

Tesis Doctoral

Generación y análisis de ratones genéticamente modificados en los genes *Chrna9* y *Chrna10*

Taranda, Julián

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Taranda, Julián. (2009). Generación y análisis de ratones genéticamente modificados en los genes *Chrna9* y *Chrna10*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Taranda, Julián. "Generación y análisis de ratones genéticamente modificados en los genes *Chrna9* y *Chrna10*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE RATONES GENETICAMENTE
MODIFICADOS EN LOS GENES *Chrna9* Y *Chrna10*.

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS.**

Lic. Julián Taranda

Directora de tesis:	Dra. Ana Belén Elgoyhen
Consejero de estudios:	Dr. Marcelo Rubinstein
Lugar de trabajo:	Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) CONICET.

Buenos Aires, Febrero de 2009

GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE RATONES GENETICAMENTE

MODIFICADOS EN LOS GENES *Chrna9* Y *Chrna10*.

RESUMEN

El receptor colinérgico nicotínico (nAChR) compuesto por la subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ y acoplado al canal de potasio dependiente de Ca^{2+} SK2, media la transmisión sináptica inhibitoria entre la inervación eferente medial (MOC) y las células ciliadas de la cóclea. En este trabajo hemos generado dos animales genéticamente modificados con alteraciones en el funcionamiento del receptor $\alpha 9\alpha 10$. Con el objetivo de estudiar el papel del sistema eferente olivococlear en el funcionamiento del oído interno generamos un ratón *knock in* que alberga una sustitución de una leucina (L) por una treonina (T) en la posición 9' de la región transmembrana 2 de la subunidad $\alpha 9$ del receptor colinérgico nicotínico. Esta mutación le confiere al receptor una menor tasa de desensibilización y una mayor afinidad aparente para la ACh, la cual se refleja en un marcado aumento de la actividad del sistema eferente olivococlear *in vivo*. Es así que los animales mutados presentaron un aumento en los umbrales de las respuestas eléctricas evocadas del tronco encefálico (BERA) y en los productos de distorsión de emisiones otoacústicas (PD-EOAs). Más aún, la estimulación eléctrica del sistema eferente en la base del IV ventrículo, produjo un dramático aumento de la supresión de los PD-EOAs. Todos estos efectos fueron bloqueados por estircina, un bloqueante de receptores $\alpha 9\alpha 10$. Finalmente, los animales mutados presentaron una mayor resistencia al trauma producido por sonidos intensos. Estos resultados demuestran que el sistema olivococlear es un sistema inhibitorio que protege al oído del trauma acústico.

En la segunda parte del presente trabajo generamos un ratón transgénico que expresa a la subunidad $\alpha 10$ de receptores nicotínicos en forma constitutiva. Las células ciliadas internas (CCIs) de la cóclea reciben una inervación eferente colinérgica antes del comienzo de la audición (P12 en roedores). Luego del comienzo de la audición, estas fibras se retraen, y esto se correlaciona con el cese de la transcripción del gen que codifica para la subunidad $\alpha 10$ (*Chrna10*) y la ausencia de receptores colinérgicos funcionales. Para evaluar si estos cambios durante el desarrollo se deben en parte al cese de la transcripción de *Chrna10*, generamos un ratón transgénico que expresa a la subunidad $\alpha 10$ en forma constitutiva. A tal fin, el ADNc que codifica para la subunidad $\alpha 10$ fue introducido río abajo del promotor del *Pou4f3*, factor de transcripción que se expresa en las CCIs y CCEs desde estadios embrionarios. Este transgén se expresó correctamente en las CCIs y codificó para una subunidad $\alpha 10$ funcional. Sin embargo, a pesar de la presencia de la subunidad $\alpha 10$, no se detectaron corrientes colinérgicas luego del comienzo de la audición. Por lo tanto, la desaparición de las respuestas colinérgicas que acompañan al desarrollo de las CCIs no es consecuencia del cese de la transcripción de *Chrna10*.

Palabras claves: acetilcolina, receptor nicotínico, células ciliadas, cóclea, inervación eferente medial, $\alpha 9$, $\alpha 10$.

**GENERATION AND ANALYSIS OF MICE WITH GENETIC MODIFICATIONS
IN *Chrna9* AND *Chrna10*.**

ABSTRACT.

The nicotinic cholinergic receptor (nAChR) composed of the $\alpha 9$ and $\alpha 10$ subunits and functionally coupled to calcium-activated, small conductance (SK2) potassium channels, mediates the inhibitory synaptic transmission between the medial efferent fibers (MOC) and the hair cells of cochlea. In this work we have generated two genetically modified animals with alterations in the function and expression of the $\alpha 9\alpha 10$ receptor. To study the function of the olivocochlear efferent system in the inner ear, we generated a knock in mice, which harbors a threonine (T) for leucine (L) substitution at 9' position (L9'T) of the second transmembrane domain of the $\alpha 9$ subunit. This mutation confers a decreased rate of desensitization and a higher apparent affinity for Ach. This was reflected in increase of the olivocochlear efferent activity *in vivo*. The knock in mice presented an increase in the thresholds of the auditory brainstem responses (ABR) and the distortion product otoacoustic emissions (DPOAEs). Moreover, the electrical stimulation of the efferent system at the base of the fourth ventricle produced a dramatic increase in the suppression of the DPOAEs. All these effects were blocked by strychnine, a potent antagonist of $\alpha 9\alpha 10$. Finally, the knock in mice presented a greater resistance to acoustic trauma produced by intense sounds. These results demonstrate that the olivocochlear system is an inhibitory system that protects the ear from acoustic injury.

In the second part of this work we generated a transgenic mouse that constitutively expresses the $\alpha 10$ subunit. Inner hair cells (IHCs) of the cochlea receive cholinergic efferent innervation before the onset of hearing (P12 in rodents). After the onset of hearing, these fibers retract, and this is correlated with the cessation in the transcription of the gene that codes for the $\alpha 10$ subunit (*Chrna10*). In order to analyze these development changes around the onset of hearing, we generated a transgenic mouse that expresses the $\alpha 10$ subunit constitutively. For this purpose, the cDNA that codes for the $\alpha 10$ subunit was introduced downstream of the *Pou4f3* promoter, a transcription factor that is expressed in IHCs and outer hair cells (OHCs) since embryonic stage. This transgene was correctly expressed in the IHCs and encoded a functional $\alpha 10$ subunit. Nevertheless, this manipulation was not sufficient for maintaining a functional cholinergic receptor after the onset hearing. Therefore, the disappearance of cholinergic responses that accompanies the development of IHCs is not a consequence of the cessation in the transcription of *Chrna10*.

Key words: acetylcholine, nicotinic receptor, hair cells, cochlea, medial efferent innervations, $\alpha 9$, $\alpha 10$.

Agradecimientos

A la Dra. Belén Elgoyhen por ser una de las personas que más me apoyaron para realizar mi doctorado. Por su continuas charlas científicas y no científicas. Por trabajar mucho juntos y por tratar de que cada día mejore en mi formación científica.

A la Dra. Flawia y al Dr. Torres, y a todo el INGEBI, por trabajar tanto para que todos tengamos un instituto que sea reconocido y en donde se puede trabajar en completa libertad. Por siempre tener su oficina abierta para escuchar opiniones e intercambiar ideas.

A la Dra. Eleonora Katz por ayudarme en todo lo que necesite y tener una visión positiva de las cosas.

A todos los compañeros de mi laboratorio, por los gratos momentos vividos. Por tratar de ayudarnos entre todos por cualquier tipo de problema. Por la buena predisposición y el buen clima de trabajo.

A Maru, gracias por todo, por ser más que una amiga, una segunda hermana.

A Caro, por ser una amiga de hierro, donde esté, te voy a extrañar mucho. Por su ayuda con mi trabajo y mi tesis. Por los grandes momentos de alegría que vivimos juntos que espero en algún momento revivirlos.

A Vivi por la alegría constante en el laboratorio que contrasta con mi parquedad y por las buenas charlas compartidas.

A Marcela por su ayuda y por su buena predisposición para realizar cosas para el laboratorio.

A Jimena por su gran trabajo en los proyectos que realizamos en conjunto y que le aportaron un plus a los trabajos.

A Javier por sus interesantes preguntas y consultas.

A Lucia, por su interés por los diferentes temas del laboratorio y sus aportes para encontrar mejores respuestas.

A Javier, Juan, Cecilia y Francisco por aportar la frescura de la nueva generación.

A Santiago por su bondad, por las continuas charlas políticas que tanto me gustan. Espero que algún día luego de finalizar tu doctorado te encuentre haciendo política en alguna parte del país.

A Esteban, por compartir tantos momentos afuera del laboratorio y tantas charlas científicas, por la gran amistad brindada. Espero que algún día puedas volver a Santa

Fe.

A Guchi un amigo que extraño y que vivimos desfasados, el vuelve y yo me voy.

A Leo, por sus ganas de hacer cosas y proyectos que nunca se agotan. Por ese tipo de amistad que el sólo puede ofrecer.

A Gastón una de las personas que más extraño, un gran amigo. La persona con un sentido del humor finísimo.

A Pablo por su ayuda en todo lo que necesite y por los asados compartidos en tantas casas. Por formar un grupo muy unido y divertido.

A Tamara por su continua muestra de cariño, afecto y aliento para seguir trabajando. Por su permanentes consejos.

A Tomas, Diego, Maru, Flavio, Vivi, Daniela y todos los chicos del laboratorio del Dr. Rubinsten por brindarme siempre una ayuda intelectual. Por permitirme junto con Marcelo usar el laboratorio para realizar todo los experimentos necesarios para mi doctorado.

Leonor, Mari, Gladis y Francisco por hacer del INGEBI un buen lugar para trabajar

A Irma y a Mariano por colaborar en todo lo posible, y por hacer de la secretaria un sitio donde sabes que te pueden ayudar.

A Norberto por sus continuas charlas, almuerzos y demás yerbas que compartimos en estos años. Espero que lo sigamos haciendo. También por su trabajo incansable junto con Martín tratando de dar el mejor servicio posible en la importación de insumos y equipamiento.

A Fernando Bravo, Jorge Moschetti y a Leo Erijman por ayudarme durante mi tesis de licenciatura y mí doctorado en consejos muy útiles para mi carrera.

A Daniel Calvo por las interesantes charlas de política científica, analizando las profundas falencias del sistema científico Argentino.

A Stephane, Charlie, Hakim y Paul colaboradores de universidades extrajeras que trabajaron mucho en todos mis proyectos.

A Vicky por ser una de las personas que más me ayudo durante mi doctorado, me acompaño en momentos muy malos de mi vida y compartimos 6 años juntos. Parte del doctorado se lo debo a ella, a sus continuas charlas y a darme una visión no tan polarizada de la vida.

A Briardo, Vero, Fede, Diego y tantos compañeros del INGEBI por siempre darme una mano en todo.

A todos los miembros de JCP de la Argentina por intentar de mejorar las condiciones laborales de todos los becarios del país.

A Vidya, Christine, y Douglas Vetter por darme la posibilidad de trabajar en Tufts University y sentirme uno más del laboratorio.

A Misha, Germán y Graig, amigos de Tufts y que me hicieron sentir como en casa.

A mi familia, tíos, tías y primos por tantos asados compartidos y darme una compañía en tantas ocasiones.

A Alejandro por ser un amigazo por hacer tantas cosas al mismo tiempo y no morir en el intento.

A Sergio por ser uno de las primeras personas que conocí en el INGEBI y ayudarme desde el comienzo.

A Alberto, Seba, Camilo, Nacho y Mario, amigos de la infancia que no entienden nada de lo que hago pero me siguen queriendo como hace 30 años.

A Alejandro y a Teresa por ser grandes amigos durante mi universidad y mi doctorado.

A Javier, amigo desde el CBC y donde siempre me brindó momentos para escucharme.

Al CONICET y a la universidad publica por brindarme la posibilidad de estudiar y trabajar. Espero que en algún momento de mi vida pueda devolver todo el esfuerzo realizado por la sociedad Argentina por mi educación.

A Sevin por ser una mujer muy dulce y por brindarme todo el cariño del mundo. Por el esfuerzo de estar separados y tratar de seguir juntos para poder lograr un proyecto en común. Te quiero mucho.

A mis padres y a mis hermanos por apoyarme durante estos años de doctorado. Por ayudarme en mi educación y darme siempre fuerza para seguir trabajando y nunca sentirme frustrado.

*A Alexis que nunca se canso de luchar.
A Nadia, mamá y papá.*

Abreviaturas

ACh: acetilcolina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.

$\alpha 10^{-/-}$: ratón mutante nulo para la subunidad $\alpha 10$.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNc: ácido ribonucleico copia.

BAPTA-AM: acetometilester del ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N', -tetraacético.

BERA: respuestas eléctricas evocadas del tronco encefálico.

BK: canal de potasio dependiente de calcio.

CCEs: células ciliadas externas.

CCIs: células ciliadas internas.

CDs: células de Deiters.

CE₅₀: concentración efectiva para lograr el 50% de la respuesta máxima.

CI₅₀: concentración efectiva para lograr el 50% de inhibición.

5-HT: serotonina.

dB: decibel.

DTT: ditionitrosol.

DPX: medio para el montaje del tejido histológico.

E x: x días de estadio embrionario.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

EGTA: ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil ester)-N,N,N',N'-tetraacético

E_K : potencial de equilibrio del potasio.

E_{rev} : potencial de reversión aparente.

ES: células totipotentes.

et al: *et alter* (y otros).

G: conductancia.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

HEPES: N-(2-hidroxietil) piperazina-N'ácido-(2-etansulfónico).

hs: horas.

I: corriente.

IC: cloroformo-isoamílico 24:1

kb: kilobases.

kHz: kilohertz.

ko: knock out.

ki: knock in.

Chrna9^{L9^T/L9^T}: knock in $\alpha 9$ homocigota.

Chrna9^{L9^T/+}: knock in $\alpha 9$ heterocigota.

Chrna9^{+/+}: animal salvaje.

LOC: fibras eferentes olivococleares laterales.

LSO: núcleo olivar superior lateral.

Lox P: Cre/Lox P Sistema sitio específico de recombinación.

M1-M4: segmentos transmembranales 1 al 4.

MB: membrana basilar.

MEF: fibroblastos embrionarios murinos.

M Ω : megaohmio.

min: minutos.

mm, μm : mili y micrómetros.

MOC: fibras olivococleares mediales.

MOPS: 3 - (N-morfolino) ácido propanosulfónico.

MSO: núcleo olivar superior medial.

MT: membrana tectorial.

mV: milivoltios.

nAChR: receptor colinérgico nicotínico.

nl, μl : nano y microlitros.

nM, μM , mM: nano, micro y milimoles por litro

PBS: buffer fosfato.

PBST: buffer fosfato T-100.

PD-EOAs: producto de distorsión de emisiones otoacústicas

PFA: paraformaldehído.

PIC: fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1.

P x: x días postnatal.

pA, nA: pico y nanoamperios.

r.p.m: revoluciones por minuto.

seg: segundos.

S.E.M.: error estándar de la media.

SK2: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña.

SDS: sodio laurilsulfato.

SSC: buffer para transferencias de acidos nucleicos e hibridización.

T : temperatura absoluta.

TBE: buffer de corrida para electroforesis.

TE: buffer utilizado para resuspender ácidos nucleicos.

Pou4f3- α 10: ratón transgénico para la subunidad α 10.

V : voltaje.

V_m : potencial de membrana.

xg: velocidad de centrifugación.

Índice.

Página

1. Introducción.	1
1.2 El oído: estructura general y función.	2
1.3 El órgano de Corti y la transducción de señales auditivas.	2
1.4 Inervación de las células ciliadas de la cóclea en mamíferos adultos.	7

1.5 La función de las CCEs se encuentra bajo la influencia del sistema nervioso central a través de la inervación eferente medial.	9
1.6 Receptores colinérgicos.	11
1.6.1 Los receptores colinérgicos nicotínicos.	11
1.7 Estructura primaria del receptor colinérgico en las CCEs.	13
1.7.1 Estudio de mutaciones puntuales en la región del poro del canal en los receptores nicotínicos.	16
1.8 Importancia del receptor colinérgico nicotínico durante el desarrollo de las CCI.	18
1.9 Estudios no invasivos de la función auditiva en ratones.	20
1.9.1 Audiometría: respuestas eléctricas evocadas del tronco encefálico (BERA).	21
1.9.2 Producto de Distorsión de Emisiones Otoacústicas (PD-EOAs).	23

2. Objetivos

2.1 Objetivos Parte I	25
2.2 Objetivo Parte II	25

3. Materiales y Métodos.

Parte I

3.1 Generación del animal <i>knock in Chrna9 L9'T</i> .	26
3.1.1 Estrategia para la construcción del vector de recombinación.	26
3.2 Técnicas de biología molecular empleadas.	28
3.2.1 Cortes con enzimas de restricción y aislamiento por electroelución.	28
3.2.2 Generación de extremos romos.	28
3.2.3 Defosforilación de vectores.	29
3.2.4 Reacciones de ligación.	29

3.2.5 Preparación de bacterias competentes.	30
3.2.6 Transformación de células competentes.	30
3.2.7 Identificación de colonias con el producto de ligación deseado.	31
3.2.8 Proceso de recombinación homóloga, selección y generación del <i>knock in Chrna9 L9'T</i> .	32
3.2.9 Preparación de ADN de ES.	32
3.2.10 Análisis de <i>Southern blot</i> para identificar el evento de recombinación homóloga.	32
3.2.11 Hibridación con una sonda de ADN marcada.	33
3.2.12 Inyección de células ES en blastocistos de ratón e implante de los blastocistos en el útero de hembras pseudos-preñadas.	34
3.2.13 Identificación de ratones fundadores.	34
3.2.14 Animales y bioterio.	35
3.2.15 Extracción de ADN de segmentos de cola de los animales <i>knock in Chrna9 L9'T</i> .	35
3.2.16 Genotipificación de animales <i>knock in Chrna9 L9'T</i> .	35
3.3 Análisis del animal <i>knock in Chrna9 L9'T</i> .	36
3.3.1 Análisis de la expresión de genes en el <i>Chrna9L9'T</i> .	36
3.3.2 Secciones de plástico para el análisis del ducto coclear.	38
3.3.2.1 Perfusión de los animales.	38
3.3.2.2 Osmicatización.	38
3.3.2.3 Descalcificación.	38
3.3.2.4 Deshidratación.	39
3.3.2.5 Tratamiento en araldita.	39
3.5 Disección coclear e inmunofluorescencia.	39
3.6 Análisis auditivos.	40
3.6.1 Respuestas eléctricas evocadas del tronco encefálico (BERA).	40
3.6.2 Producto de Distorsión de Emisiones Otoacústicas (PD-EOAs).	41
3.6.3 Ensayo de la actividad de la inervación eferente medial.	41
3.6.4 Trauma acústico.	42

Parte II

3.7 Generación del animal transgénico <i>Pou4f3-α10</i> .	42
3.7.1 Estrategia para la construcción del vector de integración al azar.	42
3.7.2 Preparación del transgén para la microinyección pronuclear.	44
3.7.3 Generación del animal transgénico.	45
3.7.4 Animales y bioterio.	45
3.7.5 Genotipificación de animales.	46
3.7.6 Reacción de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).	46
3.8 Hibridización <i>in situ</i> para la detección del mensajero de la subunidad α 10.	47
3.8.1 Preparación del tejido.	47
3.8.2 Preparación de la sonda.	47
3.8.3 Síntesis de la ribsonda.	48
3.8.4 Hibridación.	48
3.8.5 Preparado de la ribsonda e hibridación.	49
3.8.6 Post-hibridación.	49
3.8.7 Incubación y visualización.	50
3.9 Cruzamientos para el rescate del fenotipo del <i>knock out</i> de la subunidad α 10 (α 10 ^{-/-}).	50

4. Resultados

Parte I

4.1 Generación y análisis de un ratón con una mutación puntual en el receptor

nicotínico $\alpha 9\alpha 10$

4.1.1 Introducción General	52
4.1.2 Generación de un ratón <i>knock in Chrna9 L9'T</i> .	53
4.1.3 Análisis de la expresión de genes que participan en la sinapsis eferente colinérgica.	58
4.1.4 Análisis histológico del ducto coclear.	60
4.1.5 Análisis electrofisiológico de células ciliadas.	61
4.1.6 Anatomía de la innervación eferente en el animal <i>Chrna9 L9'T</i> .	61
4.1.7 Análisis de la fisiología del sistema eferente medial.	66
4.1.7.1 Incremento del umbral auditivo medido mediante BERA y PD-EOAs.	66
4.1.7.2 Estudio de la actividad del MOC.	69
4.1.7.3 Análisis de trauma acústico.	71

Parte II

4.2 Expresión constitutiva de la subunidad $\alpha 10$ en las células ciliadas de la cóclea.

4.2.1 Introducción General	74
4.2.2 Generación de un ratón que expresa la subunidad $\alpha 10$ (<i>Pou4f3-$\alpha 10$</i>) en forma constitutiva en las células ciliadas de la cóclea.	75
4.2.3 Rescate funcional del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en el ratón <i>knock out</i> de la subunidad $\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$).	79

5. Discusión

Parte I

5.1. Aporte general del trabajo	81
5.1.1 Análisis de la expresión de genes involucrados en la sinapsis eferente.	82
5.1.2 Efectos funcionales de la mutación del receptor colinérgico y sus consecuencias en la sinapsis eferente.	84
5.1.3 Fisiología auditiva en el <i>knock in Chrna9 L9'T</i>	86

Parte II

5.2 Expresión constitutiva de la subunidad $\alpha 10$ en las CCIIs y CCEs del ratón.	90
5.2.1 Análisis de la presencia de la corriente colinérgica luego del comienzo de la audición.	91

6. Conclusión

Parte I

6.1 Conclusión	93
----------------	----

Parte II

6.2 Conclusión	93
----------------	----

7. Anexo

7.1 Rescate funcional del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en el ratón <i>knock out</i> de la subunidad $\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$).	94
7.2 Análisis funcional del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en el <i>Pou4f3-$\alpha 10$</i> luego del comienzo de la audición.	96

8. Bibliografía	97
-----------------	----

INTRODUCCIÓN

1. Introducción.

La capacidad de oír una determinada señal sonora y de poder comprenderla ha sido fundamental para generar una transferencia rápida y eficiente de información a través de la evolución de las especies. Más aún, nos da la posibilidad de disfrutar y de emocionarnos al escuchar sonidos que nos generan satisfacción o en otros momentos, tristeza. Podemos, a través de un tono o de una determinada intensidad y frecuencia de una señal auditiva, reconocer a diferentes personas solo por su voz. Lograr comunicarnos con nuestros pares a través de los sentidos es un hábito común y no valoramos la complejidad de los mecanismos que actúan para que esto pueda realizarse. El epitelio sensorial del órgano de la audición en los humanos posee sólo unas 16.000 células receptoras (Dallos, 1996), las cuales son extremadamente sensibles. El trauma acústico, las drogas ototóxicas y el envejecimiento pueden producir la pérdida irreversible de las mismas, ya que estas células son incapaces de regenerarse en los mamíferos. En Estados Unidos de Norteamérica, el informe sobre salud National Health Interview Survey, muestra que desde 1971 a 1990 los problemas de audición dentro de la población de entre 45 y 64 años aumentó un 26% y entre aquellos de 18 a 44 años aumentó en un 17% (www.press.hear-it.org). Las personas afectadas por problemas de audición son cada vez más jóvenes debido principalmente al aumento general del nivel de ruido en nuestro entorno, tanto laboral como el generado a través de una exposición voluntaria al ruido elevado. A. Davis, del Instituto Británico MRC de Investigaciones Audiológicas, estima que el número total de personas con pérdida de audición de más de 25 dB en el mundo excederá los 700 millones en el 2015 (www.press.hear-it.org).

