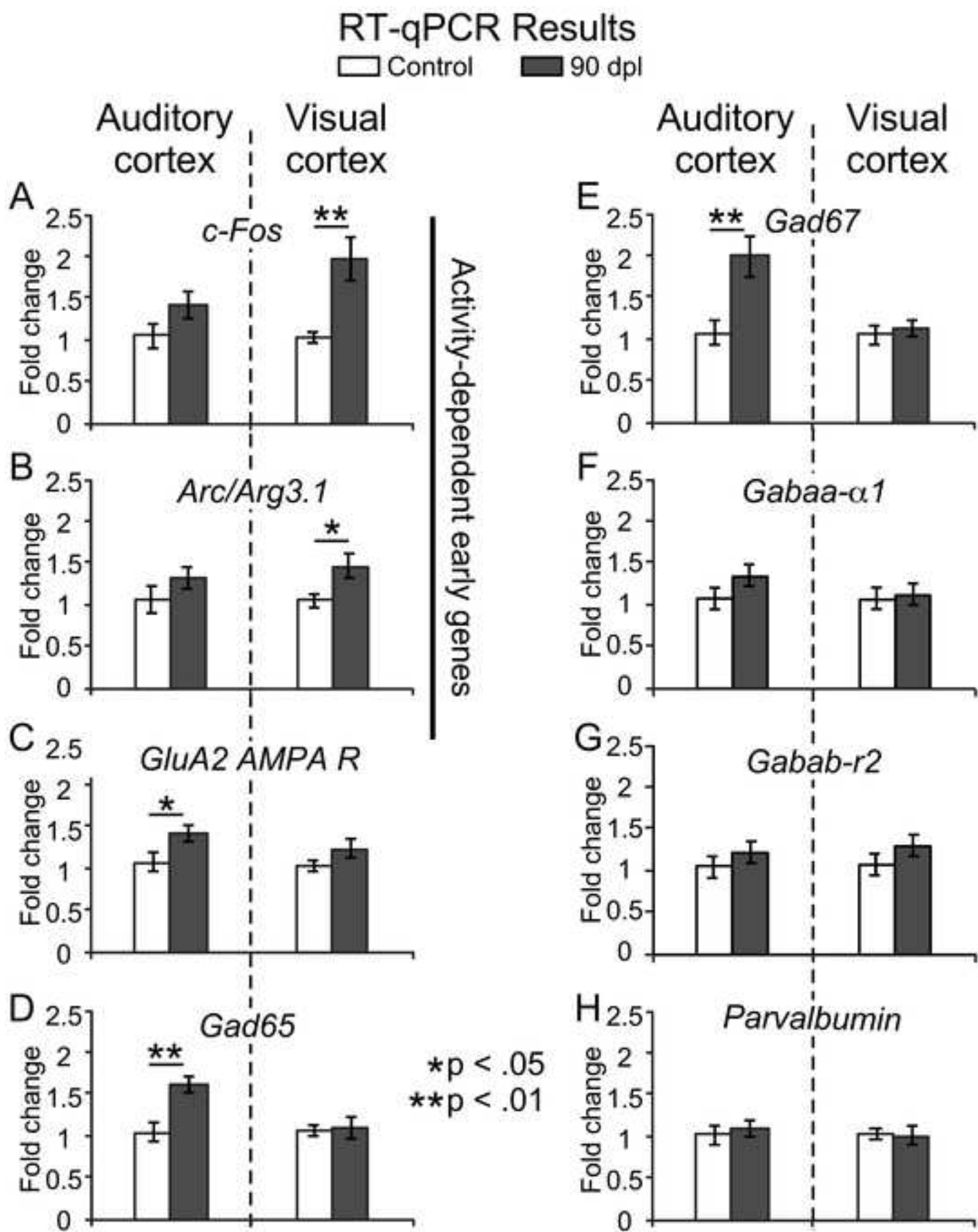
Fig. 6 (A) Panoramic view of GAD67 immunostained coronal sections from a control and deafened animal at 90 days post lesion (90 dpl) at an equivalent rostro-caudal level (IA 3.48). Higher immunoreactivity in layers L2/3 and L5, permits easy delimitation of cytoarchitectural cortical subdivisions (borders defined by dotted lines). The four squares in **(A)** delimit details shown at a higher magnification in **(B)**. **(B)** Large and medium size immunostained interneurons are shown along layers, more densely stained in deafened animal (left). Also, a denser neuropil is noticeable in deafened animals (left), particularly in L2/3 in both primary auditory cortex (AC1) and primary visual cortex (VC1). Although details are visually subtle, they were confirmed on a double-blind observation of four microscopists. **(C)** Bar charts illustrate quantitative changes in normalized optical density (OD) of GAD67 immunoreactivity in AC (left) and VC (right) of control (white columns) and deafened group at 90 dpl (gray columns). Quantitative analyses were made separately for AC1, secondary ventral AC (ACV), secondary dorsal AC (ACD), primary VC (VC1), secondary lateral VC (V2L) and secondary medial VC (V2M, which contain V2MM and V2ML). Asterisks represent statistically significant differences between groups (*= $p < .05$; **= $p < .01$). Results are represented by the mean \pm standard error. Sections from each experimental group were incubated simultaneously with their own controls to cancel out differences in intensity measurements caused by differences in processing. PtPD parietal postero-dorsal cortex, PtPR parietal postero-rostral cortex