En los últimos 20 años la genética molecular ha realizado un importante avance en la identificación de genes involucrados en sorderas no sindrómicas y sobre todo en genes involucrados en la fisiología coclear. Si bien, la ciencia ha avanzado en el tratamiento de diferentes tipos de sorderas, las estadísticas existentes indican que la cantidad de personas con problemas auditivos va en un franco aumento. Esto impulsa a seguir invirtiendo en investigación básica y aplicada. Pero también es necesario aumentar los esfuerzos en políticas de salud pública, para educar a las personas en el cuidado de su salud y de sus

órganos sensoriales. Esta tesis de doctorado reúne el trabajo realizado en los últimos seis años, en donde estudié el papel de la inervación eferente medial en el proceso de la audición. Mediante la generación de un animal genéticamente modificado que alberga una mutación en el poro del canal del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$, demostramos que el sistema eferente medial protege al oído del daño producido por sonidos intensos.

1.2 El oído: estructura general y función.

La estructura anatómica del oído puede dividirse en tres partes: oído externo, medio e interno, como se observa en la Figura 1 A. En primer lugar se encuentra el oído externo, cuya función principal es la de recolectar los estímulos sonoros y dirigirlos hacia la membrana timpánica del oído medio. El oído externo se extiende desde la superficie corporal hasta la membrana timpánica. Comenzando con esta membrana, se ubica el oído medio que incluye al tímpano y a la cadena más pequeña de huesos en el cuerpo humano: el martillo, el yunque y el estribo. El resto del oído medio está lleno de aire. La base del martillo está unida a la membrana timpánica, y la base del estribo está adosada a una membrana que cubre una abertura en la estructura ósea del oído interno. Esta abertura es la ventana oval, y su cubierta membranosa separa el oído medio lleno de aire de la cóclea, que está llena de líquido. Las señales sonoras que impactan en la membrana timpánica provocan la vibración posterior de estos pequeños huesos. Este movimiento se traduce luego en cambios de presión en el líquido que baña al epitelio auditivo. En último lugar, se encuentra el oído interno que contiene los epitelios sensoriales del equilibrio, en el aparato vestibular y de la audición, en la cóclea (Figura 1 A).

1.3 El órgano de Corti y la transducción de señales auditivas.

La cóclea, dentro del oído interno, contiene las células responsables de la detección del sonido, y está cubierta por una estructura ósea que forma la cápsula ótica. La cóclea posee una forma espiralada, y se puede dividir en tres regiones: basal, medial y la

Julián Taranda
Introducción

región superior, llamada ápex. En su interior se ubica el modiolo, de cuerpo tubular, el cual es el eje central del ducto coclear. Este se encuentra dividido en tres conductos o espacios independientes hasta la última parte del ápex. Como se puede observar en la Figura 1 B en el espacio superior del ducto coclear se ubica la escala vestibular, la cual esta separada de la escala media por la membrana de Reissner. La escala media, como su nombre lo indica se encuentra en la parte media del ducto coclear y se separa de la escala timpánica por la membrana basilar. El helicotrema es el extremo superior del ápex donde la escala timpánica y la escala vestibular se conectan. Los diferentes espacios contienen soluciones con concentraciones de iones diferentes. La escala timpánica y la escala vestibular poseen una solución con una alta concentración de Na^+ llamada perilinfa y la escala media contiene una solución llamada endolinfa con una alta concentración en K^+ . El órgano de Corti, constituye el epitelio sensorial de la cóclea (Figura 1 C). Este órgano contiene las células ciliadas, que son las responsables de transformar los estímulos mecánicos en señales eléctricas, que luego son interpretadas por la corteza auditiva en el sistema nervioso central (Dallos, 1996). El órgano de Corti también contiene las células llamadas de soporte de función aún desconocida. Los extremos del órgano de Corti son la membrana de Reissner, el ligamento espiral, la membrana basilar y por último el *spiral limbus*.

A través de la pequeña cadena ósea los estímulos sonoros atraviesan mecánicamente el oído medio. Los movimientos del estribo ejercen una presión sobre la ventana oval, y esto produce cambios de presión en los fluidos cocleares, generando de esta manera un movimiento ondulatorio de la membrana basilar (Dallos, 1996). Tanto la membrana basilar en la parte inferior, como la membrana tectorial en la parte superior están embebidas en la endolinfa y vibran por el movimiento ondulatorio generado por la señal auditiva (Legan *et al*, 2005). Como se puede observar en la Figura 2 cada punto a lo largo de la cóclea es más sensible a una determinada frecuencia, de acuerdo a un mapa de localización de frecuencias: altas frecuencias en la base y bajas frecuencias en el ápex de la cóclea. La anatomía de las células varía de acuerdo a este mapa de frecuencias. Las células auditivas en el ápex son más largas que aquellas en la base y los estereocilios son más largos y menos rígidos, la membrana basilar es muchas más ancha y la membrana tectorial tiene una mayor superficie.

Las células ciliadas de los mamíferos se dividen anatómicamente en una fila de células ciliadas internas (CCIs) y tres filas de células ciliadas externas (CCEs). Las CCIs son los fonoreceptores propiamente dicho, que actúan como transductores de los estímulos auditivos. Estas células están en contacto con las terminales aferentes de tipo I que forman el nervio auditivo. Por otro lado, las CCEs están implicadas en la amplificación mecánica del sonido y en la sintonización fina del movimiento de la membrana basilar (Ashmore, 1987; Fettiplace y Hachney, 2006). Estas células son electromotiles, esto es, tienen la capacidad de cambiar su longitud celular en respuesta a cambios en el potencial de membrana (Brownell, 1984; Brownell *et al.*, 1985; Adler *et al.*, 2003). La electromotilidad se produce debido a que las CCEs expresan en su membrana basolateral una proteína que se denomina prestina, cuya conformación cambia con el potencial de la membrana, traduciendo esto en cambios en la longitud de la célula (Zheng *et al.*, 2000; Liberman *et al.*, 2002).

La onda auditiva estimula la membrana timpánica y su movimiento afecta a los huecillos del oído medio que prolongan la energía de la onda auditiva generando el desplazamiento de la membrana basilar y la endolinfa de la escala media. Este acoplamiento mecánico asegura que la energía del sonido sea eficientemente transferida desde el aire hasta el fluido coclear en un amplio rango de frecuencias (Von Békésy, 1960; Gresler, 1998). La deflexión del haz de estereocilios desde su posición de reposo produce la apertura de los mecanoreceptores en el extremo superior de los estereocilios. Los mecanoreceptores son canales catiónicos no selectivos (Corey y Hudspeth, 1979), por lo tanto, cuando se activan, se produce la entrada de cationes (principalmente de K^+ y Ca^{2+}) y esto lleva a la despolarización de la célula ciliada (Gillespie, 1995). Este cambio en el potencial de reposo de la célula produce la liberación de glutamato en la base de las CCIs. Este neurotransmisor activa receptores presentes en las terminales de la inervación aferente de tipo I generando una representación eléctrica del estímulo acústico (Glowatzki y Fuchs, 2002) (Figura 3). Los cuerpos neuronales bipolares de las fibras aferentes de tipo I se ubican en el ganglio espiral formando un sistema radial con sus proyecciones axosomáticas al núcleo coclear. Existen evidencias que el ajuste pasivo de la membrana basilar es incrementado por una participación activa de las CCEs. El movimiento de los cilios en el apex de las CCEs también produce la apertura de mecanoreceptores y la

despolarización de las células. A diferencia de lo que ocurre en las CCIs, este cambio en el potencial de membrana produce cambios en la longitud de las CCEs, proceso conocido como electromotilidad. Esto lleva a una amplificación mecánica del estímulo auditivo y a una sintonización fina de la membrana basilar. Evidencias experimentales y teóricas indican que la capacidad de amplificación de la cóclea es generada por la energía de las CCEs en oposición a la viscosidad de la endolinfa de la escala media (Dallos, 1992; Robles y Ruggero, 2001).

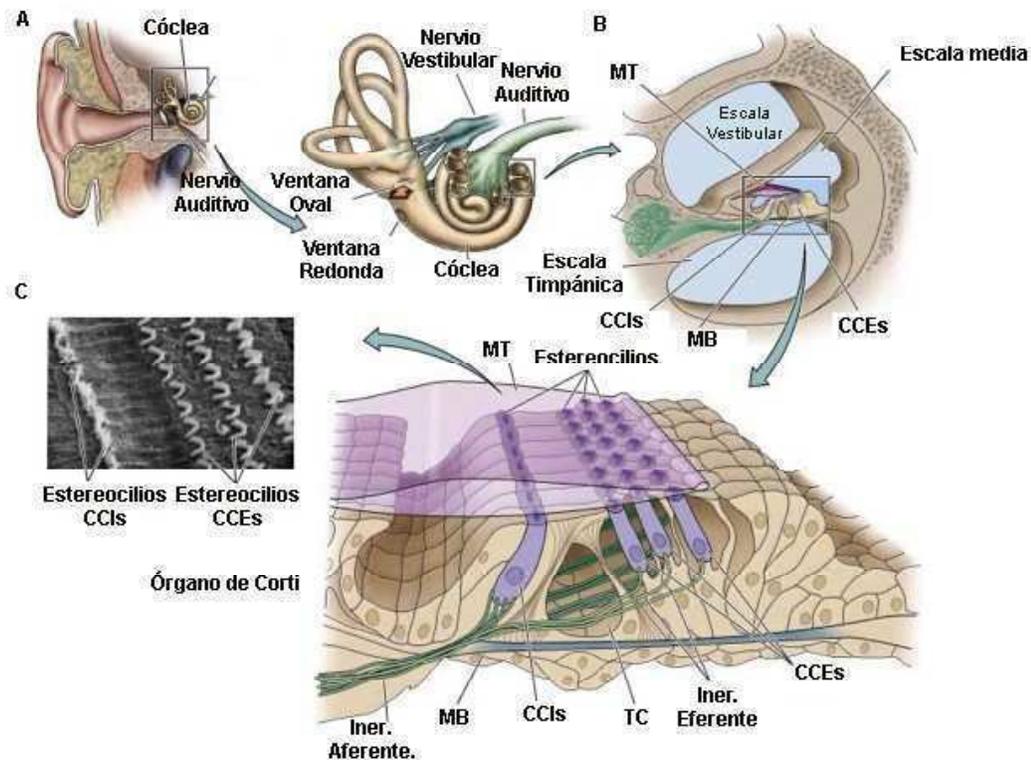


Figura 1. Estructura anatómica del oído. (A) Gráfico que muestra la estructura anatómica del oído externo, medio y interno. En el oído interno se ubica la cóclea y el sistema vestibular. (B) Corte sagital del ducto coclear que rodea al modiolo. En la escala media se encuentran las células ciliadas. (C) El órgano de Corti, el epitelio sensorial de la cóclea, donde se ubican las células ciliadas internas y las células ciliadas externas con su respectiva inervación. MT: membrana tectorial, MB: membrana basilar, TC: túnel de Corti, CCLs: células ciliadas internas, CCEs: células ciliadas externas. Esquema adaptado

del libro Neurociencia 2^{da} edición, editorial Sinauer Associates, Inc 2001.

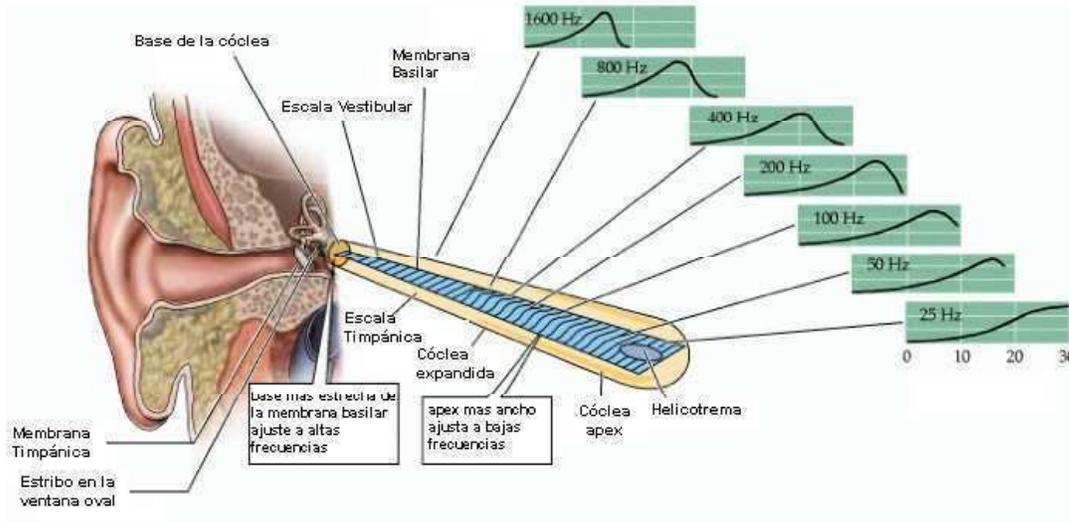


Figura 2. Distribución de frecuencias a lo largo de la membrana basilar de la cóclea en humanos. En la base de la cóclea están representadas las frecuencias altas con un órgano de Corti mucha más estrecho. Hacia el ápex el órgano de Corti es más ancho y más sensible a bajas frecuencias. Esquema adaptado del libro Neurociencia 2^{da} edición, editorial Sinauer Associates, Inc 2001.

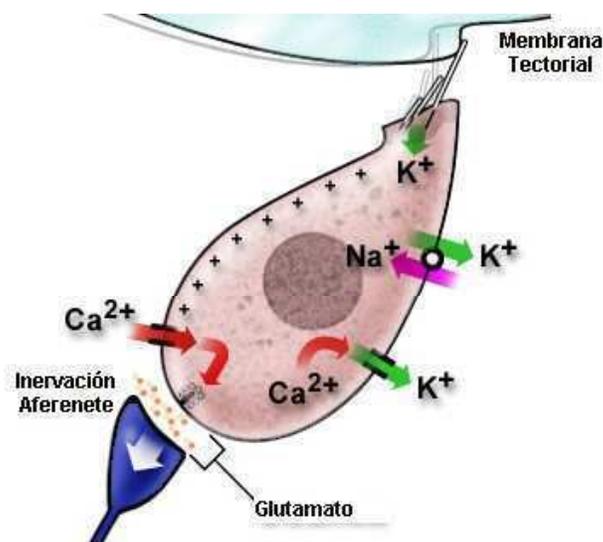
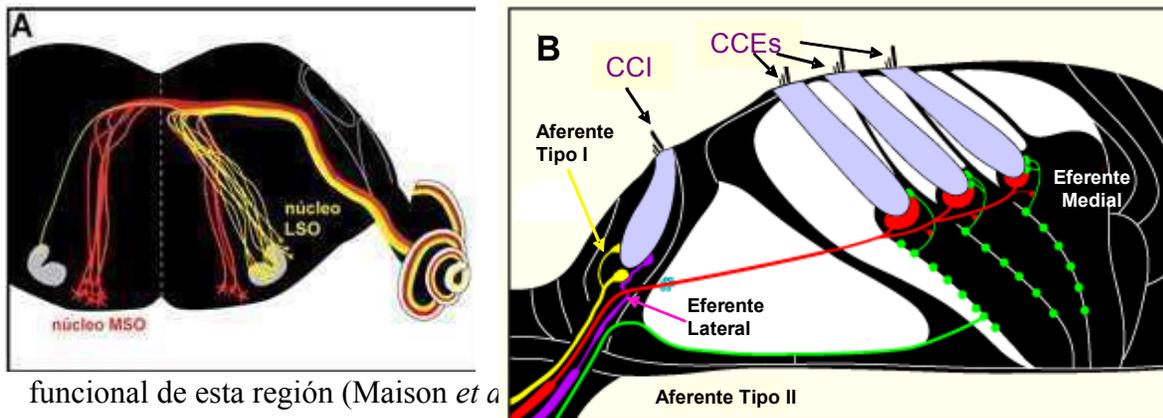


Figura 3. Esquema de una célula ciliada interna con su inervación aferente de tipo I luego de un estímulo auditivo. Al generarse la deflexión de los estereocilios por el movimiento de la membrana basilar y la membrana tectorial se produce la apertura del mecanotransductor (ubicado en el estereocilio). La entrada de cationes (K^+ y Ca^{2+}) produce la despolarización de la célula. Esto genera la activación de canales voltaje dependientes y la liberación de glutamato hacia las fibras aferentes. Esquema adaptado de la página web://www.urc.montp.iserm.fr/cric/audition.

1.4 Inervación de las células ciliadas de la cóclea de mamíferos en adultos.

Varios tipos de fibras nerviosas inervan el órgano de Corti y lo conectan a éste con el sistema nervioso central. Las fibras que van desde el órgano de Corti hacia el sistema nervioso central son las fibras aferentes y las que van en dirección inversa son las fibras eferentes. Dentro de las fibras aferentes existen dos tipos: las fibras de tipo I que están recubiertas por una gruesa capa de mielina, las cuales realizan contactos sinápticos con las CCIs y las delgadas fibras aferentes no mielinizadas de tipo II que realizan contactos con las CCEs (Rosenbluth, 1962; Tomasen, 1966; Kellerhals, Engström y Ades, 1967). En la cóclea de los mamíferos el sistema eferente proviene desde el tronco encefálico a través del haz olivococlear que está formado por dos componentes (Figura 4 A). Las fibras eferentes olivococleares laterales (LOC) originadas alrededor del núcleo olivar superior lateral (LSO) con un origen principalmente ipsilateral. Estas neuronas poseen axones no mielinizados y realizan sinapsis axodendritas con las fibras aferentes de tipo I, por debajo de las CCIs. Por otro lado, las neuronas mielinizadas olivococleares mediales (MOC) con un origen contralateral e ipsilateral en el núcleo olivar superior medial (MSO), las cuales inervan directamente a las CCEs (Warr y Guinan, 1979) (Figura 4 B). Experimentos en gatos (Spoendlin, 1973) y en cobayos (Morrison, Schindler y Wersäll, 1975) mostraron que el 90% al 95% de las fibras aferentes son del tipo I y hacen contactos con las CCIs. En esta región las fibras tienen muy pocas ramificaciones y a cada CCI llegan 20 fibras aferentes de tipo I. En las diferentes vueltas de la cóclea el

número de fibras que hacen contactos con las CCI no es constante y depende de la importancia funcional para una determinada frecuencia. Por ejemplo, en humanos y en gatos encontramos una altísima densidad de inervación en la región medial de la cóclea. Las fibras eferentes laterales no mielinizadas que están en la región de las CCI son fibras muy ramificadas y forman varicosidades antes de generar el contacto con las fibras aferentes. Las fibras aferentes de tipo II conforman el 5% de las fibras aferentes. Poseen una alta ramificación y una fibra de tipo II puede recibir información desde seis a cien CCEs, en general provenientes todas ellas de la misma fila de CCEs. Las fibras eferentes mediales mielinizadas se dirigen hacia las CCEs y en algunos pocos casos también hacen contactos con las fibras aferentes (Guinan, Warr y Norris, 1983). En algunos mamíferos estudiados (ejemplo el ratón), se encuentra una mayor densidad de inervación eferente medial en la región medial de la cóclea, lo cual se correlaciona con la importancia



funcional de esta región (Maison *et al*

Figura 4. Esquema de la inervación eferente y aferente de la cóclea en un ratón adulto. (A) Sección transversal del tronco encefálico donde se identifican las neuronas olivococleares que proyectan los axones hacia las CCIs y CCEs. **(B)** Corte transversal del órgano de Corti donde se puede identificar las CCIs y las CCEs con su respectiva inervación. Se detallan las fibras aferentes de tipo I y II como también las fibras eferentes medial y lateral. LSO: núcleo olivar superior lateral, MSO: núcleo olivar superior medial.

1.5 La función de las CCEs se encuentra bajo la influencia del sistema nervioso central a través de la inervación eferente medial.

La inervación olivococlear eferente se origina en el tronco encefálico y finaliza en el órgano de Corti, permitiendo que el sistema nervioso central tenga una influencia en la funcionalidad coclear. Un acontecimiento importante en el entendimiento de la función del sistema eferente fue la clasificación de las fibras en dos grupos, inervación lateral y medial (Warr y Guinan, 1979; Guinan, Warr y Norris, 1983). Hoy sabemos que la mayoría de los efectos producidos por la estimulación del sistema eferente se deben a la acción del haz medial sobre las CCEs. Las CCEs mediante su propiedad electromotil aumentan la sensibilidad y sintonización fina de la membrana basilar. Este proceso activo generado por la actividad de las CCEs es la base de la producción de las emisiones otoacústicas (EOAs), sonidos generados dentro de la cóclea que pueden ser registrados mediante un micrófono en el oído (Brownell *et al.*, 1985; Davis, 1983; Dallos y Evans, 1995). Aunque los primeros trabajos pusieron énfasis en el efecto de la inervación eferente a bajos niveles de sonido, trabajos recientes sugieren que el efecto más significativo de la inervación eferente medial sería a niveles moderados y altos. El sistema MOC es un sistema inhibitorio: disminuye la amplificación mediada por la actividad de las CCEs (Guinan y Stankovic, 1995). Se cree que el MOC actuaría en la reducción del enmascaramiento, reduciendo el ruido de fondo para favorecer la detección de una señal sonora (Kawase, Deglute y Liberman, 1993). El MOC estaría también involucrado en una disminución transitoria de la sensibilidad coclear durante otras tareas comportamentales de atención (ejemplo estímulos visuales) (Delano *et al.*, 2007). Por último, otra función posible de la inervación eferente medial es la prevención al daño acústico que se produce debido a sonidos intensos (Rajan y Johnstone, 1983; Rajan, 1988b; Reiter y Liberman, 1995).

Existe una abundante evidencia que indica que la acetilcolina (ACh) es el principal neurotransmisor liberado por las fibras eferentes hacia las CCEs (Guth, Norris y Bobbin, 1976; Bledsoe, Bobbin y Puel, 1988; Evalin, 1993). El mecanismo por el cual la ACh modula el funcionamiento de las células auditivas fue revelado a través de un gran número de experimentos realizados en células ciliadas aisladas de diferentes especies

(pollo, tortuga y mamífero). El modelo actual de acción de la ACh sobre las células ciliadas cocleares supone una secuencia de eventos que incluyen una despolarización transitoria de la membrana de las CCEs y entrada de Ca^{2+} en presencia de la ACh, seguida de la activación de canales de K^+ de baja conductancia activados por Ca^{2+} (SK2) y la consecuente hiperpolarización de las CCEs (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992a, b; Doi y Ohmori, 1993; Blanchet *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Fuchs, 1996; Nenov *et al.*, 1996b; Dulon *et al.*, 1998; Yuhas y Fuchs, 1999; Oliver *et al.*, 2000). Hay además evidencias que sugieren que los depósitos intracelulares de Ca^{2+} participarían en esta respuesta inhibitoria (Lioudyno *et al.*, 2004) (Figura 5).

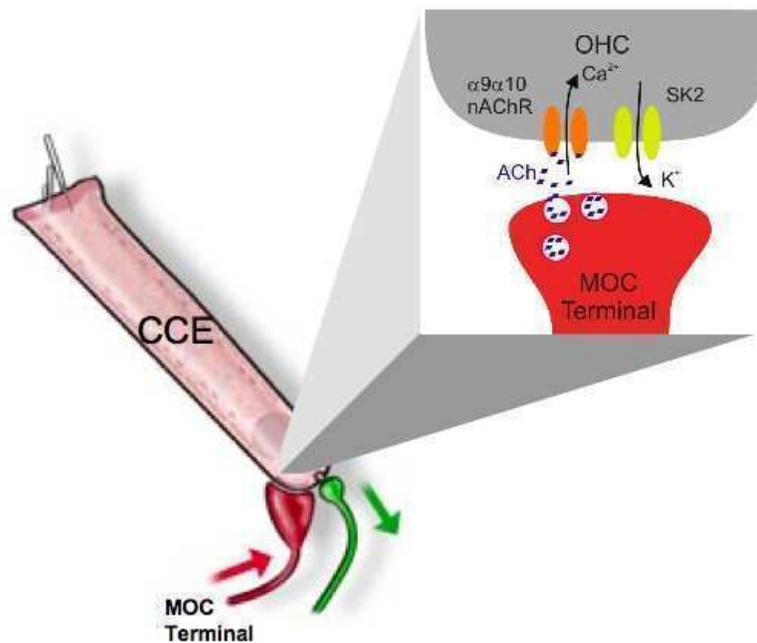


Figura 5. Inervación olivococlear eferente medial (MOC) en contacto con las CCEs.

La estimulación de las fibras eferentes produce la liberación de ACh en la brecha sináptica, el neurotransmisor genera la activación del receptor nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y por consiguiente la entrada de Ca^{2+} a la célula. El incremento de Ca^{2+} produce la activación de canales sensibles a Ca^{2+} (SK2) los cuales generan la liberación de K^+ y posterior hiperpolarización de las células.

1.6 Receptores colinérgicos

Los receptores colinérgicos se clasifican, en base a sus propiedades farmacológicas, en nicotínicos y muscarínicos (Dale, 1914; Taylor, 1990). Dichos receptores difieren en su estructura molecular y forman parte de dos familias génicas distintas. Los receptores muscarínicos, también llamados receptores colinérgicos metabotrópicos, pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores están formados por una única cadena polipeptídica con siete pasos transmembranales (Hosey, 1992). Se encuentran principalmente en células efectoras de la división autonómica del sistema nervioso periférico, ganglios y cerebro. Los receptores nicotínicos (nAChRs), también llamados receptores colinérgicos ionotrópicos, pertenecen a la gran familia de canales iónicos activados por ligando, que también incluye a los receptores de glicina, de GABA_A, GABA_C, de serotonina tipo 3 (5HT₃) y también algunos de invertebrados (Karlín, 2002). Los receptores nicotínicos se encuentran tanto en la placa neuromuscular como en el sistema nervioso central y periférico de los mamíferos. En la placa neuromuscular y en el sistema nervioso autónomo median la transmisión colinérgica excitatoria rápida a nivel sináptico. A nivel central, estos receptores tienen localización principalmente pre-sináptica modulando la liberación de otros neurotransmisores (Jones, 1999).

1.6.1 Los receptores colinérgicos nicotínicos.

Los nAChRs fueron caracterizados en un principio por su capacidad de ser activados por la nicotina. La activación de estos receptores por la ACh lleva a una rápida entrada de Na⁺ y Ca²⁺ con la consecuente despolarización celular. Los nAChRs son complejos protéicos compuestos por cinco subunidades dispuestas de forma tal que generan un poro que atraviesa la membrana plasmática (Figura 6 A). Cada una de estas subunidades son similares en su secuencia aminoacídica y en su topología: cada subunidad presenta un gran dominio amino terminal extracelular seguido por cuatro segmentos transmembranales (M1-M4), con un dominio intracelular formado por una

larga porción de secuencia que conecta los segmentos M3 y M4, y un pequeño dominio carboxilo terminal extracelular (Karlin, 1993) (Figura 6 A). A partir de estudios de afinidad se pudo deducir la posición de los distintos segmentos transmembranales con respecto al ambiente lipídico de la membrana que rodea al receptor. Todos los dominios M4 miran hacia los lípidos, al igual que los dominios M1 y M3 (Hucho et al., 1986). Por otro lado, ninguno de los dominios M2 de las distintas subunidades se encuentra en contacto con los lípidos y se postula que los mismos conformarían la pared del poro del canal. Estos segmentos M2 han sido evidenciados como anillos de cinco densidades con forma cilíndrica, consistentes con una conformación hélice α (Figura 6).

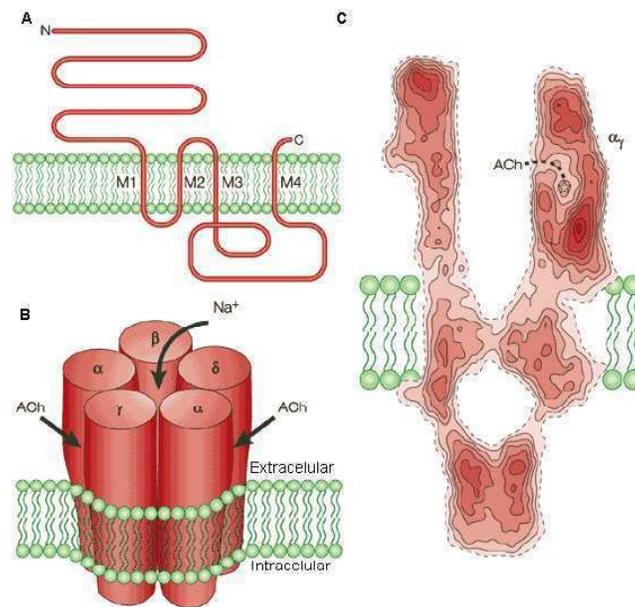


Figura 6. Estructura del nAChR. (A) Detalle de una subunidad del receptor donde se observan los 4 dominios transmembrana y el dominio N-terminal. (B) Esquema de una estructura con las 5 subunidades acopladas de un receptor nicotínico muscular. Se señalan los sitios de unión de la ACh entre una subunidad α y una β y entre una subunidad α y una subunidad δ . (C) Sección transversal del receptor determinada por microscopía electrónica de la estructura tubular de cristales de la raya Torpedo.

1.7 Estructura primaria del receptor colinérgico de las CCEs.

La estructura primaria del receptor colinérgico presente en las CCEs permaneció desconocida durante aproximadamente veinte años. Como ya se ha descrito, la aplicación de la ACh en las células ciliadas aisladas genera una respuesta hiperpolarizante debido a la activación de una corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} (Figura 5). Se propuso entonces, que este receptor colinérgico podría pertenecer tanto a la familia de canales iónicos activados por ligando, como a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Fuchs y Murrow, 1992b; Kakehata *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996). Sin embargo, debido a que este receptor presenta características farmacológicas y electrofisiológicas atípicas, no se lo había podido clasificar como nicotínico o muscarínico. El receptor nativo presente en las CCEs es activado no sólo por la ACh, sino también por el agonista colinérgico carbacol, el agonista nicotínico DMPP y el agonista muscarínico oxotremorina-M. Por otro lado, el agonista colinérgico clásico nicotina no es capaz de generar respuestas. Más aún, este compuesto antagoniza las respuestas inducidas por la aplicación de la ACh. Sumado a este perfil farmacológico peculiar, este receptor es bloqueado por antagonistas nicotínicos tales como la d-tubocurarina y la α -bungarotoxina, antagonistas muscarínicos como la atropina, antagonistas glicinérgicos como la estricnina y gabaérgicos como la bicuculina. Esta farmacología atípica llevó a postular que el receptor colinérgico presente en las CCEs era de un subtipo desconocido, no clonado hasta ese momento (Fuchs y Murrow, 1992a; Erostequi *et al.*, 1994a).

Con el clonado de la subunidad nicotínica $\alpha 9$, se logró descifrar la naturaleza molecular del receptor colinérgico nativo de las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 1994). El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por $\alpha 9$ reveló que esta subunidad pertenece a la familia de canales iónicos activados por ligando con ‘asa de cisteína’, que incluye a los receptores nicotínicos, de ácido γ -amino-butírico tipo A ($GABA_A$) y tipo C ($GABA_C$), glicina, serotonina tipo 3 ($5HT_3$) y también algunos de invertebrados. Esta secuencia presenta una mayor homología con las subunidades de nAChRs: cuatro regiones hidrofóbicas transmembranales (M1-M4), y residuos de cisteína en las posiciones 133, 147, 197, 198 (numeración para $\alpha 9$). Por este motivo, a esta subunidad se

la denominó $\alpha 9$, siguiendo con la nomenclatura vigente. La identidad de secuencia entre esta subunidad y el resto de los miembros de la familia de nAChRs es menor al 39%, lo cual sugiere que la subunidad $\alpha 9$ es un miembro distante de la familia de los nAChRs (Elgoyhen *et al.*, 1994).

Estudios de hibridización *in situ* y de RT-PCR mostraron que la subunidad nicotínica $\alpha 9$ tiene un patrón de expresión característico. Esta subunidad se expresa en las células ciliadas de la cóclea y en las células ciliadas del sistema vestibular (Elgoyhen *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1998a). También se reportó la expresión de $\alpha 9$ en la *pars tuberalis* de la pituitaria, el epitelio olfatorio, la lengua (Elgoyhen *et al.*, 1994), linfocitos (Peng *et al.*, 2004), células de la médula ósea, condrocitos, osteoblastos (Luo *et al.*, 1998a), queratinocitos de la piel (Grando, 2000; Nguyen *et al.*, 2000) y espermatozoides humanos (Kumar y Meizel, 2005), lo que estaría mostrando una posible función del receptor $\alpha 9$ distinta a su participación en la audición y el equilibrio. La expresión de la subunidad $\alpha 9$ en oocitos de *Xenopus laevis*, reveló la formación de canales homoméricos catiónicos activables por la ACh. Este canal presenta una farmacología muy peculiar, similar a la del receptor nativo de las CCEs, que lo diferencia del resto de los nAChRs y que hace difícil su clasificación farmacológica (Elgoyhen *et al.*, 1994; Rothlin *et al.*, 1999; Verbitsky *et al.*, 2000). Otras características importantes del receptor recombinante homomérico $\alpha 9$ son: su alta permeabilidad al Ca^{2+} , la ausencia de desensibilización ante la aplicación prolongada o intermitente de una concentración saturante del agonista y el bloqueo dependiente del voltaje de las corrientes colinérgicas a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} . A partir de estos estudios, se postuló que la subunidad nicotínica $\alpha 9$ es un componente estructural fundamental del receptor colinérgico presente en la base de las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 1994). La función clave que tiene esta subunidad $\alpha 9$ en la sinapsis olivococlear fue confirmada, además, mediante la generación de un ratón mutante nulo para el gen que codifica para la subunidad $\alpha 9$, *Chrna9* (Vetter *et al.*, 1999). Como ha sido descrito anteriormente, la activación del sistema eferente olivococlear disminuye la sensibilidad de la cóclea. Estos ratones *knock out*, carentes de la subunidad $\alpha 9$, resultan funcionalmente desferentados dado que no son capaces de suprimir las respuestas cocleares al estimular las fibras eferentes. Esto demuestra que la subunidad $\alpha 9$ juega un

papel fundamental en mediar el único efecto claramente descrito para el sistema eferente olivococlear. Más aún, las CCEs de los ratones *knock out* están inervadas por un único gran terminal sináptico, a diferencia de las CCEs de los ratones salvajes que están inervadas por múltiples y pequeños terminales. Esta diferencia revela la participación de la subunidad $\alpha 9$ en el desarrollo y en el establecimiento de los contactos sinápticos normales entre las fibras eferentes y las células ciliadas (Vetter *et al.*, 1999).

A pesar de la similitud farmacológica descripta, existían en la bibliografía algunos indicios que indicaban que las propiedades del receptor nativo de las CCEs de la cóclea diferían con respecto a lo observado para el receptor recombinante homomérico $\alpha 9$: (1) las respuestas del receptor nativo producidas por la ACh se desensibilizan ante la aplicación del agonista (Blanchet *et al.*, 1996; Dulon y Lenoir, 1996), (2) el Ca^{2+} potencia las corrientes activadas por la ACh en el receptor nativo del cobayo (Blanchet *et al.*, 1996; Evans, 1996) o ejerce una modulación bifásica, potenciación y bloqueo, sobre el receptor nativo de pollo (McNiven *et al.*, 1996) y (3) las conductancias del receptor nativo son mayores a potenciales de membrana hiperpolarizados (Dulon y Lenoir, 1996). Aún cuando estas discrepancias podrían deberse a alguna modificación post-traducciona diferencial entre el sistema heterólogo y el nativo, también podrían derivar de la posibilidad de que el receptor nativo estuviese compuesto por alguna otra subunidad además de $\alpha 9$.

El clonado de la subunidad nicotínica $\alpha 10$ a partir de una biblioteca de ADNc de cóclea (Elgoyhen *et al.*, 2001), dió lugar a un nuevo desafío en la elucidación de la estructura del receptor presente en las células ciliadas. Esta nueva subunidad tiene un 36% de identidad de secuencia con las subunidades nicotínicas α hasta entonces conocidas y una mayor homología con la subunidad $\alpha 9$ (57%) (Elgoyhen *et al.*, 2001). La proteína $\alpha 10$ se expresa en los órganos sensoriales de la cóclea y del sistema vestibular (Elgoyhen *et al.*, 2001), en queratinocitos (Sgard *et al.*, 2002) y en linfocitos (Peng *et al.*, 2004). La inyección de oocitos de *Xenopus laevis* con el ARNc de la subunidad $\alpha 10$ sólo o en combinación con las subunidades nicotínicas $\alpha 2$ - $\alpha 6$ o $\beta 2$ - $\beta 4$ no resulta en la formación de canales activables por la ACh. Sin embargo, la expresión conjunta de $\alpha 9$ y $\alpha 10$ resulta en la formación de receptores heteroméricos cuyas respuestas a la aplicación

de ACh son dos órdenes de magnitud más grandes que las obtenidas con el receptor recombinante homomérico $\alpha 9$ (Elgoyhen *et al.*, 2001). A diferencia de lo observado para el receptor recombinante homomérico $\alpha 9$, el receptor recombinante heteromérico $\alpha 9\alpha 10$ se desensibiliza durante la aplicación continua o intermitente del agonista, las respuestas evocadas por la ACh son moduladas por el Ca^{2+} extracelular de manera bifásica (a concentraciones bajas de Ca^{2+} extracelular, 0,2 mM, se observa un efecto potenciador, mientras que a mayores concentraciones se evidencia un efecto bloqueante) y la relación de corriente en función del voltaje (*I-V*) no presenta rectificación entrante (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002). Aunque la presencia de la subunidad $\alpha 10$ introduce algunas diferencias en las características biofísicas del receptor $\alpha 9\alpha 10$ con respecto a lo observado para el nAChR homomérico $\alpha 9$, ambos receptores exhiben un perfil farmacológico muy similar, casi idéntico al descripto para el receptor colinérgico nativo presente en las CCEs de la cóclea (Elgoyhen *et al.*, 2001). La similitud de las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor recombinante $\alpha 9\alpha 10$ con las del receptor nativo de las CCEs, han llevado a confirmar que ambas subunidades forman parte del receptor colinérgico que se encuentra presente en la sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares y las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 2001; Weisstaub *et al.*, 2002).

1.7.1 Estudio de mutaciones puntuales en la región del poro del canal en los receptores nicotínicos.

Como señalamos en el apartado 1.6.1 cada subunidad de los nAChRs posee un dominio N-terminal extracelular, cuatro pasos transmembrana y un dominio C-terminal extracelular. Las cinco subunidades que poseen estos receptores se disponen espacialmente alrededor de un eje central, quedando los dominios M2 como las paredes del poro del canal. La determinación de los residuos involucrados en el proceso alostérico desencadenado por la unión del agonista y su transducción en la apertura del canal (*gating*), ha sido objeto de numerosos estudios realizados sobre distintos miembros de esta superfamilia arrojando evidencias que en muchos casos se contraponen.

Estudios de mutagénesis de un residuo de leucina (Leu9') altamente conservado

entre los miembros de esta superfamilia han implicado a la zona central del M2 en la compuerta de los receptores nicotínicos (Filotov y White, 1995; Labarca *et al.*, 1995; Revah *et al.*, 1991) y GABA tipo A y C (Chang y Weiss, 1999, 1998). Mediante la misma técnica, se ha puesto en evidencia la participación de la valina (Val) 13' del M2 en la compuerta del nAChR $\alpha 7$ (Corringer *et al.*, 1999; Galzi *et al.*, 1992). Por otro lado, existen otras evidencias de que los residuos 12' del M2 del nAChR muscular contribuyen de manera independiente y asimétrica al *gating* del receptor. Por ejemplo, mutaciones en $\delta 12'$ afectan en mayor grado al *gating* que las mismas mutaciones en $\alpha 12'$ o $\beta 12'$ (Grosman y Auerbach, 2000). Por otro lado, estudios de mutagénesis del esqueleto hidrocarbonado sugieren que residuos ubicados en la zona central hacia la región extracelular del M2 (13', 16', 19') estarían involucrados en el proceso de *gating* del canal (England *et al.*, 1999).

El uso de la determinación de constantes de equilibrio de energía libre, ha permitido proponer que las hélices α del dominio M2 del nAChR muscular giran y se doblan sobre sus residuos centrales durante el *gating* del canal, acompañando un cambio conformacional que se inicia en la porción extracelular del M2 y se propaga hacia la intracelular (Cymes *et al.*, 2002). El modelo atómico de 4 Å de resolución del poro cerrado del nAChR presente en la raya torpedo, propone que la compuerta es un cinturón hidrofóbico constrictor del poro que involucra a los residuos Leu9' y Val13' del dominio M2 (Miyazawa *et al.*, 2003). Dicho estudio sugiere que la zona central del poro presenta propiedades especiales: es la zona de mayor constricción permitiendo interacciones hidrofóbicas entre superficies equivalentes de residuos homólogos. Estas interacciones ocurren en dos zonas: una que involucra a la Leu9' con la serina (Ser) 10' de la subunidad vecina y la otra a la Val 13' con la fenilalanina (Phe) 14' vecina. Beckstein O. y colaboradores (2005) generaron simulaciones dinámicas sobre un modelo de los M2 del nAChR muscular y arribaron a la conclusión de que la constricción presente en la mitad de dichos dominios forma una compuerta hidrofóbica, la cual genera una barrera energética al paso de los iones. El modelo propuesto por estos autores sugiere que la barrera para un ión sodio se extiende desde la Leu 9' hasta Val 17' y que la zona de mayor impedimento energético coincide con la Val 13'. Para tratar de responder este interrogante Paola Plazas realizó un estudio de mutagénesis sitio específica de tres anillos

de residuos hidrofóbicos (17' región externa, 13' y 9' región ecuatorial) del M2 del nAChR $\alpha 9\alpha 10$, los cuales darían hacia el lumen del canal en una organización estratificada de las hélices α del mismo (Bertrán *et al.*, 1993; Karlin y Akabas, 1995; Miyazawa *et al.*, 2003). Los residuos hidrofóbicos fueron mutados a residuos hidrofílicos de treonina. Se analizó los fenotipos de los receptores ensamblados desde las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ mutadas en cada posición detectando evidencias, como fue reportado en otros nAChR, que principalmente en los aminociados ubicados en la posición 9' y 13' están involucrados en el *gating* del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Plazas *et al.*, 2005).