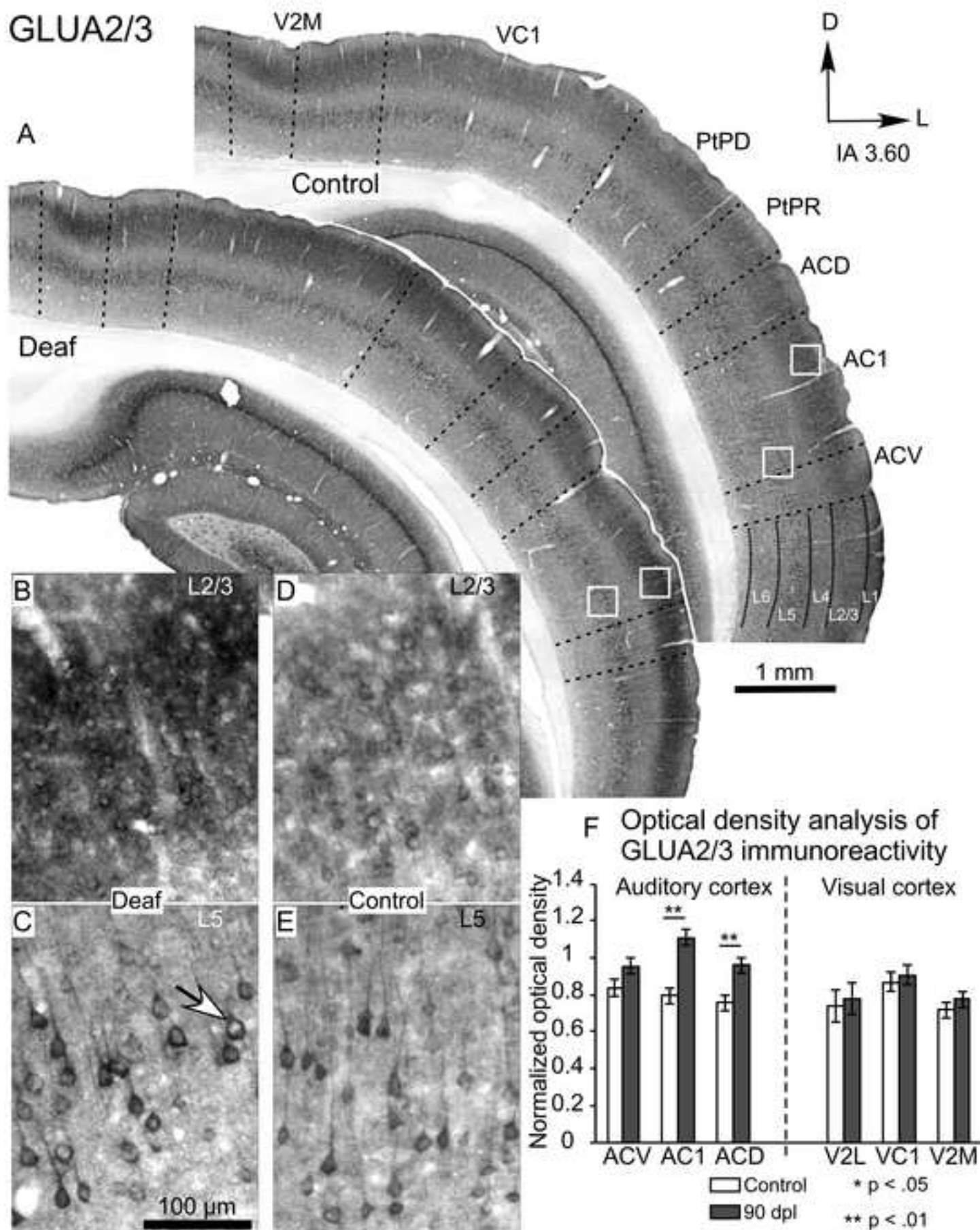
Fig. 7 (A) Representative coronal sections immunostained for parvalbumin (PV) from control and deafened groups at 90 days post lesion (90 dpl) at an equivalent rostro-caudal level (IA 3.60). Dotted lines represent cytoarchitectural subdivisions. Rectangles in coronal sections in **(A)** correspond to details at a higher magnification in **(B)** and **(C)**. **(B and C)** Notice the higher number of immunoreactive neurons in deafened animal. **(D)** Bar charts illustrate number of PV immunoreactive neurons segmented by density gradients in AC (left) and VC (right) of control (white columns) and deafened group at 90 dpl (gray columns). Quantitative analyses were made separately for AC1, secondary ventral AC (ACV), secondary dorsal AC (ACD), primary VC (VC1), secondary lateral VC (V2L) and secondary medial VC (V2M, which contain V2MM and V2ML). Asterisks represent statistically significant differences between groups (*= $p < .05$; **= $p < .01$). Results are represented by the mean \pm standard error. PtPD parietal postero-dorsal cortex, PtPR parietal postero-rostral cortex