1.8 Importancia del receptor colinérgico nicotínico durante el desarrollo de las CCI.

Como mencionamos anteriormente, en la cóclea madura, las CCI transducen los estímulos sonoros y se comunican con el sistema nervioso central mediante las fibras aferentes. Se considera que la inervación eferente directa a las CCI maduras es mínima o nula. Sin embargo, al momento del nacimiento las fibras olivococleares mediales, hacen contactos axosomáticos con las CCI, antes de inervar finalmente a las CCEs (Pujol *et al.*, 1998) (Figura 7). Esta inervación es transitoria y desaparece al comienzo de la audición, que en ratas y ratones es a partir del día 12-13 postnatal (P12-P13). Estos contactos transitorios fueron descritos en varias especies: ratas (Lenoir *et al.*, 1980), gatos (Ginzberg y Morest, 1984), hamsters (Simmons *et al.*, 1996b; Simmons *et al.*, 1998) y ratones (Emmerling *et al.*, 1990; Sobkowicz y Slapnick, 1994). Las CCI expresan el ARN mensajero que codifica para la subunidad $\alpha 9$ desde el estadio embrionario 18 (E18) hasta el adulto (Elgoyhen *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1998a; Simmons y Morley, 1998), pero expresan el ARN mensajero que codifica para la subunidad $\alpha 10$ sólo desde E21 hasta P15 aproximadamente (Elgoyhen *et al.*, 2001; Morley y Simmons, 2002), período en que las fibras eferentes olivococleares hacen contactos axosomáticos con las CCI. Al comienzo de la audición, la mayoría de los terminales eferentes cambian su trayectoria y atraviesan el túnel de Corti para inervar la base de las CCEs

Glowatzki y Fuchs (2000), utilizando explantos de cóclea de rata, demostraron la

presencia de corrientes sinápticas y de corrientes producidas por la aplicación de la ACh en las CCIIs previo al comienzo de la audición. Estos autores observaron que estas respuestas eran inhibitorias y que estaban mediadas por un receptor activado por la ACh y por la apertura subsiguiente de un canal de K^+ sensible al Ca^{2+} del tipo SK2. Las CCIIs inmaduras son capaces de generar potenciales de acción repetitivos y espontáneos (Kros *et al.*, 1998). Estos potenciales de acción están mediados por canales de Ca^{2+} y desaparecen al comienzo de la audición debido a la expresión de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de conductancia grande (canales de tipo BK) (Kros *et al.*, 1998). Se ha demostrado que esta actividad eléctrica de las CCIIs inmaduras es capaz de provocar la liberación del neurotransmisor (glutamato) en la sinapsis aferente (Beutner y Moser, 2001). La aplicación de la ACh en las CCIIs de la preparación aguda del órgano de Corti, antes del comienzo de la audición, produce una reducción en la frecuencia de los potenciales de acción espontáneos (Glowatzki y Fuchs, 2000). Esto indicaría que la inervación eferente estaría modulando la actividad eléctrica de las CCIIs y, consecuentemente, la liberación de neurotransmisor en la sinapsis aferente.

Las neuronas inmaduras del nervio auditivo disparan potenciales de acción con un patrón rítmico, tanto espontáneamente (Lippe, 1994), como en respuesta al sonido (Sanes y Walsh, 1998). Se observó que el patrón de disparo rítmico de estas neuronas inmaduras se vuelve continuo luego de cortar los terminales eferentes (Walsh *et al.*, 1998), lo que sugiere que la inhibición colinérgica a las CCIIs estaría imponiendo el patrón de disparo rítmico del nervio auditivo inmaduro. Un disparo coordinado de las fibras aferentes podría influir en la diferenciación sináptica, como se ha sugerido para las conexiones retinogeniculadas en las vías visuales (Cabelli *et al.*, 1995). Por otro lado, Puel y colaboradores (1995) han demostrado que la sinapsis axosomática a las CCIIs vuelve a aparecer en el adulto de una manera transitoria luego de que estas células son desconectadas de las dendritas aferentes auditivas mediante daño por excitotoxicidad.

Si bien no está claro aún cual es la función de la sinapsis eferente transitoria a las CCIIs, todas estas observaciones mencionadas anteriormente llevan a proponer que estaría involucrada en la maduración y el establecimiento de las vías auditivas durante el desarrollo. La inhibición colinérgica a las CCIIs podría ser importante para la maduración de las neuronas aferentes inmaduras (Eatock y Hurley, 2003; Glowatzki y Fuchs, 2000;

Fuchs, 2006). Además de estimular la actividad del nervio auditivo, la actividad de las CCI's inmaduras podría llevar a la liberación de factores neurotróficos esenciales para el mantenimiento de las neuronas del ganglio espiral (Erkman *et al.*, 1996; Knipper *et al.*, 1997). Estudios realizados en el laboratorio de la Dra. Elgoyhen han demostrado que las CCI's expresan receptores funcionales $\alpha 9\alpha 10$ antes del comienzo de la audición (Katz *et al.*, 2004; Gomez Cassatti *et al.*, 2005). Mas aún, luego del comienzo de la audición, las CCI's dejan de responder a la ACh (Katz *et al.*, 2004). Esta falta de respuesta a este neurotransmisor se correlaciona con la desaparición de la transcripción del gen *Chrna10* pero no del gen *Chrna9*.

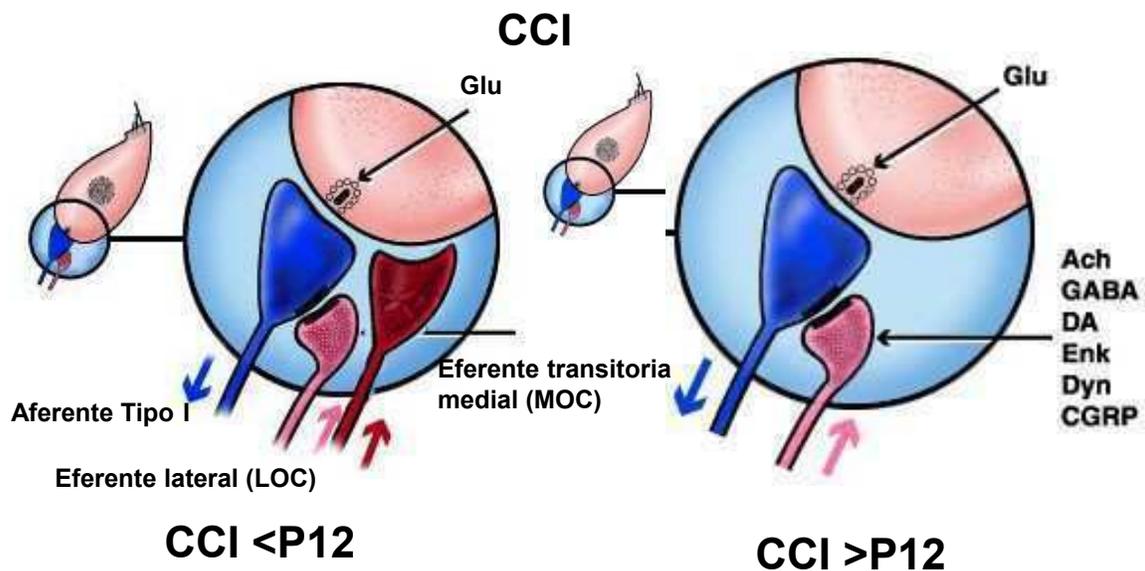


Figura 7. Gráfico que detalla la sinapsis de la inervación eferente medial transitoria con las CCI's antes y después del comienzo de la audición (P10-P13).

1.9 Estudios no invasivos de la función auditiva en ratones.

En los años 60 la función auditiva en animales de laboratorio era estudiada por técnicas invasivas con exposición de los órganos auditivos definida como “de campo cercano”. Para registrar Potenciales de Acción Compuestos (CAP) estas técnicas exponían la ventana redonda a través de la bulla timpánica o exponían al nervio auditivo

o al colículo inferior a través del cráneo (Alford y Ruben, 1963; Mikaelian y Ruben, 1964; Willott y Henry, 1974). El desarrollo y la pérdida de la audición son procesos progresivos, donde cada oído de un mismo animal no es igual al otro y estudios longitudinales de la función auditiva son a menudo requeridos en el mismo oído. Con el avance en el análisis de las señales auditivas a través de programas de computación se inició una nueva área de investigación definida como “de campo lejano” donde no es necesario exponer los órganos auditivos (Jewett, 1970), para lo cual se generó un sistema no traumático para el estudio de la función auditiva en ratones (Henry y Haytho, 1978; Henry y Lepkowski, 1978; Henry, 1979a). Además, esta nueva técnica utilizaba menos animales, menos insumos experimentales y menos tiempo.

1.9.1 Respuestas eléctricas evocados del tronco encefálico (BERA).

El BERA tiene numerosas aplicaciones tanto en la investigación como en la clínica. Estas incluyen estimaciones del umbral auditivo y la posible localización de una lesión (Weber, 1994). El BERA es un tipo de potencial auditivo evocado (PAE), y son registros de potenciales eléctricos del sistema auditivo en respuesta a un estímulo sonoro. Estos pueden ser clasificados de acuerdo a cómo se disponen los electrodos de registro (cerca vs lejos), la latencia (corta, media, larga) y el origen anatómico (cóclea, corteza y tronco encefálico). Corta, media y larga latencia responde a registrar a tiempos menores de 10 ms, 10 a 50 ms o a tiempos mayores de 50 ms, respectivamente. La latencia de un potencial evocado es un reflejo del nivel de la posición dentro de la vía auditiva de la estructura que da origen a la actividad eléctrica. Por ejemplo, respuestas con latencias cortas son generadas desde un origen coclear (electrococleogramas, ECohG) y respuestas con latencias largas son generadas corticalmente (BERA). Anatómicamente el término BERA implica un origen encefálico de la actividad eléctrica, pero también incluye una serie de contribuciones periféricas tempranas de otros componentes. Por ejemplo, los potenciales evocados periféricos de origen coclear poseen una combinación de potenciales originados en las CCI y CCEs y otros originados en el nervio auditivo (CAP). Todos estos, se cree, contribuyen a la primera onda del BERA. Henry (1979),

usando una combinación de latencias de BERA, comparando con potenciales evocados en “campo cercano” y técnicas de lesiones, concluyó que el primer pico (P1) tiene un origen coclear y los próximos 4 picos (P2 a P5) corresponden al núcleo coclear, al complejo olivar superior contralateral, al lemnisco lateral y al colículo inferior contralateral, respectivamente. El registro del BERA en ratones es simple y requiere de una instrumentación mínima. Electrodo de acero inoxidable son colocados en el vértice del cráneo y otro electrodo a tierra en el extremo superior de la cola en un ratón anestesiado. Repeticiones múltiples del estímulo son requeridas para realizar un promedio de las ondas registradas. Los BERA pueden ser registrados en respuesta a un estímulo de un amplio ancho de banda o también por clicks o tonos primarios, como se muestra en la Figura 8. Una limitación de usar estímulos con un amplio ancho de banda es que estos proveen muy poca información de especificidad de frecuencias. Por otro lado, el uso de tonos primarios da la ventaja de tener registros que brindan información de la frecuencia. En este trabajo los resultados del BERA serán obtenidos usando tonos primarios a diferentes frecuencia

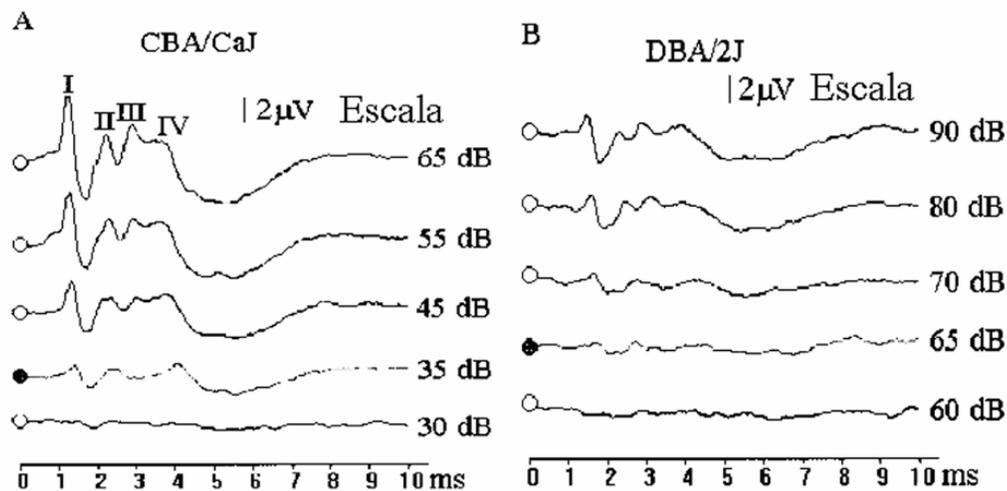


Figura 8. Determinación del umbral auditivo por BERA en diferentes cepas de ratones adultos. (A) Aumento progresivo de la intensidad del sonido (30, 35, 45, 55, 65 dB) para una frecuencia específica (32 kHz), donde el umbral auditivo se detectó a los 35 dB. **(B)** En este caso el umbral auditivo se detectó a 65 dB utilizando la misma frecuencia que en A.

1.9.2 Producto de Distorsión de Emisiones Otoacústicas (PD-EOAs).

En un oído sano, las CCEs actúan como un amplificador biomecánico (Kim, 1984). Las propiedades electromotiles de las CCEs (Browell, 1983; Browell *et al.*, 1985) le confieren a la cóclea un incremento en su actividad, propiedades de no linealidad durante la amplificación, y un ajuste mecánico fino en su sensibilidad (Sellick, *et al.*, 1982). Las propiedades únicas de las CCEs son la base de las emisiones otoacústicas (EOAs). Las EOAs son sonidos de baja intensidad generados desde la cóclea, los cuales son propagados en forma reversa a través del oído medio y el tímpano (Kemp, 1978). En animales en los cuales las CCEs son destruidas por excesiva exposición al ruido (Kim *et al.*, 1980; Siegel *et al.*, 1982; Zurek *et al.*, 1982; Schmiedt, 1986; Lonsury-Martin *et al.*, 1987) o por exposición a drogas ototóxicas (Anderson y Kemp, 1979; Anderson, 1980; Kemp y Brown, 1984; Brown *et al.*, 1989) también desaparecen las EOAs corroborando que las EOAs son generadas por la actividad de las CCEs. Otro elemento que apoya esta asociación entre las CCEs y las EOAs surgió del estudio de ratones mutantes. Horner *et al.* (1985) y Schrott *et al.* (1991) realizaron experimentos evaluando las EOAs en ratones normales CBA y en ratones mutantes sordos (*Wv/Wv*, *Bronx waltzer*). En un ratón *Bronx waltzer* mutante que tiene el 100% de las CCEs pero que perdió un 80% de las CCIIs se pueden generar las EOAs. En cambio en el ratón *Wv/Wv* que posee la totalidad de las CCIIs pero en este caso se perdieron todas las CCEs no se puede detectar EOAs. Estos elementos demuestran que los EOAs dependen de la actividad de las CCEs pero no de las CCIIs. Además de las EOAs espontáneas, estas pueden evocarse por un estímulo controlado.

Tradicionalmente, las EOAs evocadas han sido subdivididas de acuerdo al estímulo utilizado para producirlas: estímulo-frecuencia (tono puro), transitorias (click) o producto de distorsión (PD-EOA, dos tonos puros). Aunque las EOAs evocadas transitorias pueden ser registradas en ratones (Khvoles *et al.*, 1999), los PD-EOAs tienen la ventaja de poder utilizar frecuencias más altas. Los estímulos para generar PD-EOAs son generados a través de un procesador con una señal digital en el canal auditivo utilizando dos parlantes con dos canales separados D/A los cuales presentan dos

Julián Taranda
Introducción

estímulos (tonos primarios f_1 y f_2 , donde $f_2 > f_1$). De los dos estímulos uno es de alta frecuencia y otro es de baja frecuencia. El PD-EOAs generado por el oído es igual a $2f_1 - f_2$.

En humanos (Harris *et al.*, 1989) y en monos Rhesus (Park *et al.*, 1995) las emisiones de máxima amplitud ocurren cuando la relación de las frecuencias de los estímulos no excede un cociente de 1.2 ($f_{\text{alta frecuencia}}/f_{\text{baja frecuencia}}$). La señal final formado por la combinación de los dos tonos primarios posee una menor frecuencia e intensidad que los que lo forman. De esta forma se evitan distorsiones no fisiológicas y artificiales. Un micrófono, es colocado en el canal auditivo, y es usado para registrar los PD-EOA. El micrófono y los parlantes son sostenidos y colocados dentro del canal del oído para formar un sistema acústico cerrado. El registro del micrófono es un promedio en el tiempo sobre la duración del estímulo y se utilizan transformaciones de Fourier para producir un espectro con amplitud y fase.

OBJETIVOS

2. Objetivos.

Objetivo 1:

El objetivo de la Parte I de la tesis fue generar un ratón genéticamente modificado que albergase la mutación L9'T en el M2 de la subunidad $\alpha 9$ de receptores nicotínicos, de manera tal de obtener un animal en el cual la función del sistema eferente olivococlear estuviese aumentada. Asimismo, nos propusimos estudiar cuales eran las consecuencias de esta alteración en la fisiología coclear.

Finalmente, nos planteamos la hipótesis de que este animal podría servir como modelo para estudiar la participación del MOC en la protección ante el trauma acústico.

Objetivo 2:

El objetivo de la Parte II de la tesis, fue la de generar un ratón transgénico que exprese en forma constitutiva a la subunidad de nAChR $\alpha 10$ en las CCIIs luego del comienzo de la audición como un modelo para estudiar el período crítico de desarrollo de las CCIIs previo al comienzo de la audición. Nos planteamos la hipótesis que la subunidad $\alpha 10$ transgénica se ensamblaría con la subunidad $\alpha 9$ endógena que se expresa en las CCIIs antes del comienzo de la audición y que la expresión funcional de nAChR produciría cambios en el desarrollo de las CCIIs y de sus contactos sinápticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

Parte I

3.1 Generación del animal *knock in Chrna9 L9'T*.

3.1.1 Estrategia para la construcción del vector de recombinación.

1. Para la construcción del vector de recombinación homóloga se partió de un fragmento de 9.5 kb correspondiente al gen *Chrna9* que contiene los exones I, II, III y IV (Figura 9). Este fragmento fue obtenido de un clon aislado de una biblioteca de ADN genómico en λ ZAP cedida por el Dr. Bernhard Bettler, Universidad de Basilea (de acuerdo a lo descrito en Elgoyhen *et al*, 1994). El fragmento fue insertado en el plásmido pBluescript SK (-) (Stratagene, CA, USA) utilizando las endonucleasas de restricción HindIII y NotI (New England Biolabs Inc, MA, USA) para dar lugar al plásmido pM61-Hind III/Not I.
2. El pM61-HindIII/NotI fue digerido con las enzimas SphI y StuI (New England Biolabs Inc, MA, USA) y un fragmento de 2 Kb que contenía al exón IV del gen *Chrna9* fue subclonado en el plásmido pBluescript SK (-) 10.1.
3. Al pBluescript SK (-)10.1-StuI/SphI conteniendo al exón IV del gen *Chrna9* se le realizó una mutación puntual, de manera tal que el codón que codifica para una leucina en la posición 9' de la región M2 fue reemplazado por uno que codifica para treonina. Se utilizó para esto el *kit Quick Change Site Directed Mutagenesis* (Stratagene, CA, USA). Para la citada mutación se utilizaron oligonucleótidos iniciadores (*primers*), $\alpha 9$ sentido 5'-CTCTGGGAGTGACCATCCTAacGGCCATGACTGTATTTTCAGC-3' y $\alpha 9$ anti-sentido 5'-GCTGAAATACAGTCATGGCCgtTAGGATGGTCACTCCCAGAG-3'. La mutación puntual y las regiones adyacentes fueron secuenciadas para evitar la incorporación de mutaciones inadecuadas.
4. El plásmido pBluescript SK (-) 10.1-StuI/SphI fue digerido con AatII y SphI y el fragmento de 2 Kb conteniendo la mutación fue subclonado en el plásmido pM61-HindIII/NotI reemplazando al fragmento del alelo salvaje y dando lugar al plásmido pM61-HindIII/NotI*

(incorporación de la mutación).

5. El pM61-HindIII/NotI* fue digerido con la endonucleasa NcoI de manera tal de subclonar el *cassette* de neomicina flanqueado por sitios lox P.

6. El pM61-HindIII/NotI* que contenía el *cassette* de neomicina flanqueado por los sitios lox P fue digerido con NheI y NotI (New England Biolabs Inc, MA, USA). El fragmento de 10 kb fue insertado en el plásmido de clonado pKOscrambler (Stratagene, West Cedar Creek, TX, USA). Este vector contiene el gen que codifica para la cadena A de la toxina diftérica con el promotor de la ARN pol II para selección negativa de la integración al azar. Por otro lado, el *cassette* de neomicina incorporado en la construcción permite la selección positiva de células totipotentes (ES) resistentes a G418.