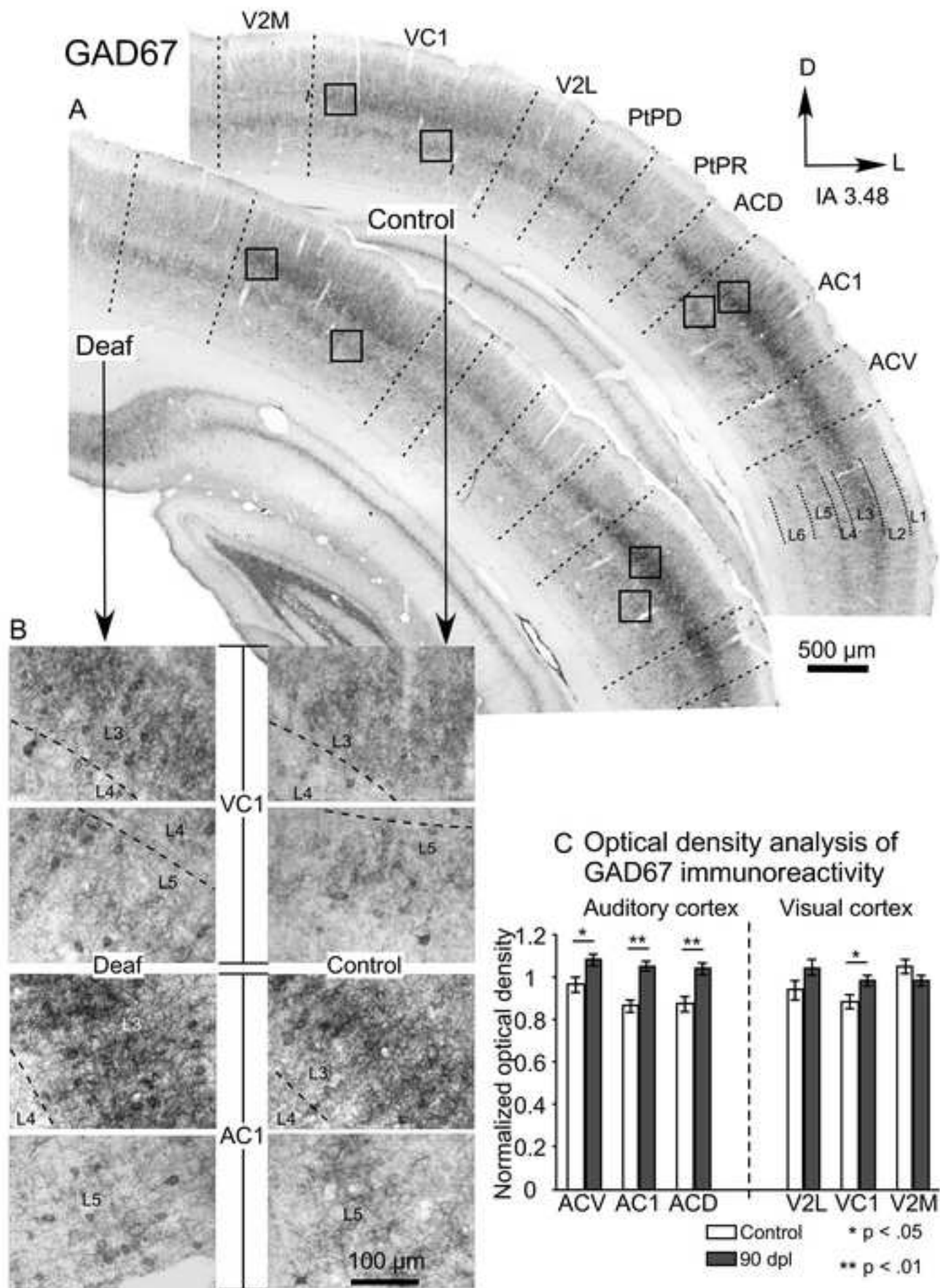






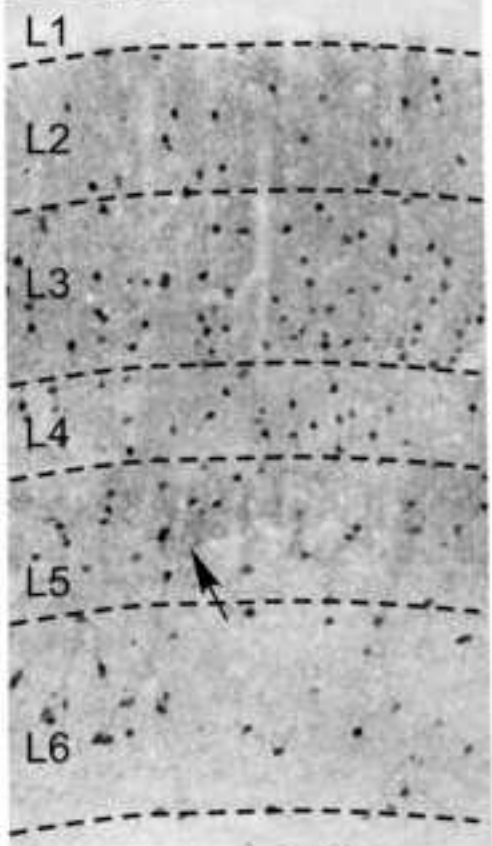




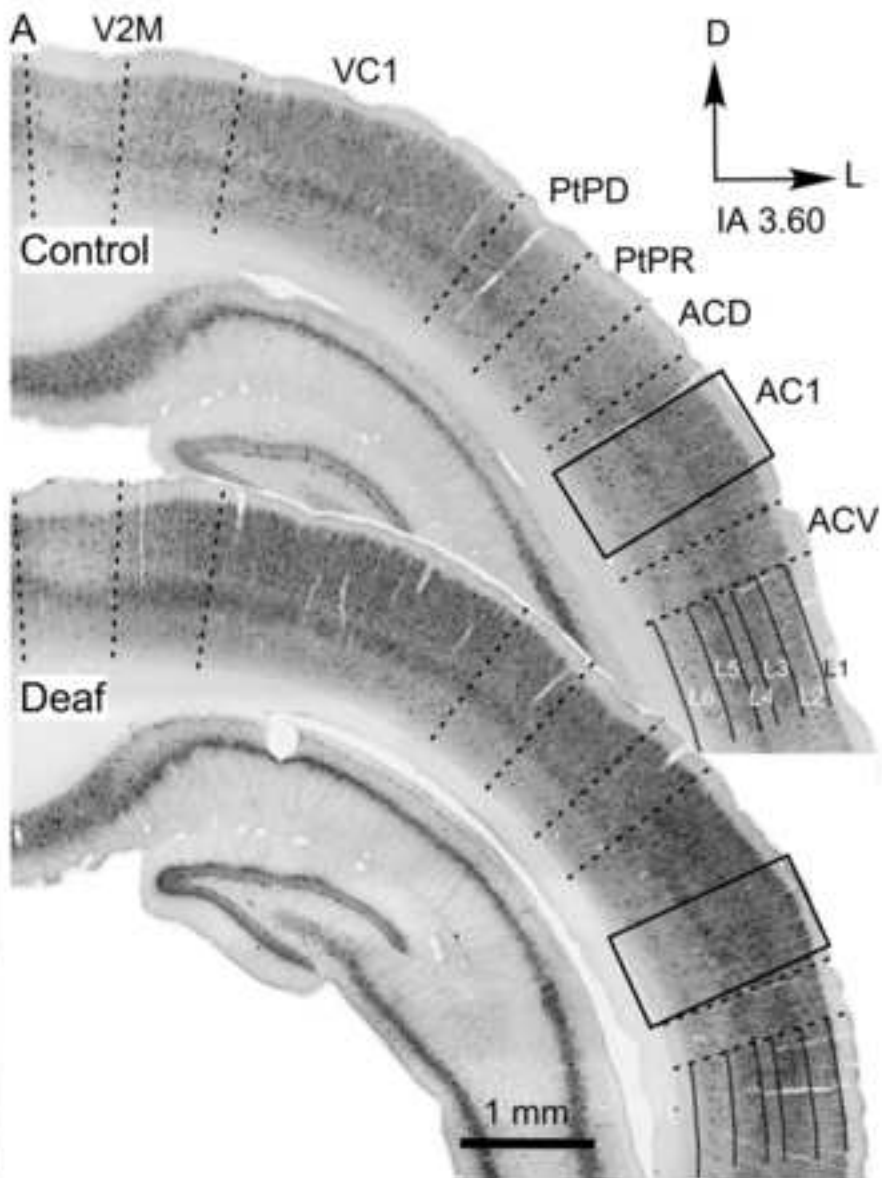
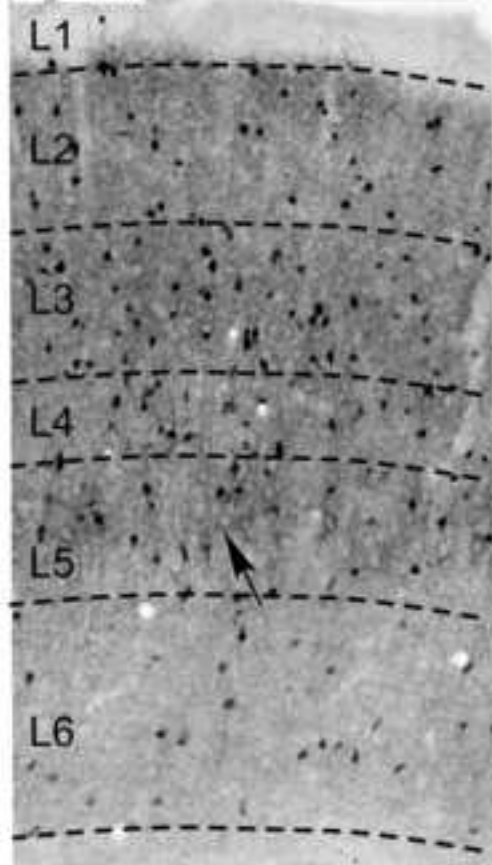


Parvalbumin

B Control



C Deaf



D Normalized number of PV immunoreactive neurons (density gradient segmentation)