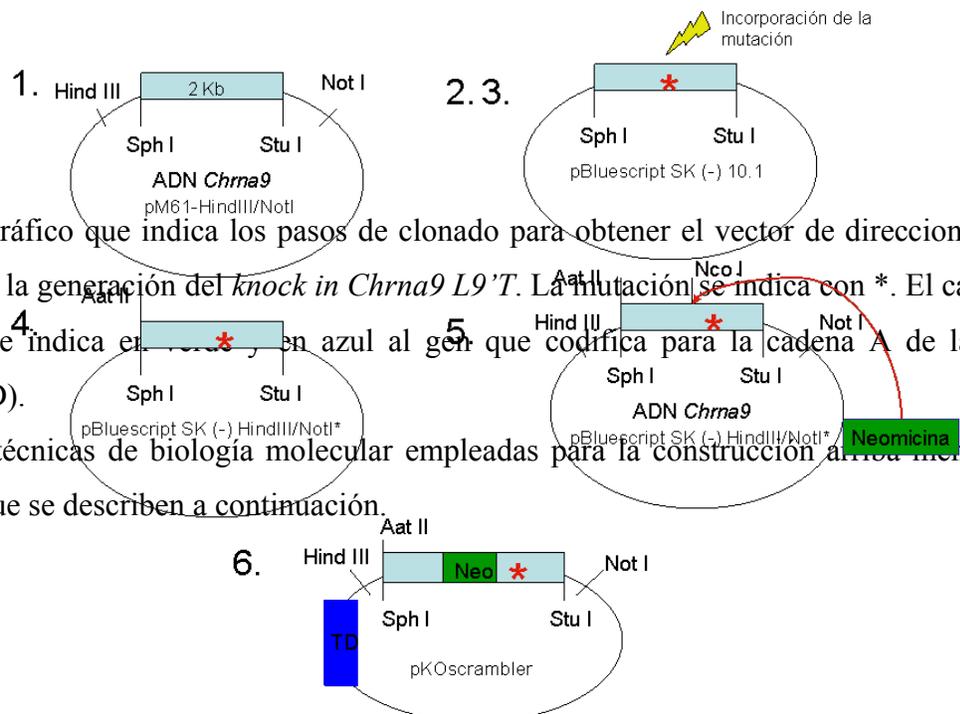


Figura 9. Gráfico que indica los pasos de clonado para obtener el vector de direccionamiento utilizado en la generación del *knock in Chrna9 L9'T*. La mutación se indica con *. El cassette de neomicina se indica en verde y en azul al gen que codifica para la cadena A de la toxina diftérica (TD).

Las técnicas de biología molecular empleadas para la construcción arriba mencionada fueron las que se describen a continuación.

3.2 Técnicas de biología molecular empleadas.

3.2.1 Cortes con enzimas de restricción y aislamiento por electroelución.

La preparación de fragmentos y vectores para las reacciones de ligación, fue realizada mediante cortes con enzimas de restricción de acuerdo a las instrucciones del proveedor, partiendo de 5 a 20 μg del fragmento o vector deseado, separación en geles de agarosa y posterior electroelución. El aislamiento por electroelución de fragmentos y vectores se realizó mediante una electroforesis preparativa del ADN digerido, en geles de agarosa al 0,7% con 1 μl de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), utilizando TBE 0,5X (Tris- borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8) como buffer de corrida. Luego de la electroelución las bandas se identificaron con un transluminador de luz UV. Cada banda fue cortada con un bisturí desde el gel y fue colocada en un tubo *ependorf* de 1,5 ml. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Stratagene, TX, USA) para identificar el tamaño de cada banda. La purificación del ADN del inserto o vector se realizó a través del *kit DNA Extraction from Agarose Gels* (Quiagen, CA, USA).

3.2.2 Generación de extremos romos.

Para generar extremos romos a partir de cortes con enzimas que dejan extremos cohesivos, se utilizó el fragmento mayor (Klenow) de la polimerasa de ADN de tipo I de *E. Coli* (Gibco BRL, MD, USA). En el caso de extremos 5' salientes, se hicieron reacciones de rellenado, utilizando la actividad polimerasa de la Klenow. En un tubo *ependorf* se agregó 0,5-1 μg del fragmento de ADN con extremos 5' salientes, 0,5 mM de cada dNTP, el buffer apropiado y 1 UE de Klenow. Se llevó a 30 μl con H_2O y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. La reacción fue terminada por extracción con 1 volumen de fenol equilibrado con Tris-ClH, pH 8 cloroformo:isoamílico 25:24:1 (PIC) incubándose por 5 min a temperatura ambiente y luego centrifugando a máxima velocidad. Se tomó la fase acuosa y se hizo una extracción con 1 volumen de cloroformo-isoamílico 24:1 (IC). Nuevamente, se volvió a

centrifugar a máxima velocidad por 1 min y se tomó la fase acuosa. El ADN fue precipitado agregando 0,1 volúmenes de una solución 3 M de acetato de sodio, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, incubándose por 10 min a -70°C y centrifugándose a máxima velocidad. El precipitado fue lavado con etanol al 70% y resuspendido en TE (Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM). En el caso de los extremos 3' salientes estos fueron digeridos utilizando la actividad 3'→5' exonucleasa de la enzima Klenow. En un tubo *eppendorf* se agregó 0,5-1 μg del fragmento de ADN de extremos 3' salientes, el buffer apropiado y 1 UE de enzima Klenow. Se llevó a 30 μl con H_2O y se incubó 30 min a temperatura ambiente. La reacción fue terminada y el ADN precipitado de la misma forma que para los extremos 5' salientes.

3.2.3 Defosforilación de vectores.

Las reacciones de defosforilación se realizaron con la enzima fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP, del inglés: Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Gibco BRL, CA, USA), incubando en el buffer provisto por el proveedor, 0,01 UE de CIAP por pmol de ADN con extremos 5' salientes, a 37°C durante 30 min, o 1 UE por pmol de ADN con extremos romos, a 50°C por una hora. La inactivación de CIAP se realizó por medio de una doble extracción con un volumen de PIC. Posteriormente se eliminaron las trazas de fenol y se precipitó el ADN como se especificó anteriormente.

3.2.4 Reacciones de ligación.

Para realizar las reacciones de ligación se utilizaron 20 μg de vector. El inserto se agregó en una proporción 3:1 molar, con respecto al vector (estas proporciones fueron calibradas corriendo previamente inserto y vector en un gel de agarosa). También se realizaron controles de vector sin ligasa y de vector con ligasa sin inserto. Las diferentes mezclas de vector e inserto y los controles se incubaron con 1 UE de la ligasa de ADN del fago T4 (Gibco BRL, CA, USA) en el buffer de ligación provisto por el fabricante, que contiene ATP, en un volumen de 10-20 μl dependiendo de las concentraciones de vector e inserto. Los tubos se incubaron

durante la noche a temperatura ambiente y luego se procedió a realizar la transformación de bacterias competentes.

3.2.5 Preparación de bacterias competentes.

A partir de un stock de glicerol se obtuvieron colonias independientes de la cepa DH5 α de E. Coli. Con una de estas colonias se realizó un inóculo en 3 ml de medio LB (bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5% y ClNa 1%) y fueron incubadas a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,3. Con este cultivo se inocularon 100 ml de medio LB y se creció con agitación a 37°C hasta alcanzar una DO₅₅₀ de 0,48. El cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó a 300 xg en un rotor GSA (Sorvall Instrument, MA, USA) durante 5 min a 4°C. El medio fue descartado y el precipitado resuspendido cuidadosamente en hielo con 40 ml de Tfb I (Acetato de potasio 30 mM, ClK 100 mM, Cl₂Ca 10 mM, Cl₂Mn 50 mM y glicerol 15%, llevado a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M). Las muestras se dejaron reposar brevemente en hielo y se centrifugaron en tubos de tipo Corex de 30 ml, a 300 xg por 5 min a 4°C. El precipitado se resuspendió cuidadosamente en hielo con 4 ml de Tfb II (MOPS 10 mM, Cl₂Ca 75 mM, ClK 10mM, glicerol 15%, llevado a pH 6,5 con KOH 1M). Las células se dejaron reposar en hielo durante 15 min y se fraccionaron en tubos *ependorf* estériles. Por último se guardaron a -70°C hasta su uso.

3.2.6 Transformación de células competentes.

Las bacterias competentes se descongelaron en hielo y se fraccionaron de a 50 μ l en tubos *ependorf* estériles. Se agregó a las bacterias 5 μ l del producto de la ligación y, sin sacar las bacterias del hielo, se mezcló suavemente con una punta de pipeta estéril. Las células se dejaron reposar en hielo durante 30 min. Luego se procedió a realizar un *shock* térmico, que consistió en colocar las bacterias a 42°C durante 90 seg para luego enfriarlas en hielo rápidamente. Las bacterias se recuperaron con 0,7 ml de LB fresco durante 30 min con agitación y a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron a 4.000 xg durante 2 min. Se descartó el

medio y se resuspendieron en 100 μ l de LB fresco. Las células recuperadas fueron plaqueadas en medio LB ágar con 50 μ g/ μ l de ampicilina y se incubaron al menos 16 horas a 37°C.

3.2.7 Identificación de colonias con el producto de ligación deseado.

Para identificar las colonias que contenían el producto de ligación deseado, se procedió a realizar un inóculo de colonias aisladas crecidas en 3 ml de medio LB suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina. El cultivo se creció durante toda la noche a 37°C y luego se procedió a realizar una extracción rápida que permite aislar ácidos nucleicos. Para ello a 100 μ l del cultivo se le agregó 50 μ l de PIC y 10 μ l de buffer de sembrado. Se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min. Una alícuota de 20 a 25 μ l fue sembrada en un gel de agarosa al 0,7%. Los clones positivos fueron identificados por su velocidad de migración diferencial con respecto a los controles sin inserto. Los posibles clones positivos fueron sometidos a una preparación a escala mínima (*miniprep*) con el resto del cultivo del tubo *eppendorf*. Para ello se centrifugó durante 30 seg a máxima velocidad. El precipitado fue resuspendido en 200 μ l de solución P1 (Tris-ClH 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa A 0,1 mg/ml). Luego se agregaron 200 μ l de solución P2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y se mezcló suavemente por inversión. Posteriormente, se agregaron 200 μ l de solución P3 (acetato de potasio 3 M, pH 8) y se mezcló vigorosamente por inversión. Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se le hizo una extracción con 1 volumen de PIC seguido de una extracción con 1 volumen de IC. Se extrajo la fase acuosa, se le agregó 0,8 volúmenes de 2-propanol (Sigma-Aldrich, MO, USA), se agitó suavemente, se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 xg durante 10 min. El precipitado fue lavado con etanol al 70%, secado y resuspendido en 40 μ l de TE. La confirmación de los clones seleccionados se realizó mediante cortes con enzimas de restricción como fue detallado anteriormente y por posterior visualización en geles de agarosa con bromuro de etidio.

3.2.8 Proceso de recombinación homóloga, selección y generación del *knock in Chrna9 L9* T.

El cultivo y electroporación de células totipotenciales embrionarias (ES) murinas, 129/SvJ y la selección de clones por la resistencia a G418 fue realizado en el centro de transgénesis de la Universidad de California en la ciudad de Los Ángeles en colaboración con el Dr. Jim Boulter, siguiendo métodos convencionales. Esto no se explica en esta tesis dado que no fue realizado por el doctorando.

3.2.9 Preparación de ADN de células ES.

Cada una de las colonias resistentes a G418 fue depositada en una placa de 96 multipocillos con fondo en U conteniendo 30 μ l de Tripsina-EDTA. Luego de haber completado la placa, se dejó en estufa a 37°C y CO₂ al 5% durante 10 minutos para disgregar cada colonia. Una vez completada la disgregación de cada colonia, con la ayuda de una pipeta multicanal se inactivó la Tripsina con 90 μ l de medio de cultivo fresco y se pipeteó, aspirando y expeliendo el medio para tener células aisladas. De los 120 μ l totales finales de cada pocillo, 60 μ l fueron pasados a una placa de 96 multipocillos con fondo plano conteniendo MEFs (fibroblastos embrionarios murinos) para crecerlos y obtener ADN para el análisis de *Southern blot* o PCR y los 60 μ l restantes fueron cubiertos con aceite mineral (analizado para células ES), envueltos en film transparente y congelados lentamente a -70°C hasta su nueva utilización.

3.2.10 Análisis de *Southern blot* para identificar el evento de recombinación homóloga.

Para realizar los *Southern blots*, 20 μ g de ADN genómico fueron digeridos con 50 UE de la enzima de restricción deseada por 12-14 horas. Luego se realizó una digestión adicional por 2 horas, agregando 20 UE de la misma enzima. Las digestiones se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol al 100%, se resuspendieron en TE y luego fueron sembradas en geles de agarosa al 0,8% y corridas a 3-5 V/cm. Al finalizar la corrida, se le tomó una foto en la que se incluyó un centímetro alineado en el punto de siembra y posteriormente los geles se

depurinizaron en una solución de ClH 0,25 M. Luego se desnaturalizaron durante 40 min (NaOH 0,5 N; ClNa 1,5 M), con agitación suave. Posteriormente, fueron sumergidos en una solución neutralizante (Tris-ClH 0,5 M pH 8, ClNa 1,5 M; EDTA 1 mM), 2 veces durante 30 min y se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon no cargadas. Luego de la transferencia, el ADN se fijó a las membranas con luz UV (120 mJ/cm²) y posteriormente se hibridó como se detalla a continuación.

3.2.11 Hibridación con una sonda de ADN marcada.

El fragmento de 200 pb que se muestra en la Figura 12 fue utilizado para identificar el evento de recombinación homóloga. Este fragmento fue preparado como se explicó en el apartado 3.2. Las sondas fueron marcadas con nucleótidos radiactivos por el método de iniciación al azar (*random priming*), utilizando el kit comercial Rad-Prime (Gibco BRL, CA, USA) como se detalla a continuación. Se hirvió 25 ng del fragmento a marcar en 10 µl de agua en un tubo *ependorf* durante 5 min, y luego se colocó rápidamente en hielo. El fragmento se incubó en una mezcla de marcación (preparada con reactivos e instrucciones provistas por el proveedor), que contenía hexanucleótidos, dNTPs (excepto dCTP) y la enzima Klenow, conjuntamente con 5 µl de α[³²P] dCTP 10 µCi/µl (Perkin Elmer Life Sciences Inc, MA, USA), durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo con 5 µl de buffer de terminación (provisto por el proveedor) y se precipitó agregando 1 µl de ARN de transferencia (10 mg/ml), 50 µl de ACNH₄ 5 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%. Se dejó a -70°C durante 30 min y luego se lo centrifugó a máxima velocidad. El sobrenadante fue descartado y el precipitado lavado con etanol preenfriado al 70%. Luego se procedió a centrifugar a máxima velocidad por 15 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en una solución de SDS 1%. Finalmente se guardó en hielo hasta ser utilizada. Las prehibridaciones e hibridaciones se realizaron en botellas rotatorias dentro de un horno de temperatura controlada. Las membranas fueron prehibridadas entre 1 y 2 horas en una solución conteniendo buffer fosfato 25 mM, pH 7,2, SSC 6X (20X ClNa 88,2 gr ClNa 175.3 gr), EDTA 1mM, Denhardt 5X (ficoll 0,1%, polivinilpirrolidona 0,1%, seroalbúmina bovina 0,1%), SDS 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón. Las hibridaciones se llevaron a cabo en la misma solución de

prehibridación durante 16 horas con el agregado de la sonda, previamente hervida durante 5-10 min y enfriada otros 2 min en hielo. Al finalizar la hibridación, la membrana fue sometida a una serie de lavados. Los mismos se realizaron de la siguiente manera: 2 lavados iniciales de 15 min cada uno con SSC 2X, SDS 0,1%, a temperatura ambiente, y dos lavados finales de alta rigurosidad con SSC 0,1X, SDS 0,1%, a 65°C. Una vez finalizados los lavados, las membranas se expusieron sobre películas auto-radiográficas, junto con pantallas intensificadoras de señal, a -70°C. El tiempo de exposición de las películas auto-radiográficas varió según la marca radiactiva detectada en los filtros luego de los lavados.

3.2.12 Inyección de células ES en blastocistos de ratón e implante del blastocisto en el útero de hembras pseudo preñadas.

Esto fue realizado en el centro de transgénesis de la Universidad de California en los Ángeles en colaboración con el Dr. Jim Boulter, siguiendo métodos convencionales que no se explican en esta tesis dado que no fueron realizados por el doctorando. En base al color del manto de los animales se seleccionaron machos que presentaron un alto grado de quimerismo. Estos fueron cruzados con hembras C57BL/6J y se seleccionaron crías que presentaban un manto de color totalmente agutí.

3.2.13 Identificación de ratones fundadores.

Los ratones fundadores fueron identificados mediante una PCR que amplifica la secuencia del *cassette* de neomicina. Los animales que fueron positivos al madurar fueron cruzados con animales FVB/N-tg-EIIa-cre (Jackson Lab, ME, USA) para eliminar el *cassette* de neomicina. Al lograr la completa eliminación del *cassette* de neomicina se inició la retro-cruza con la línea FVB129P2 (Jackson Lab, ME, USA) hasta la generación N4.

3.2.14 Animales y bioterio.

Los ratones utilizados para experimentación se alojaron en una sala exclusiva del bioterio de la FCEyN de la Universidad de Buenos Aires, Argentina y en el bioterio de la Universidad de Tufts, en la ciudad de Boston, USA. En estas salas los animales se mantuvieron aislados con un sistema de filtración de ventilación permanente, un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (7:00 AM-7:00 PM) y una temperatura controlada entre 19 y 23°C. Los ratones recibieron una dieta comercial de mantenimiento.

3.2.15 Extracción de ADN de segmentos de cola de los animales *knock in Chrna9 L9'T*.

Los ratones nacidos de las parejas en apareo fueron destetados a los 21 días y fueron separados por sexo. Luego fueron colocados en una caja de acrílico donde fueron anestesiados con una bomba portátil de isoflurano (SUMMIT, OR, USA) que estaba conectada a la caja de acrílico. A cada animal se le cortó un segmento de cola (0,5 cm de largo) con una tijera a 300°C. Esta fue colocada en un *eppendorf* de 1,5 ml con 500 µl de buffer de lisis (Tris-ClH 0,5 mM, EDTA 0,5 M, SDS 10%, ClNa 1,2%), más 10 µl de proteinasa K (10 µg/µl) y agitada durante 120 min a una temperatura a 55°C. La muestra fue luego centrifugada a máxima velocidad durante 5 min para eliminar los pelos. Luego se extrajo el sobrenadante y se le agregó 500 µl de isopropanol y se agitó vigorosamente. El ADN precipitado fue resuspendido en 200 µl de TE (Tris-ClH 10mM, EDTA 1mM).

3.2.16 Genotipificación de animales *knock in Chrna9 L9'T*.

Para la genotipificación de los animales *knock in Chrna9 L9'T* se utilizaron dos tipos de PCR. La primera se llevó a cabo mediante la amplificación de la secuencia lox P que permaneció en el intrón 3-4 luego de la remoción del *cassette* de neomicina (Figura 12). Los oligonucleótidos iniciadores utilizados fueron $\alpha 9$ LoxP-1 5'-TACTGGCTATCCT CCAGACAGAGC-3' y $\alpha 9$ LoxP-2 5'-AGGAGCGAGCAGAGG TCCTAAATT-3'. El tamaño del fragmento amplificado fue de 269 pb en el caso de poseer la secuencia lox P y de 203 pb en el caso del alelo salvaje sin la secuencia lox P. Las condiciones de la reacción fueron: 20 ng de

ADN genómico, 10 μ l de buffer D Mix (Epicentre, WI, USA), 0,2 μ l de Taq polimerasa (Quiagen, CA, USA), 0,5 μ l de A9LoxP-1 (20 μ M), 0,5 μ l de A9LoxP-2 (20 μ M), 7,8 μ l de H₂O destilada.

La segunda PCR se utilizó para amplificar la región donde se encuentra la mutación y se realizó en cada nueva generación de animales. La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores fue: α L9'T 5'- ATCACCTGGGACTCACCAGCC-3' y α L9'T 5'- AAGAGGTCAC TTT CAGGCACT-3'. El protocolo de amplificación fue el mismo que el anterior. Las muestras en ambas PCR fueron amplificadas con un termociclador BIO-RAD (BioRad Laboratory, CA, USA) como se detalla a continuación: un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, 35 ciclos de 30 seg de desnaturalización a 94°C, 1 min a 55°C de apareamiento y 1,30 min de elongación a 72°C, y por último un paso a 4°C a tiempo infinito. Los productos de elongación fueron corridos en un gel de agarosa al 1% con 1 μ l de bromuro de etidio (0,5 μ g/ml de agarosa) y visualizados bajo luz UV. Los productos de la reacción de la región amplificada de la segunda PCR fueron enviados a un centro de secuenciación para corroborar la presencia de la mutación.

3.3 Análisis del animal *knock in Chrna9 L9'T*.

3.3.1 Análisis de la expresión de genes por RT-PCR cuantitativa.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Al extraer las cócleas se removió el cerebelo. Las cócleas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Se realizaron grupos de cuatro cócleas por genotipo. Estos fueron pesados para calcular el volumen de Trizol a utilizar. El tejido fue colocado en un tubo de 50 ml y se desintegró con un homogeneizador TH-1 (OMNI, Marietta, GA, USA) con el volumen seleccionado de Trizol (Invitrogen, CA, USA). El ARN total fue purificado acorde con las instrucciones del fabricante con dos modificaciones menores. Se realizó una primera centrifugación a 12,000 xg durante 15 min a una temperatura de 4°C para sedimentar el tejido óseo. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, al cual se le agregó un ½ del volumen de cloroformo y luego centrifugado a 12,000 xg durante 15 min a una temperatura de 4°C. Para la precipitación del ARN, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, al cual se le agregó ¼ del volumen de

isopropanol, 1/6 del volumen de CiNa 0,8% y 1/6 de volumen CiNa 1,2 M. El ARN fue lavado con 100 µl de etanol al 75% y centrifugado durante 5 min a 7.500 xg a una temperatura de 4°C. El ARN fue resuspendido en H₂O destilada libre de ARNasa. Para la cuantificación del ARN se utilizó un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA) y para verificar su integridad fueron utilizados electroferogramas generados en un *Agilent Technology Bioanalyzer labchip* (ARN 600 Nano Assay mode). La PCR cuantitativa fue realizada usando un *kit QuantiTectSYBR* (Quiagen, Inc, CA, USA), *HotStartTaq* ADN polimerasa (Quiagen, Inc., CA, USA), y el *QuantiTect* (oligonucleótidos cebadores elegidos de acuerdo a las recomendaciones de la empresa) (Quiagen, Inc, CA, USA). La fluorescencia incorporada por el ADNc fue cuantificada ciclo por ciclo. El equipo utilizado fue un Stratagene MX4000 (Stratagene, Inc, CA, USA). Los parámetros utilizados fueron: un ciclo de 50°C durante 30 min, un ciclo a 95°C durante 15 min, 40 ciclos a 95°C durante 15 seg, 55°C durante 30 seg 72°C durante 30 seg, un ciclo a 95°C durante 1 min, 40 ciclos inicialmente a una temperatura de 55°C con un aumento de 1°C por ciclo durante 30 seg y por último un paso a 25°C a tiempo infinito. Se analizó el cambio relativo de la expresión de genes via el método $\Delta\Delta C_T$ (Livak, and Schmittgen, 2001) usando miosina VII como gen estándar. La eficiencia de amplificación en los pares de oligonucleótidos cebadores utilizados, fue monitoreada para asegurar igual eficiencia de amplificación en todos los casos. Cada PCR cuantitativa fue realizada en tres experimentos independientes, cada uno utilizando muestras obtenidas de cuatro cócleas. A su vez, cada una de estas PCR cuantitativas independientes fue realizada por triplicado en cada corrida. El análisis estadístico se realizó mediante un test de Student utilizando el programa Prism (v. 4.0b).