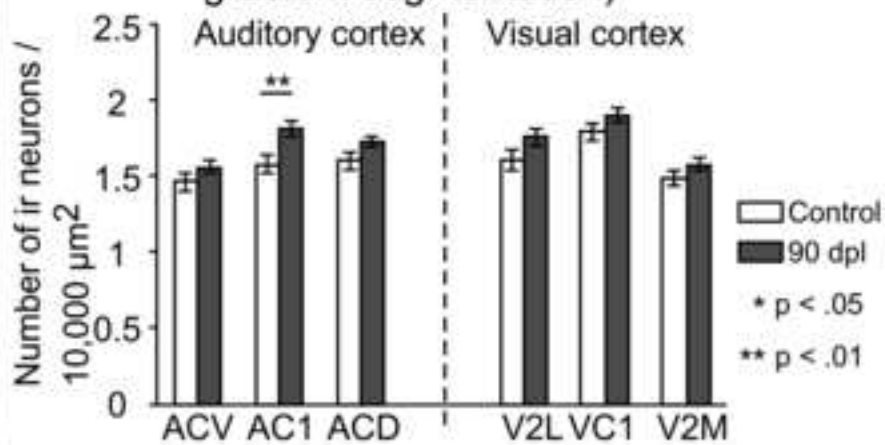


Table 1. RT-qPCR primers used in genetic expression analysis

Target protein	Number GenBank a	Primer Forward	cDNA Forward a	Primer Reverse	cDNA Reverse a	Size of products	E
<i>c-Fos</i>	NM_022197.2	ACGGAGAATCCG AAGGGAAA	569- 588	TGTCTCCGCTTGG AGCGTAT	640- 659	91	91.2
<i>Arc/Arg 3.1</i>	NM_019361.1	AGGCAGCAGCTG GAGTCTTC	2102- 2121	GGGTGGTACCCCT TCCAGAC	2176 - 2195	94	97.77
<i>GluA2</i>	NM_017261	CGGCAGCTCAGCT AAAAACT	173- 192	TTGTAGCTGGTGG CTGTTGA	243- 262	90	96.30
<i>Gad65</i>	NM_012563.1	GATCGGAACAGA CAGCGTGA	953- 972	GTGGCACTACCA GGAAAGG	1059 - 1078	126	95.72
<i>Gad67</i>	NM_017007.1	CGTTTGATCCGAT CCAGGAG	1235- 1254	GAGTTTGTGGCGA TGCTTCC	1331 - 1350	116	98.66
<i>Gabaa-α1</i>	NM_183326.2	TCAGCAAATCG ACCGACTG	1468- 1487	GTGGGGGCTTTTA GCTGAGG	1560 - 1579	112	98.47
<i>Gabab-α2</i>	NM_012957.2	GCCTCCAGCATCC AGTATCG	1192- 1211	GTCGGGGATGGTG ATTTTCA	1307 - 1326	135	91.30
<i>Parvalbumin</i>	M12725.1	TGGGCCACCTTGT TCAGTCT	739- 758	GACTCAGCCCCTT CCGTTC	831- 850	112	98.51
<i>Rpl19</i>	NM_031103	TCGCCAATGCCAA CTCTCGTC	123- 143	AGCCCGGGAATGG ACAGTCAC	191- 211	89	96.48

^a Primer location in the corresponding GenBank sequences of rat origin is indicated

^b RT-qPCR primer efficiency (E) was calculated according to the following equation: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

Table 2. Summarised description of antibodies used

Antigen	Immunogen	Description	Dilution used
GluA2/3 AMPA receptor subunits	Carboxy terminus peptide of rat GluA2/3 conjugated to BSA with glutaraldehyde (EGYNVYGIESVKI)	Polyclonal Rabbit, Merck Millipore #AB1506; RRID:AB_90710	1:100 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0.3%
GAD67	Recombinant GAD67 protein	Monoclonal mouse, Merck Millipore #MAB5406 clone 1G10.2 RRID:AB_2278725	1:1000 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0.3%
Parvalbumin	Rat muscle parvalbumin	Polyclonal Rabbit, Swant #PV-25; RRID:AB_10000344	1:5000 TBS 0.05 M + Triton-Tx 0.3%