3.3.2 Secciones en plástico para el análisis del ducto coclear.

3.3.2.1 Perfusión de los animales.

Animales de 6 semanas fueron sacrificados por dislocación y perfundidos con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído (PFA) 0.1 M. Se removieron los huesos temporales y se colocaron las cócleas en pequeñas placas de petri para extraer el tejido muscular restante y la arteria estapedial. Algo de tejido muscular fue dejado para tomar la cóclea con forceps y no presionar la región del espiral. A través de pipetas de vidrio se inyectó la solución de fijación anteriormente nombrada en la ventana redonda o en la ventana oval para lograr una fijación en el órgano de Corti. Las cócleas se dejaron toda la noche en solución de fijación en agitación a una velocidad de 60 r.p.m.

3.3.2.2 Osmicatización.

Las cócleas fueron lavadas durante 15 min en forma repetida con H₂O destilada para eliminar la solución de PFA. Luego fueron colocadas durante 60 min en una solución de tetróxido de osmio 1%, con intercambios de dicha solución cada 15 min seguido de varios lavados con H₂O destilada.

3.3.2.3 Descalcificación.

Para descalcificar las cócleas se utilizó una solución de EDTA 0.12 M, paraformaldehído 0,1 M y glutaradehído 1% durante 3 días a temperatura ambiente con agitación. Finalizada la descalcificación los tejidos fueron guardados a 4°C en la misma solución hasta su procesamiento.

3.3.2.4 Deshidratación.

Las cócleas fueron sometidas a dos lavados con H₂O destilada de 15 min cada uno. Luego se realizó un gradiente creciente de deshidratación con etanol al 75% hasta el 95% (de dos tiempos cada uno durante 15 min). Por último se realizaron cuatro pasos en etanol al 100% durante 15 min cada uno, más un paso de 30 min en óxido de propileno (OP). Todos los pasos se realizaron con agitación a una velocidad de 60 r.p.m.

3.3.2.5 Tratamiento en araldita.

Las cócleas se dejaron durante dos horas con agitación a 60 r.p.m. en araldita-OP 1:1. Luego se cambió la solución a araldita-OP 2:1 y se dejó toda la noche con agitación. Al otro día se cambió la solución de araldita-OP 2:1 por una solución fresca, y las cócleas fueron colocadas en una campana de vidrio por dos horas para eliminar las burbujas de aire en la solución. Luego se transfirieron a nuevos viales de vidrio con araldita al 100% y nuevamente se colocaron en una campana de vidrio para eliminar las burbujas. Posteriormente, fueron transferidas a moldes de plástico especiales con araldita al 100% incubándolas durante dos días en el horno a una temperatura de 60°C. El tejido fue cortado en láminas de 40 µm de espesor utilizando un micrótopo.

3.5 Disección coclear e inmunofluorescencia.

Ratones adultos de 6 semanas de edad fueron sacrificados por dislocación cervical. Las cócleas fueron profundidas con PFA al 4% en buffer fosfato 0.1 M (PBS) a temperatura ambiente a través de la ventana oval. Inmediatamente fueron aisladas y fijadas en la misma solución de fijación durante una hora y media a temperatura ambiente. Las cócleas fueron luego descalcificadas en una solución de EDTA 8% in PBS 0.1 M durante toda la noche en un rotador. Se realizaron disecciones de las cócleas para eliminar todo el hueso descalcificado y se extrajo la membrana tectorial para exponer totalmente al órgano de Corti. Cada una de las vueltas de las cócleas fue separada durante la disección (apical, medial y basal). Luego fueron incubadas con suero normal de burro al 5% con triton X-100 0,5% en PBS (PBST) durante 1

hora, seguido de una incubación con un anticuerpo hecho en ratón anti-sinaptofisina con una concentración 1/1000 (Millipore, Billerica, MA, USA) durante 19 horas. Se realizaron luego 4 lavados de 15 min cada uno con PBS 1X, y posteriormente se agregó un anticuerpo secundario anti-ratón Alexa Flour-488 hecho en cabra (Invitrogen, Oregon, USA) a una concentración 1/500 o un anticuerpo anti-ratón avidina-biotina-HRP seguido del agregado del sustrato DAB/H₂O₂, (diaminobencidina, peróxido de hidrógeno). Cada una de las vueltas de las cócleas fueron montadas en portaobjetos y para las reacciones de fluorescencia con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 fue utilizado una solución de SlowFade Gold (Molecular Probes/Invitrogen, CA, USA). En el caso donde fue utilizado la solución de DAB/H₂O₂, cada una de las vueltas de las cócleas fueron montadas en una solución acuosa de IMMU-MOUNT (Thermo, Pittsburgh, PA, USA).

3.6 Análisis auditivos.

3.6.1 Respuestas eléctricas evocadas del tronco encefálico (BERA).

Los ratones fueron anestesiados con xilasina (20 mg/kg i.p.) y ketamina (100 mg/kg i.p.). Los electrodos de registro fueron insertados en la frente del cuero cabelludo, el lóbulo de la oreja y un electrodo en la base de la cola conectado a tierra. BERAs fueron evocados con tonos de 5 msec (0.5-msec subida-caída, con cos², a 35/sec). La respuesta fue amplificada (10,000 X), filtrada (100 kHz-3kHz) y promediada con una placa analógica digital con el programa de adquisición de información LabVIEW. La intensidad del sonido fue elevada en intervalos de 5 dB desde los 10 dB por encima del umbral hasta los 80 dB. En cada nivel de sonido, 1024 respuestas fueron promediadas (con estímulos de polaridad alternada), utilizando un filtro que eliminó respuestas con puntos pico a pico que superaron los 15 μV. En forma visual el umbral fue definido como la intensidad más baja a la que se pudo detectar una actividad en forma de onda, usualmente correspondiente al punto por encima del nivel de ruido (~0,25μV).

3.6.2 Producto de Distorsión de Emisiones Otoacústicas (PD-EOAs).

Los animales de 6 semanas empleados para realizar los BERA, también fueron utilizados para medir los PD-EOAs. Los PD-EOAs fueron medidos a través de un TDT EC-1 (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA) que generó dos tonos primarios (f_1 y f_2 con $f_2/f_1=1.2$ y f_2 10dB $<f_1$) y un micrófono miniatura Knowles (EK3103) para registrar en el canal del oído la presión del sonido. El estímulo fue generado en forma digital, y la respuesta generada fue amplificada digitalmente en muestras de 4 μ s (placa de 16 bit DAQ, NI6052E, National Instruments, Austin, TX, USA). Transformaciones de Fourier fueron computarizadas y promediadas de 5 trenes de ondas consecutivos, y la amplitud del PD-EOAs en $2f_1-f_2$ y los ruidos circundantes fueron calculados. Las respuestas fueron interpoladas a partir de gráficos de amplitud vs nivel de sonido, cada punto realizado cada 5 dB de f_1 . El PD-EOAs $2f_1-f_2$ es usualmente el componente más largo y se incrementa cuando se aumenta la intensidad del estímulo (ejemplo, incremento de la intensidad del tono primario f_2) (Willott., 2001). El umbral del PD-EOA se definió como el nivel más bajo de f_2 requerido para producir un PD-EOA con una amplitud = 0 dB por encima del nivel de ruido (el cual varía desde -20 a 0 dB, dependiendo de la frecuencia). El valor de la amplitud del umbral fue de 3 a 4 dB por encima del nivel de ruido. La definición del umbral se realizó a través del análisis visual de la amplitud vs el nivel de sonido.

3.6.3 Ensayo de la actividad de la inervación eferente medial.

Los ratones de 6 semanas fueron anestesiados con uretano (1.20 g/Kg, i.p.) y xilasina (20mg/Kg i.p.). Se produjo una parálisis muscular con α -d-tubocurare (Maison *et al.*, 2007) y los animales fueron conectados a un respirador artificial a través de una cánula traqueal. Se realizó una craneotomía y una aspiración parcial del cerebelo para exponer el piso del IV ventrículo. Para estimular el haz OC se colocaron electrodos de estimulación a 0,4 mm a lo largo de la línea media abarcando la decusación del OC. Se aplicaron 200 estímulos monofásicos por seg de 150 μ s de duración. El umbral fue determinado midiendo las fasciculaciones faciales y la estimulación fue 6 dB por encima del umbral. Durante el ensayo de supresión OC, el nivel de f_2 fue fijado para producir un PD-EOA de 10-15 dB o de 20-25dB $>$ al ruido. Para medir el efecto del haz eferente OC, los PD-EOA basales fueron primero

obtenidos (n=56), seguidos de una serie de 70 seg donde se midió los PD-EOA con estimulación del haz eferente, para luego terminar la medición de PD-EOA nuevamente en ausencia de estimulación.

3.6.4 Trauma acústico.

Los animales fueron anestesiados con xilasina (20 mg/kg i.p.) y ketamina (100 mg/kg i.p.). Luego fueron colocados en una cámara acústica y fueron expuestos durante 2 horas a un sonido de 8-16 kHz con una intensidad de 100 dB SPL para producir un daño acústico permanente o 15 min a las mismas frecuencias a 94 dB SPL para un daño acústico temporario. El estímulo fue generado por un ruido blanco, filtrado (filtro Brickwall Filter con una rampa de 60 dB/ octava), amplificado (Amplificador Crown power), y distribuido por una bocina colocada en la parte superior de la cámara. La intensidad del sonido fue medida en cuatro posiciones dentro de la cámara usando micrófonos Bruel and Kjaer de 0,25". La variabilidad de la presión del sonido dentro de la cámara fue menor a 0,5 dB.

Toda la información de los experimentos *in vivo* fue analizada con un ANOVA de dos factores. Un $p < 0.05$ fue seleccionado como criterio de diferencia significativa. Los valores son indicados como medias +/- el error standard de la media (S.E.M).

Parte II

3.7 Generación de un animal transgénico *Pou4f3- α 10*.

3.7.1 Estrategia para la construcción del vector de integración al azar.

La construcción se realizó partiendo del vector pSP73 *Pou4f3*-ADNc de la subunidad α 9 provista por el Dr. Douglas Vetter. El ADNc que codifica para la subunidad α 10 de nAChR fue subclonada en el vector pSP73 (Promega Corp, WI, USA) bajo la secuencia promotora del gen *Pou4f3*. Se agregó una secuencia intrónica del gen *Hbb* (β -globina) de conejo río arriba del

ADNc de $\alpha 10$, y una secuencia que codifica para una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humano río abajo del ADNc de la subunidad $\alpha 10$ (Figura 10).

1. Para insertar el ADNc de $\alpha 10$ de rata de 1.5 kb fue necesario primero extraer la secuencia regulatoria del gen *Pou4f3* de 9 kb, para lo cual se digirió con la endonucleasa *SalI* (New England Biolabs Inc, MA, USA).
2. Luego, al vector se lo sometió a una digestión con la endonucleasa *SmaI* (New England Biolabs Inc, MA, USA) para extraer la secuencia del ADNc de la subunidad $\alpha 9$ de rata.
3. Del plásmido pBruno 1.4 cedido por el Dr. Jim Boulter se extrajo el ADNc de $\alpha 10$ de rata con la endonucleasa *SmaI* y se subclonó en el plásmido pSP73 con la misma enzima. El ADNc del $\alpha 10$ posee una secuencia *FLAG* antes del codón de terminación subclonado por el Dr. Jim Boulter.
4. Finalmente se subclonó la secuencia regulatoria del gen *Pou4f3* con la endonucleasa *SalI* río arriba de la ADNc del $\alpha 10$, corroborando la direccionalidad del clonado (Figura 10).

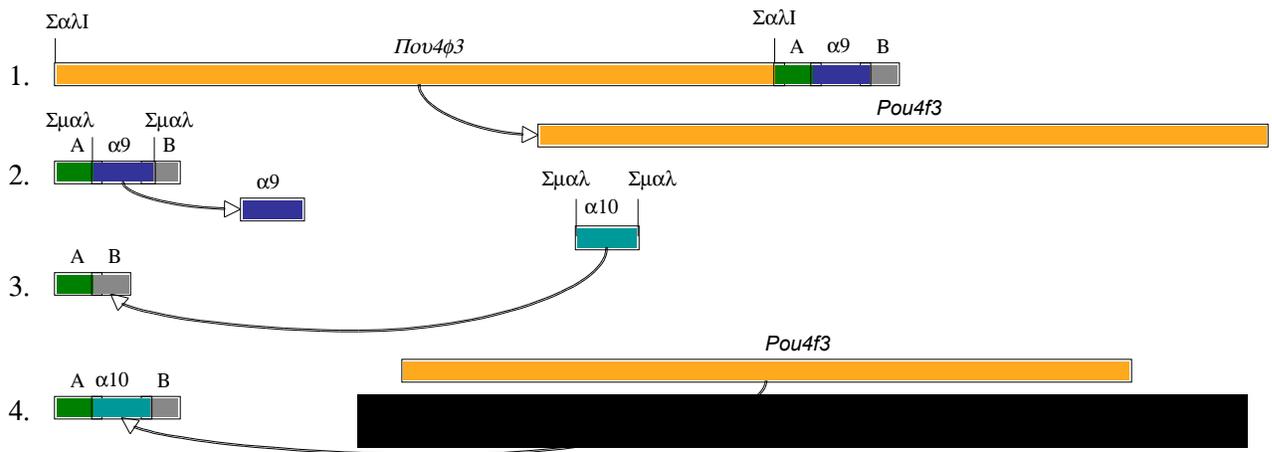


Figura 10. Pasos realizados para obtener el vector utilizado en la generación del tg $\alpha 10$. Con A se indica la secuencia del intron del gen *Hbb* de conejo (600 pb). Con B se indica la secuencia que codifica para una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humano (500 pb).

3.7.2 Preparación del transgén para la microinyección pronuclear.

La construcción del transgén $\alpha 10$ a microinyectar se obtuvo a partir de la digestión de una preparación a gran escala (maxipreparación) del ADN plasmídico. Esta preparación se realizó a partir de un cultivo de 500 ml en medio *Terrific Broth* (bactotripton 1,2%, extracto de levadura 2,4%, glicerol 0,4%), en presencia de ampicilina 50 $\mu\text{g/ml}$, crecido durante 20 horas a una temperatura de 37°C. Llegada la fase estacionaria, el cultivo se enfrió durante 5 min en hielo, fue separado en dos mamaderas de 400 ml y centrifugado en un rotor Sorvall GS-3 a 500 r.p.m. durante 5 min a una temperatura de 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50 ml de solución P1 (Tris-CIH 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa A 0,1 mg/ml). Posteriormente se agregaron 50 ml de solución P2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%), se mezcló suavemente por inversión, y se agregó luego 50 ml de solución P3 (acetato de potasio 3 M, pH 8) preenfriado, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 30 min. Los tubos se centrifugaron durante 20 min a 7.000 r.p.m. a 4°C y el sobrenadante fue filtrado a través de un embudo con una malla de lana de vidrio. Posteriormente, se precipitó el ADN plasmídico con el agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol con agitación suave, incubándolo 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó, en dos mamaderas de 250 ml, en un rotor Sorvall GSA a 10,000 r.p.m. durante 30 min a 4°C. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y fue resuspendido con 4 ml de TE (Tris-CIH 100mM, EDTA 1mM) por mamadera. Para obtener una preparación limpia de ADN plasmídico se hicieron dos extracciones en gradiente de CICs como se detalla a continuación. Al ADN plasmídico resuspendido en TE le fueron agregados 50 μl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y luego CICs sólido en una cantidad en peso equivalente al peso de la solución de ADN en TE. Se disolvió a 37°C y se ultracentrifugó en tubos Beckman a 55,000 r.p.m. durante 20 horas en un rotor Sorvall T-865.1 a 18°C. Al finalizar la corrida, la posición de la banda de ADN plasmídico se ubicó en el gradiente de CICs con la ayuda de una lámpara de UV y se extrajo cuidadosamente con una jeringa. El material extraído fue mezclado con una solución nueva de TE-CICs (1g de CICs cada 1 ml de TE) y se volvió a ultracentrifuga como se explicó anteriormente. La banda se extrajo nuevamente con una jeringa, se colocó en tubos *Corex* y el bromuro de etidio fue eliminado mediante extracciones sucesivas con butanol saturado en agua. Luego, la solución de ADN obtenida se colocó en tubos *ependorf*, y para eliminar las sales de cesio, se precipitó dos veces, con 2,5 volúmenes de etanol al 100%. El precipitado, luego de lavarlo con etanol al 70% y secarlo, fue resuspendido en 500 μl de TE.

Finalmente, el ADN del vector se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y en un gel de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio. La construcción del transgén de $\alpha 10$ fue liberado de la secuencia plasmídica con la enzima ClaI, y separada en gel de agarosa y aislada por electroelución como se especificó anteriormente en el apartado 3.2.1. Luego de la precipitación, se resuspendió en 400 μ l de solución de baja sal (Tris-ClH 20 mM, pH 7,4; ClNa 0,2 M, EDTA 1 mM). Posteriormente, se pasó por una minicolumna de intercambio iónico tipo elutip (Scheicher & Schuell, Keene, NH, USA) y se eluyó de acuerdo a las instrucciones del proveedor, con buffer de alta sal (Tris-ClH 20 mM, pH 7,4, ClNa 1 M, EDTA 1 mM). Finalmente, el producto se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100%, se centrifugó 10 min a máxima velocidad, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en TE para microinyección (Tris-ClH 5 mM, pH 7,4; EDTA 0,1 mM). Fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y por gel, y se llevó a una concentración de 500 moléculas/pl con el mismo buffer.

3.7.3 Generación del animal transgénico.

La obtención de embriones, la microinyección pro-nuclear y la transferencia de embriones a hembras pseudo-preñadas fueron realizados por el Dr. Flavio de Souza bajo la dirección del Dr. Marcelo Rubinstein siguiendo procedimientos convencionales. No se detallan las técnicas en esta tesis dado que no fueron realizados por el doctorando.

3.7.4 Animales y bioterio.

Las cepas endogámicas de ratones necesarias para la obtención de embriones fueron C57BL/6J y CBA/J. La cepa exogámica de ratones Swiss Webster fue utilizada para la obtención de hembras pseudo-preñadas. La línea de ratones transgénicos para la subunidad $\alpha 10$ se mantuvo en una sala exclusiva del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental que corresponde al Dr. Marcelo Rubinstein.

3.7.5 Genotipificación de animales.

Para la detección de animales transgénicos *Pou4f3- α 10* se realizó la amplificación de una región interna del transgén de 494 pb utilizando los oligonucleótidos iniciadores *Pou4f3- α 10* β -globina 5'-CATGAGGGTCCATGGTGATAC-3' y *Pou4f3- α 10* *Pou4f3* 5'-GCATCAGGCTCTCAGATGGCG-3' que detectan parte de la secuencia intrónica del gen *Hbb* y parte de la secuencia promotora del gen *Pou4f3* (Figura 26). Las condiciones de reacción por tubo fueron: 20 ng de ADN genómico, 10 μ l de buffer D (Epicentre, WI, USA), 0,2 μ l de Taq polimerasa (Quiagen, CA, USA), 0,5 μ l de tg α 10 β -globina (20 μ M), 0,5 μ l de tg α 10 *Pou4f3* (20 μ M), 7,8 μ l de H₂O destilada. La amplificación de fragmentos de ADN por la técnica de PCR se realizó con un termociclador *MJ Research PTC-200* (MJ Research, MA, USA). Los pasos del ciclado fueron: un paso de desnaturalización a 94°C durante 2 min, 30 ciclos que constaron de 30 seg de desnaturalización a 94°C, 1 min a 58°C de *annealing* y 1,5 min de elongación a 72°C. Por último una etapa a 4°C a tiempo infinito. Los productos de elongación fueron corridos en un gel de agarosa al 1,5% con 1 μ l bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y se visualizaron bajo una lámpara UV. Sólo en las muestras provenientes de animales transgénicos se amplifica una banda de 495 pb .

3.7.6 Reacción de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

El ARN total de cóclea fue purificado de animales adultos de 6 semanas usando el mismo protocolo que fue detallado anteriormente en el apartado 3.3.1. Se utilizaron cuatro animales por genotipo. Un μ g de ARN total de cada genotipo fue utilizado para realizar la reacción de transcriptasa reversa para generar ADNc usando la enzima *Superscript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, CA, USA) y oligo dT (500 μ g/ml) (Invitrogen, CA, USA) en un volumen total de 20 μ l. La reacción se inactivó por calor y 1 μ l de la reacción fue usado en la reacción para la amplificación por PCR del ADNc del transgén de α 10. Para ello se utilizó un oligonucleótido cebador que se une a la secuencia *FLAG* antes del codón de terminación y un oligonucleótido cebador que se une a la secuencia del ADNc del transgén de α 10 (5'-CCATGGTCACATTCTCCACA-3' y 5'-CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTC-3'). También

se realizó un control de la reacción de amplificación con el gen endógeno *Actb* (β -actina). Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron 5'-GAACCCTAAGGCCAACCGTG-3', 5'-TGGCATAGAGGTCTTTACGG-3', respectivamente.

3.8 Hibridización *in situ* para la detección del mensajero de la subunidad $\alpha 10$.

3.8.1 Preparación del tejido.

Los ratones adultos fueron sacrificados por dislocación cervical. Las cócleas fueron fijadas con PFA al 4% en buffer fosfato de 0,12 M, pH 7,4 toda la noche a una temperatura de 4°C. Luego, fueron descalcificadas en EDTA 8% con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,12 M pH 7,4, donde fueron incubadas toda la noche a una temperatura de 4°C con agitación. Luego de analizar la correcta descalcificación, las cócleas se colocaron en un gradiente de sacarosa ascendente (concentración final: sacarosa al 30% en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,12 M), donde en el último paso se dejó toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente se inició un gradiente ascendente de sacarosa/O.C.T (solución crioprotectora utilizada para embeber el tejido antes de cortarlo) hasta una concentración final de O.C.T al 100%. Los tejidos se cortaron en secciones de 10 μm en un crióstato (IEC Microtome, Alemania), las secciones fueron mantenidas a -80°C en cajas de preparados histológicos con desecante hasta su uso.

3.8.2 Preparación de la sonda.

La región codificante y no codificante de la subunidad $\alpha 10$ subclonada en el plásmido pBRUNO 1.1 fue linealizada utilizando: 10 μl de templado (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1 μl UE de endonucleasa, 2 μl de 10x buffer de reacción y 7,5 μl de H₂O destilada. La reacción fue incubada a una temperatura de 37 °C durante 2,5 horas. Al ADN se lo trató con 50 ng/ μl de proteinasa K, 100 mM Tris-ClH, 50 mM EDTA, H₂O destilada (hasta un volumen final 30 μl) y se dejó durante

2,5 horas a 37°C para eliminar todo tipo de proteínas. Se analizó cada una de las digestiones en un gel de agarosa al 1% y se purificó cada una de las bandas de ADN con un *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen, CA, USA).

3.8.3 Síntesis de la ribosonda.

La ribosonda fue sintetizada utilizando 2 µl de ARN polimerasa (~40 unidades de SP6) y la siguiente mezcla de reacción: 2 µl de buffer de transcripción 10X, 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de CTP 10 mM, 1 µl de GTP 10 mM, 0-2 µl de UTP 10 mM, 1 µl de inhibidor RNAsa, 3 µl de ³⁵S-UTP (250 µCi, 20 mCi/ml, 20mM), plásmido linealizado (~1 µg), y H₂O DEPC hasta completar 20 µl. Se incubó durante 2 horas a una temperatura de 37°C.

3.8.4 Hibridación.

Los tejidos fueron transferidos a una solución de PFA al 4% en 120 mM PBS pH 7.4 durante 15 min. Se realizaron dos lavados de 10 min a temperatura ambiente en una solución de prehibridación (Tris 100 mM, EDTA 50 mM pH 8,0). Al tejido se le realizó un tratamiento con proteinasa K (10 µg/ml) en el buffer de prehibridación a 37°C durante 20 a 30 min, seguido por un lavado con H₂O DEPC a temperatura ambiente durante 5 seg para frenar la reacción de proteinasa K. Los tejidos fueron puestos en Trietanolamina (TEA) pH 8,0 e incubados durante 3 min a temperatura ambiente. La acetilación fue requerida para reducir la unión inespecífica de la sonda con grupos aminos o carboxilos. Se lavó luego durante dos minutos a temperatura ambiente con SSC 2X pH 7,0, para luego deshidratar el tejido con diferentes lavados con un aumento de etanol (70%, 95% y 100%) de 3 min cada uno. Por último se colocó los tejidos en una caja con silica-gel a temperatura ambiente durante 1 a 1,5 horas.

3.8.5 Preparado de la ribosonda e hibridación.

Se desnaturalizó el ARNc colocándolo a 86°C durante 5 min, y luego inmediatamente se colocó en frío. La ribosonda se diluyó en buffer de hibridación (10 ml formamida, 4 ml de SSC 20X, 402 µl de solución de Denhardt, 1ml de ADN de esperma de salmón, 504 µl de ARNt de levadura, 50% de dextrán sulfato, 100 µl EDTA 0,5M pH 8,0) hasta una actividad de 8-10 x10⁶ cpm/ml. Se suplementó la ribosonda con DTT (ditiotritol 1M) a una concentración final de 1-10 mM. Se colocó 120 µl de la ribosonda en cada uno de los preparados y se selló con DPX (medio para fijar los portaobjetos) (Sigma-Aldrich, MO, USA) alrededor del cubreobjeto y se colocaron en un placa de calor a 56°C durante 16 a 18 horas.

3.8.6 Post-hibridación.

Los preparados sacados de la placa se los enfrió a temperatura ambiente y se les removió el DPX. Se sumergieron luego en una solución SSC 4X a temperatura ambiente durante 10 min hasta que el cubreobjeto cayó hacia el fondo del contenedor de vidrio. Las muestras sin el cubreobjetos fueron transferidas a un contenedor con una solución fresca de SSC 4X a temperatura ambiente durante 10 min y luego a una solución con RNasa A (RNasa A 20 µg/ml, ClNa 0,5 M, Tris pH 8,0 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM, H₂O destilada) a 37°C durante 20 min. Se realizaron lavados con SSC en donde se aumentó las estringencia hasta llegar a SSC 0.1X pH 7,0. Posteriormente se procedió a deshidratar hasta llegar a etanol al 100%. Se dejó secar las muestras durante 30 min, para luego sumergir los preparados en la solución de emulsión (Thermo Fisher, MA, USA) para dejarlo secar toda la noche a temperatura ambiente. Luego fueron guardadas en cajas plásticas cubiertas con papel de aluminio con sílica gel desecante a 4°C por 10, 15, 20, 30 días en función de la marca que poseen.

3.8.7 Incubación y Visualización.

El preparado seleccionado fue sumergido en la solución de revelado Kodak D19 durante 4 min (preferentemente a 18°C) agitándose cada 2 min (Kodak, NY, USA). Se lavó brevemente con H₂O durante 2 min y luego se pasó a una solución de fijación Kodak (1X 44,5 gr en 250 ml de H₂O) (Kodak, NY, USA) durante 5 min. Se lavó nuevamente en H₂O, se colocó solución de montado histológico (Permunt™, Thermo Fisher, NJ, USA) y se cubrió con un portaobjeto.

3.8.8 Cruzamientos para el rescate del fenotipo del *knock out* de $\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$).

Para el análisis de la funcionalidad del transgén en el animal *Pou4f3- $\alpha 10$* se procedió a realizar un serie de cruzamientos entre el transgénico *Pou4f3- $\alpha 10$* con el ratón mutante nulo para la subunidad $\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$) en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. De este cruzamiento se generó una F1, *Pou4f3- $\alpha 10$ / $\alpha 10^{+/-}$* . Posteriormente se cruzó la F1 dando una F2, los cuales fueron utilizados para hacer experimentos de electrofisiología en las células ciliadas internas y externas de la cóclea. El genotipo buscado en estos animales fue un ratón $\alpha 10^{-/-}$ /*Pou4f3- $\alpha 10$* .

RESULTADOS

4.1 Generación y análisis de un ratón con una mutación puntual en el receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$.

Parte I

4.1.1 Introducción General.

La estructura primaria del receptor colinérgico presente en las CCEs permaneció desconocida durante casi veinte años. Se propuso que este receptor podría pertenecer tanto a la familia de canales iónicos operados por receptor, como a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Fuchs, 1996). Sin embargo, debido a que este receptor colinérgico presenta características farmacológicas y electrofisiológicas atípicas, no se lo pudo clasificar como nicotínico o muscarínico. Con el clonado de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de los receptores nicotínicos, Elgoyhen y colaboradores lograron descifrar la naturaleza molecular del receptor colinérgico de las CCEs (Elgoyhen *et al*, 1994; Elgoyhen *et al*, 2001). La actividad del sistema eferente sobre las CCEs resultaría de la activación de nAChR heteroméricos formados por dos subunidades $\alpha 9$ y tres subunidades $\alpha 10$ (Plazas *et al.*, 2005b). Mediante la generación de un ratón *knock out* para el gen *Chrna9* se ha demostrado que esta subunidad es un componente fundamental en la estructura del receptor colinérgico de las células ciliadas (Vetter *et al*, 1999). Ratones *knock out* para el gen *Chrna9* carecen de supresión de respuestas cocleares durante la activación de las fibras eferentes y presentan alteraciones marcadas en el patrón de inervación, tanto de las CCIs como de las CCEs. Esto sugeriría que este receptor cumple una función en el desarrollo y en el establecimiento de los contactos sinápticos normales entre las fibras eferentes y las células ciliadas.

La generación de ratones mutantes que albergan alteraciones puntuales en residuos clave dentro de la estructura primaria de subunidades de receptores activados por ligando, ha surgido en los últimos años como una herramienta valiosa para descifrar la función de dichos receptores dentro de la fisiología del sistema nervioso. Estos animales, denominados *knock in*, han brindado en numerosas ocasiones, información más concluyente que su contraparte ratones *knock out* o mutantes nulos, en los cuales se interfiere con la función normal de un gen en particular. Ejemplos exitosos del uso de esta tecnología han sido reportados para receptores ionotrópicos de GABA_A y colinérgicos (Orr-Urtreger *et al.*, 2000, Labarca *et al.*, 2001, Frindley *et al.*, 2003). Nos hemos embarcado en la misma estrategia para el caso del receptor nAChR $\alpha 9\alpha 10$. Como parte del tema de tesis de la Becaria del CONICET Paola Plazas se ha rastreado la región

M2 del poro del canal en busca de una mutación que resulte en un receptor con una ganancia de función (Plazas *et al.*, 2005). Receptores recombinantes que albergan la mutación de la leucina 9' por treonina en la subunidad $\alpha 9$ (Figura 11) fueron analizados *in vitro* en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los receptores mutantes exhiben una mayor afinidad por la ACh, una disminución en la tasa de desensibilización, y además conservaron una alta permeabilidad al Ca^{2+} . Mas aún, la colina (el metabolito formado por la degradación de la ACh), agonista parcial del receptor salvaje, es un agonista con mayor potencia y eficacia del receptor mutado. Finalmente, una gran proporción de receptores se encuentran en el estado abierto aún en ausencia de ACh.

Estas propiedades le confieren al receptor una “ganancia de función”. En base a estos resultados se realizó la construcción de un ratón *knock in* que alberga la sustitución de leucina por treonina en la posición 9' de M2 de $\alpha 9$, con el objetivo de generar un animal con un sistema MOC con una funcionalidad aumentada.

	TM2	
	—————	
PTDSGEKMTLSISVLL	L SLT V FLL V IVELIPSTSSA	<i>Torpedo</i> α
PTDSGEKMTLSISVLL	L SLT V FLL V IVELIPSTSSA	$\alpha 1$
PADSGEKISLGITVLL	L SLT V FML L VAEIMPATSDS	$\alpha 7$
PAASGEKVSLGVTILL	L AMT V FQL M VAEIMPA_SEN	$\alpha 9$
PADSGEKVSLGVTVLL	L ALT V FQL L LAESMPP_AES	$\alpha 10$
	1' 9' 13' 17'	

Figura 11. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las subunidades α de Torpedo, $\alpha 1$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de nAChR de rata. El aminoácido modificado fue el que se ubica en la posición 9' en la subunidad $\alpha 9$.

4.1.2 Generación del ratón *knock in Chrna9 L9'T*.

Con el propósito de evaluar la actividad *in vivo* del receptor mutado $\alpha 9L9'T\alpha 10$ decidimos realizar un ratón *knock in* con la misma mutación y de estudiar la consecuencia de la introducción de esta mutación en la fisiología coclear. Para esto, se partió del fragmento del gen *Chrna9* HindIII-NotI de 9.5 kb de la cepa 129S4/SvJae de ratón que se

muestra en la Figura 12. La estrategia y los pasos para generar al animal fueron explicados en métodos. La mutación puntual se introdujo en el exón 4 y se agregó un *cassette* de neomicina en el intrón 3-4 para lograr la selección positiva de las ES. Antes de la electroporación se secuenció el vector de direccionamiento en las regiones que codifican para los exones y las secuencias consenso que son utilizadas para el *splicing*. Como se observa en la Figura 12 el fragmento HindIII-NotI del gen *Chrna9* fue insertado en el vector pKOscrambler (Lexicon Genetics, Inc. Woodlands, Texas, USA). Este fue linealizado con la endonucleasa NotI y utilizado para electroporar a las ES. Para lograr una mayor tasa de recombinación se utilizó río arriba y río abajo de la mutación secuencias de 4.5 y 4 kb del gen *Chrna9*, respectivamente. La tasa de recombinación homóloga fue del 42%. Para comprobar la correcta recombinación homóloga y la incorporación de la mutación se realizó un *Southern blot* en las células ES donde se sometió al ADN genómico a una digestión con dos endonucleasas, HindIII y KpnI. Se utilizó una sonda radiactiva de 962 pb, la cual fue generada utilizando dos endonucleasas, SacII y KpnI (Figura 12). En el caso de producirse el evento de recombinación homóloga se detectaron dos fragmentos, uno de 7.3 kb, correspondiente al alelo recombinante y otro de 13.8 kb correspondiente al alelo salvaje (Figura 13).

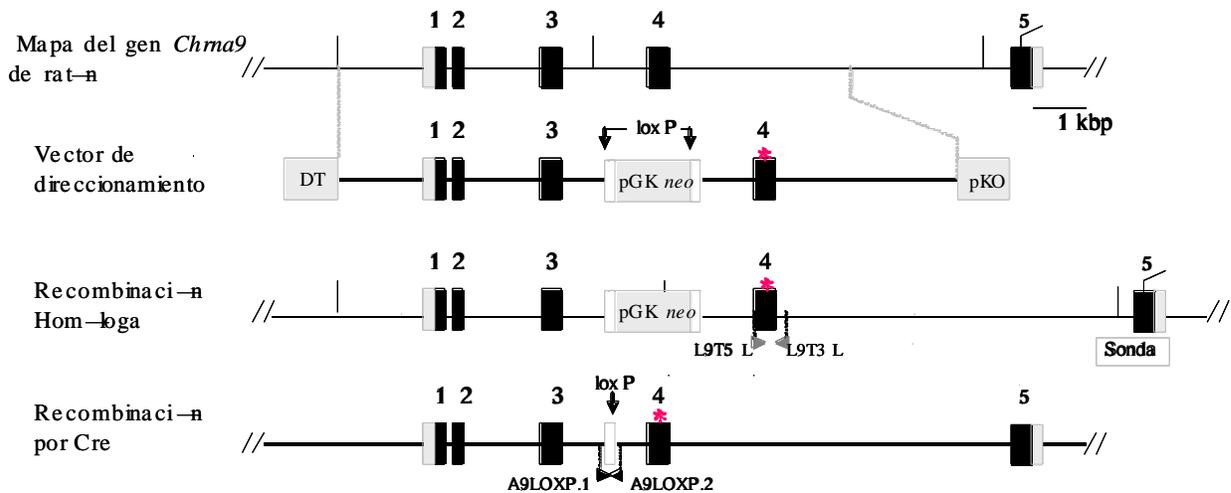


Figura 12. Ingeniería genética del *Chrna9* L9'T. Mapa del gen *Chrna9* conteniendo los cinco exones. Alelo salvaje y recombinante (antes y después de haber removido el *cassette* de neomicina, neo). Las cajas negras indican los exones del gen *Chrna9*. La mutación introducida se indica con un asterisco (*). En el alelo que presenta la recombinación homóloga se seleccionaron oligonucleótidos cebadores que amplifican la región de la mutación para luego ser secuenciada (L9T'5, L9T'3) (cabeza de flecha de color gris). En el último esquema (recombinación por Cre) se puede observar la secuencia de lox P (caja blanca) que permaneció luego de la recombinación con Cre recombinasa. Los oligonucleótidos cebadores seleccionados (A9LOX P.1, A9LOX P.2) detectan la presencia o ausencia del sitio lox P (cabeza de flecha de color negro) y se utilizaron para detectar el evento de recombinación homóloga en la genotipificación por PCR de los animales. En el esquema del vector de direccionamiento el gen de la toxina diftérica se señala con una caja en gris (DT).

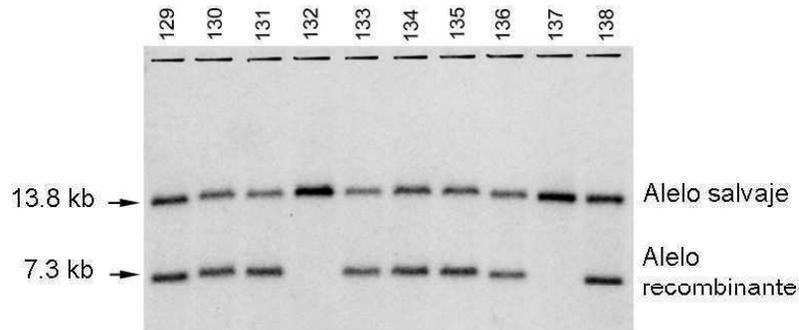


Figura 13. Autoradiografía de un *Southern blot* usando ADN de las ES salvajes y recombinantes. El alelo salvaje genera una banda de 13.8 kb y el alelo recombinante de 7.3 kb debido a la presencia de un sitio Hind III en la secuencia de neomicina (Figura 12). La sonda de 962 pb marcada con ³²P fue diseñada utilizando el fragmento SacII-KpnI (Figura 12). En la membrana hay dos células que sólo presentaron el alelo salvaje (132, 137). En el resto se produjo el evento de recombinación homóloga.

Las ES positivas fueron inyectadas en blastocistos de ratón y luego estos fueron implantados en hembras pseudo-preñadas como fue explicado anteriormente en métodos. Los ratones nacidos machos que presentaron alto quimerismo para el manto de color fueron cruzados con hembras C57BL/6J. Los ratones nacidos de este cruzamiento con manto de color agutí e identificados como F1 se emplearon para generar la línea *Chrna9*^{L9'T}. La presencia de la secuencia del *cassette* de neomicina en el intrón 3-4 puede afectar la expresión del gen *Chrna9*. Por esta razón, se eliminó el *cassette* de neomicina del *knock in* al cruzarlo con la cepa FVB/N-Tg (EIIa-Cre) C5379Lmgd/J (Jackson Laboratory, Maine, USA). Esta cepa expresa en forma constitutiva la enzima Cre recombinasa, que al reconocer los sitios lox P escinde el *cassette* de neomicina. La remoción del *cassette* de neomicina deja en el intrón 32 nucleótidos correspondientes a una de las secuencias lox P. Estos fueron utilizados para genotipificar los animales (Figura 14). La amplificación por PCR utilizando los oligonucleotidos cebadores A9LOXP.1-A9LOXP.2 produjo una banda de 203 pb en el caso del alelo salvaje y otra de 269 pb en el caso del alelo mutado.

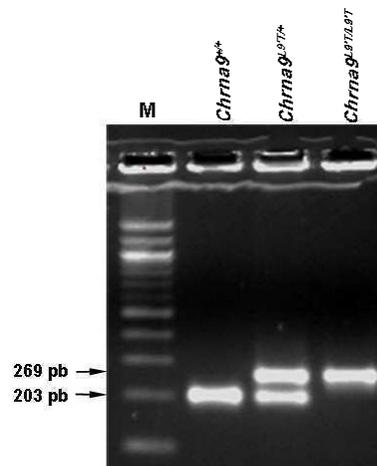


Figura 14. Genotipificación de ratones *Chrna9*^{L9'T}. PCR realizada de rutina, utilizando muestras de ADN de tejido de colas de animales salvajes (*Chrna9*^{+/+}), heterocigotas (*Chrna9*^{+/L9'T}) y homocigotas (*Chrna9*^{L9'T/L9'T}). Los oligonucleótidos cebadores flanquean a la secuencia lox P. En los animales salvajes se amplifica un fragmento de 203 pb, el cual indica la ausencia de la secuencia lox P. En los animales

heterocigotas y homocigotas se amplifica una secuencia de 269 pb donde el mayor tamaño indica la presencia de la secuencia lox P.

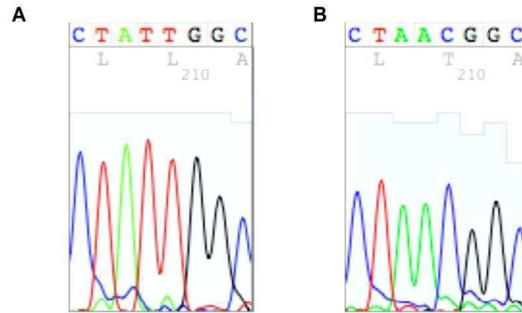


Figura 15. Electroferogramas de animales $Chrna9^{+/+}$ y $Chrna9^{L9^T/L9^T}$. Análisis por secuenciación de la mutación en animales $Chrna9^{L9^T}$. Se tomaron muestras de ADN de colas de los genotipos diferentes y se amplificó por PCR una región del exón 4. Cada fragmento fue purificado y secuenciado para evaluar presencia de la mutación. **(A)** Secuencia del $Chrna9$ en la posición 210, que corresponde al codón en la posición 9' de la región M2, Este codificó para el aminoácido leucina (TTG) en el $Chrna9^{+/+}$. **(B)** En el caso del $Chrna9^{L9^T/L9^T}$ codificó para el aminoácido treonina (ACG).

La Figura 14, muestra un ejemplo de la genotipificación por PCR mostrando el resultado para el caso de un ratón salvaje ($Chrna9^{+/+}$), un heterocigota ($Chrna9^{L9^T/+}$) y un homocigota para la mutación ($Chrna9^{L9^T/L9^T}$). Se diseñaron también oligonucleótidos cebadores que flanquean la mutación en el exón 4 y el producto amplificado se secuenció verificando la presencia de la mutación en cada nuevo apareamiento (Figura 15).

Al lograr ratones homocigotas para la mutación se realizó la retrocruza con ratones de la cepa FVB129P2-Pde6b⁺_{Tyrc-Chr/AntJ} hasta la generación N4. Los nacimientos de ratones $Chrna9^{L9^T/L9^T}$ siguieron una proporción Mendeliana, fueron fértiles y alcanzaron la edad adulta sin mostrar un fenotipo evidente diferente de los salvajes a simple vista.

4.1.3 Análisis de la expresión de genes que participan en la sinapsis eferente

colinérgica.

Existen evidencias en otros modelos de ratones genéticamente modificados que la generación de una mutación puntual provoca cambios en el nivel de expresión del ARN mensajero del gen mutado y de compensaciones en la expresión de otros genes (Labarca *et al.*, 2001). Por esta razón, se analizó el nivel de expresión del ARN mensajero del gen *Chrna9*. Al mismo tiempo, se realizó el mismo análisis para otros genes que están involucrados en la sinapsis eferente olivococlear. Realizamos PCR cuantitativas de los genes *Chrna9*, *Chrna10* y *Kcnn2*, que codifican para la subunidad $\alpha 9$ y $\alpha 10$ de nAChR y para el canal SK2, respectivamente. Como se describió en el apartado 1.5 estos están directamente relacionados con la despolarización y posterior hiperpolarización de las CCIIs y de las CCEs. Los valores de los C_{T_s} (umbral de amplificación) fueron normalizados con el valor C_{T_m} de miosina VIIa que fue utilizado como gen estándar. Para cada gen estudiado se calculó un valor definido como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ que fue obtenido por la diferencia entre los valores de C_T de animales *Chrna9*^{L9^T/L9^T} y los valores de C_T de los animales *Chrna9*^{+/+} (Livak y Schmittgen., 2001). En el caso de *Chrna9*, *Chrna10* y *Kcnn2* no se observaron cambios en la expresión relativa del ARN mensajero (Tabla 1). Del mismo modo, realizamos el análisis de la expresión de los genes que codifican para los receptores de Ca^{2+} , *Ryr1*, *Ryr2* y *Ryr3* que se ubican en la membranas de las cisternas de Ca^{2+} subsinápticas y que estarían involucradas en la liberación regenerativa de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Lioudyno *et al.*, 2004). Como se observa en la Tabla 1, los niveles del ARN mensajero para estos receptores no se vió modificada en los animales *Chrna9*^{L9^T/L9^T}. Por último, también analizamos al gen *Cacna1d* que codifica para un canal de Ca^{2+} activado por voltaje ($Ca_v1.3$) y al gen *Kcnmb1* que codifica para un canal de potasio sensible a Ca^{2+} (BK) de conductancia grande (Kros *et al.*, 1998). Estos actúan en el mantenimiento del potencial de la membrana de la célula. Como en los casos anteriores, no se observaron cambios en los niveles de expresión de estos canales.

Gen	Genotipo	C _{Ts}	C _{Tm}	Δ C _T	Δ Δ C _T	Nivel de expresión (2 ^{-ΔΔC_T}) (normalizado con <i>Myo7a</i>)
<i>Chrna9</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	32.13± 0.43	25.91± 0.84	6.22	-0,08	1.05
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	32.43± 0.55	26.14± 1.23	6.29		
<i>Chrna10</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	27.14± 0.16	25.99± 0.27	1.15	0.02	0.99
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	27.38± 0.55	26.25± 0.51	1.13		
<i>Kcnn2</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	26.08± 0.30	25.99± 0.27	0.09	0.34	0.79
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	26.01± 0.64	26.25± 0.51	-0.25		
<i>Ryr1</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	22.36± 0.24	25.99± 0.27	-3.63	0.15	0.90
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	22.48± 0.35	26.25± 0.51	-3.77		
<i>Ryr2</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	24.83± 0.39	26.28± 0.03	-1.45	0.30	0.81
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	25.15± .079	26.90± 0.17	-1.75		
<i>Ryr3</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	27.08± 0.90	25.74± 0.29	1.34	0.14	0.91
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	27.01± 0.42	25.81± 0.56	1.20		
<i>Kcnmb1</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	30.52± 0.50	25.99± 0.27	4.54	0.34	0.79
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	30.46± 0.64	26.25± 0.51	4.20		
<i>Cacna1d</i>	<i>Chrna9</i> ^{L9^T/L9^T}	28.03± 0.87	26.02± 0.28	2.01	0.51	0.70
	<i>Chrna9</i> ^{+/+}	27.95± 0.79	26.45± 0.60	1.50		

Tabla 1. Análisis de la expresión por PCR cuantitativa. *Chrna9*: gen que codifica para la subunidad α9 de nAChR; *Chrna10*: gen que codifica para la subunidad α10 de nAChR; *Kcnn2*: gen que codifica para el canal SK2; *Ryr1*: gen que codifica para el receptor ryanodina 1; *Ryr2*: gen que codifica para el receptor ryanodina 2; *Ryr3*: gen que codifica para el receptor ryanodina 3; *Kcnmb1*: gen que codifica para el canal de potasio activado por calcio (BK) subunidad β-1; *Cacna1d*: gen que codifica para la subunidad α del canal de calcio voltaje-dependiente Ca_v1.3; *Myo7a*: gen que codifica para miosina VIIa. C_{Ts}: ciclo donde se produce el umbral; C_{Tm}: ciclo umbral para *Myo7a*; ΔC_T: diferencia entre el C_T del gen *x* y el C_{Tm} del gen estándar; ΔΔC_T: diferencia entre el C_T del gen *x* del *Chrna9*^{L9^T/L9^T} y el C_T del gen *x* del *Chrna9*^{+/+}. Los resultados son el promedio ±

S.E.M de tres experimentos por grupo, cada uno por triplicado.

4.1.4 Análisis histológico del ducto coclear.

Para analizar posibles cambios en la estructura del ducto coclear realizamos secciones de 40 μm de espesor embebidas en plástico y teñidas con osmio. Las secciones de cócleas utilizadas provienen de animales de 6 semanas tanto para *Chrna9*^{+/+} como para *Chrna9*^{L9^T/L9^T}. Como se observa en la Figura 16 no se detectaron cambios en la estructura general tanto del órgano de Corti como en el resto de las estructuras del ducto coclear en los animales *Chrna9*^{L9^T/L9^T}.

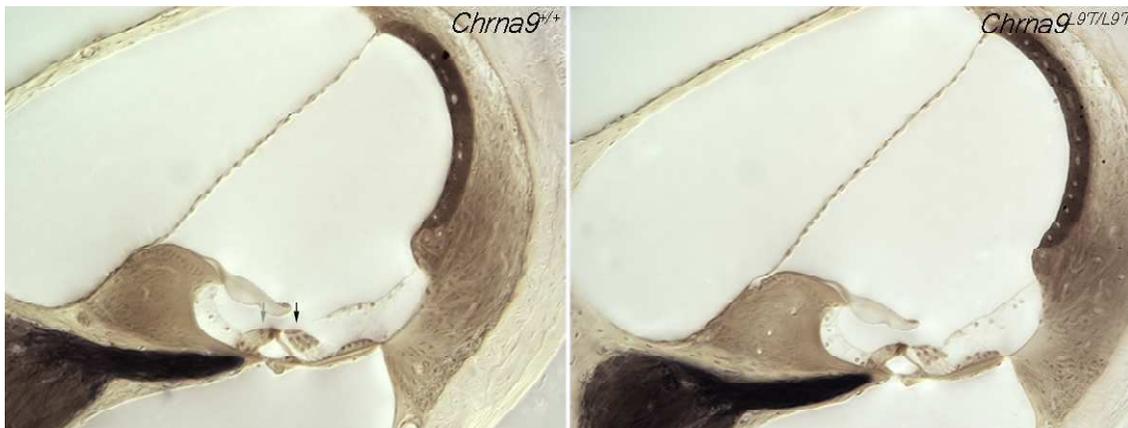


Figura 16. Morfología del ducto coclear en un animal *Chrna9*^{+/+} y en un animal *Chrna9*^{L9^T/L9^T}. Secciones en plástico de la vuelta medial de la cóclea. La flecha en gris indica las CCI y la flecha en negro indica las CCEs.

4.1.5 Análisis electrofisiológico de células ciliadas.

En el laboratorio de la Dra. A. Belén Elgoyhen se realizaron experimentos de

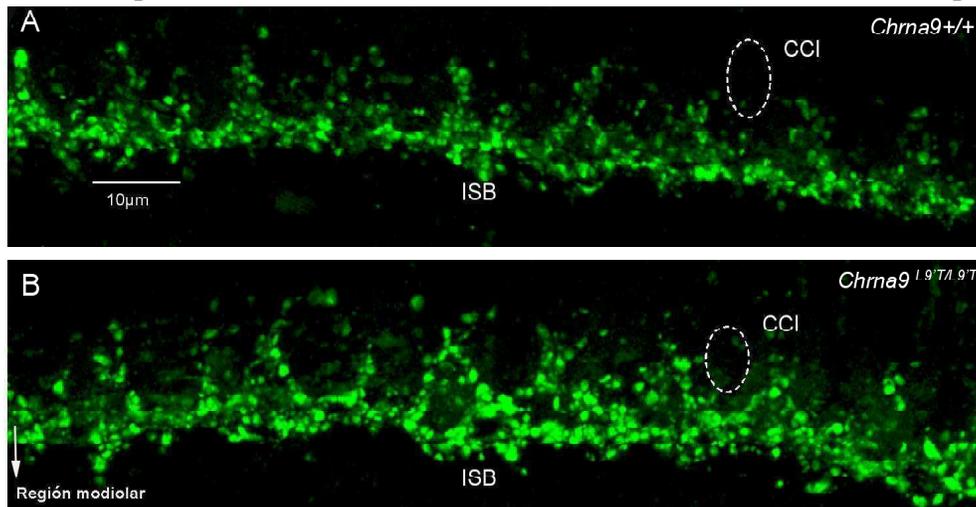
electrofisiología, donde se estudiaron tanto las respuestas evocadas por la aplicación exógena de ACh como también las corrientes sinápticas espontáneas. Estos resultados mostraron que en los animales *Chrna9^{L9[']TL9[']T}* las respuestas a ACh tenían una tasa de desensibilización menor y que las corrientes sinápticas se encontraban marcadamente prolongadas. A su vez, se corroboró que el receptor mutante estaba correctamente acoplado al canal SK2. Al igual que lo descrito para el receptor mutante recombinante (Plazas *et al.*, 2005a) estas propiedades le confieren al receptor la “ganancia de función” buscada. Estos resultados fueron realizados por la Lic. Jimena Ballesterero y no forman parte de mi tesis doctoral.

4.1.6 Anatomía de la inervación eferente en el animal *Chrna9 L9[']T*.

Resultados obtenidos a partir del análisis de ratones *knock out* para el gen *Chrna9* y *Chrna10* (Vetter *et al.*, 1999, 2007) indican que un cambio post-sináptico produce cambios marcados a nivel pre-sináptico. Esto se evidencia por los cambios en la morfología de las terminales eferentes en las CCEs. Quisimos entonces analizar la estructura de la inervación eferente en este modelo de “ganancia de función”. Para ello realizamos disecciones de cócleas en animales adultos separando cada una de las vueltas. Debido a la presencia de mayor inervación eferente en la vuelta medial sólo utilizamos esta sección de la cócleas para el análisis (Maison *et al.*, 2003). Marcamos las terminales eferentes con el anticuerpo anti- sinaptofisina, una proteína integral de las vesículas sinápticas. En primer lugar evaluamos posibles cambios en la inervación eferente lateral en la región del haz espiral interno (*inner spiral bundle*) (ISB) en animales *Chrna9^{+/+}* y en animales *Chrna9^{L9[']TL9[']T}* (Figura 17). Como se explicó en la Introducción, Figura 7, en esta región se ubican los contactos sinápticos axo-dendríticos entre la inervación eferente lateral, que desciende desde el complejo olivar superior, y la inervación aferente de tipo I que viene de las CCI. Imágenes obtenidas con microscopía confocal mostraron que tomando una región de 15 μm alrededor de las CCI, se observa un aumento en el número de terminales sinápticas en el *Chrna9^{L9[']TL9[']T}*. Como se observa en la Figura 17, las CCI en la imagen fueron identificadas en los espacios en negro rodeados de círculos

fluorescentes de los terminales sinápticos. Se cuantificó el número de contactos utilizando el programa *Image J* 1.37V (NHI, USA) que selecciona cada punto y lo ubica en un gráfico con sus respectivas coordenadas. Posteriormente se utilizó el programa R 2.4.1 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria) que mide la distancia entre puntos vecinos más cercanos y obtiene la distancia promedio. Se utilizaron 3 animales para *Chrna9*^{+/+} y 3 animales para *Chrna9*^{L9T/L9T}. La distancia promedio en los animales *Chrna9*^{+/+} fue de $1,27 \mu\text{m} \pm 0,02$ (n= 890 terminales sinápticos) la cual difiere significativamente de la de los animales *Chrna9*^{L9T/L9T} $0,98 \mu\text{m} \pm 0.01$ (n=1,308 terminales sinápticos) ($p < 0.05$) (Figura 17). En el gráfico de dispersión se muestra que la distribución de los contactos sinápticos no se modificó (Figura 18). La menor distancia promedio entre terminales sinápticos vecinos en el *Chrna9*^{L9T/L9T} indica un mayor número de contactos sinápticos.

Figura 17. Preparados de cóclea de la vuelta medial marcados con sinaptofisina



revelaron mayor número de terminales en el ISB en los animales *Chrna9*^{L9T/L9T}. (A) Animales *Chrna9*^{+/+} exhibieron un regular número de terminales en el ISB. La mayor cantidad de terminales se ubica en la región modiolar y rodean la base de las CCIs. (B) Los animales *Chrna9*^{L9T/L9T} poseen la misma distribución rodeando a las CCIs, pero con un mayor número de terminales por unidad de superficie.

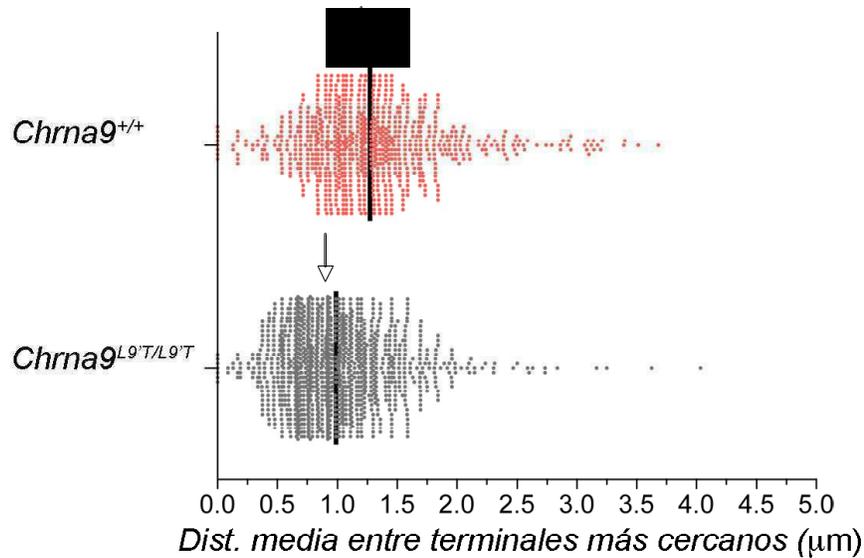


Figura 18. Dispersión de la distancia entre terminales sinápticos más cercanos. En los animales *Chrna9^{L9T/L9T}* se detectó un mayor número de terminales eferentes laterales que resultó en una disminución en la distancia promedio de los contactos entre sí (la flecha indica la distancia promedio en cada animal). Para la cuantificación de las terminales eferentes consideramos 15 µm alrededor de las CCI. Se promedió el resultado de 36 células de 3 animales por genotipo.

Por otro lado, realizamos el análisis de la invasión eferente medial en las CCEs en animales *Chrna9^{+/+}* y *Chrna9^{L9T/L9T}*. Se extrajeron las cócleas de los animales, se realizó la disección de cada una de las vueltas y se utilizó la vuelta medial, la cual fue también marcada con el anticuerpo anti-sinaptofisina. Como se observa en la Figura 19 se observó un mayor número de contactos sinápticos por CCE en los animales *Chrna9^{L9T/L9T}* que en los animales *Chrna9^{+/+}*. En la Figura 19 A se muestra con la flecha los dobletes característicos observados en animales *Chrna9^{+/+}* y en la Figura 19 B se muestra que en los *Chrna9^{L9T/L9T}* hay una mayor cantidad de CCEs con 5 y 6 terminales. Para cuantificar eficientemente el número total de terminales promedio por célula se realizó la misma reacción con el anticuerpo primario anti-sinaptofisina y un anticuerpo secundario no fluorescente conjugado con la enzima peroxidasa (HRP). Se cuantificó el número de terminales por CCE en 3 ratones para *Chrna9^{+/+}* (n= 538 CCEs) y 3 ratones

Chrna9^{L9[']TL9[']T} (n= 614 CCEs). El número promedio de terminales por CCE incrementó de $2 \pm 0,08$ en el animal *Chrna9*^{+/+} a $2,9 \pm 0,03$ en el *Chrna9*^{L9[']TL9[']T} ($p < 0.02$) (Figura 19C).

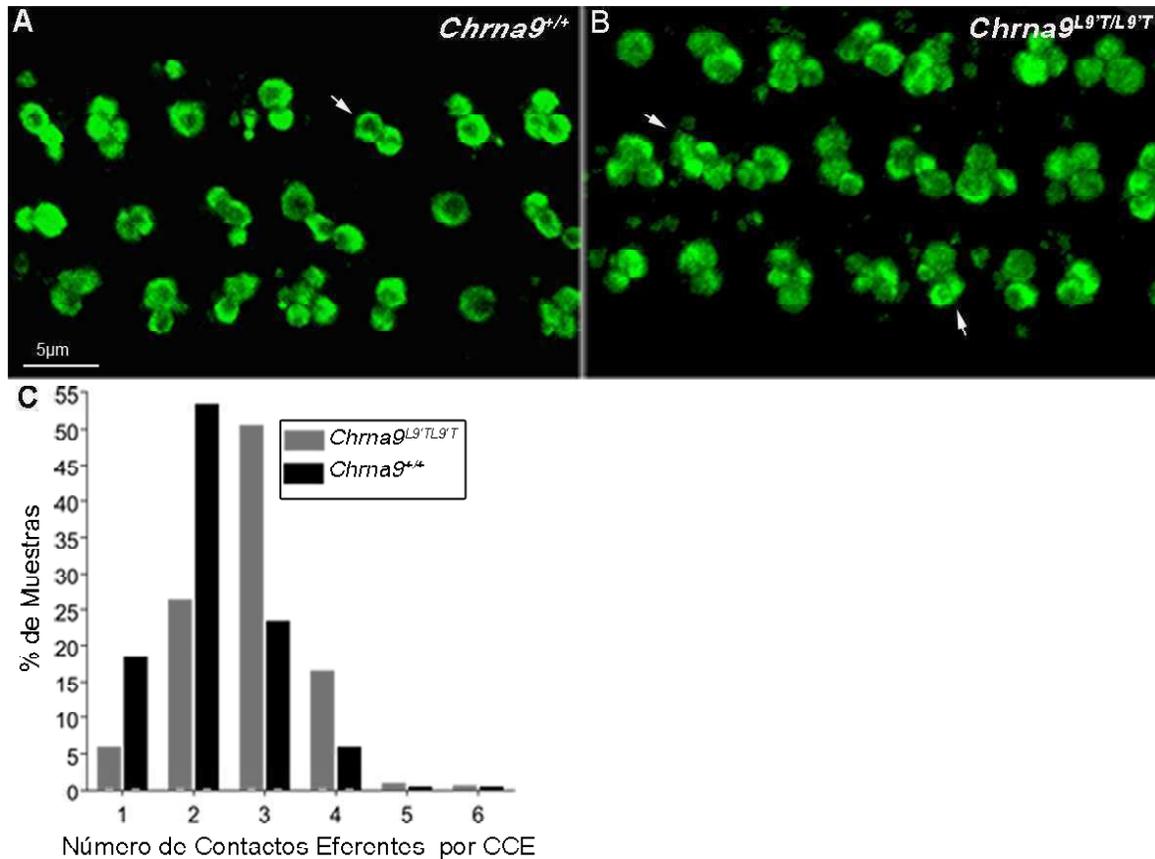


Figura 19. Inervación olivococlear medial en las CCEs. (A) Inmunohistoquímica de terminales eferentes de CCEs en la vuelta medial de la cóclea de animales *Chrna9*^{+/+} utilizando el anticuerpo sinaptofisina. Estas sinapsis ocurren generalmente como grupos, en forma de doblete como se indica con la flecha. (B) En el ratón *Chrna9*^{L9[']TL9[']T} se observó un incremento promedio en el número de terminales eferentes por CCE, con la detección de sinapsis con 5 a 6 terminales sinápticas por CCE como se muestra con las flechas (C) Diagrama de barras que indica la distribución del número de contactos por CCE en el *Chrna9*^{+/+} y en el *Chrna9*^{L9[']TL9[']T} en la vuelta medial.

Con el fin de analizar si los cambios en el número total de terminales por CCE estaba acompañado de un aumento en el volumen total de botones sinápticos por célula

utilizamos el programa Amira (Maison *et al.*, 2006). Este posibilita usar las imágenes de microscopía confocal para medir el volumen promedio del botón sináptico. Realizamos un experimento donde sacrificamos 2 animales adultos por genotipo de la misma cría. La reacción se inició el mismo día, se utilizó el mismo tiempo de exposición y la misma distancia focal. El programa Amira midió el volumen total de terminales sinápticos por CCE (Figura 20). El volumen total promedio en el animal *Chrna9*^{L9^T/L9^T}, 63,9 $\mu\text{m}^3 \pm 1,85$ (n=119 CCEs), fue significativamente mayor que el observado en el *Chrna9*^{+/+}, 36,9 $\mu\text{m}^3 \pm 1,35$ (n=95 CCEs) ** ($p < 0.05$).

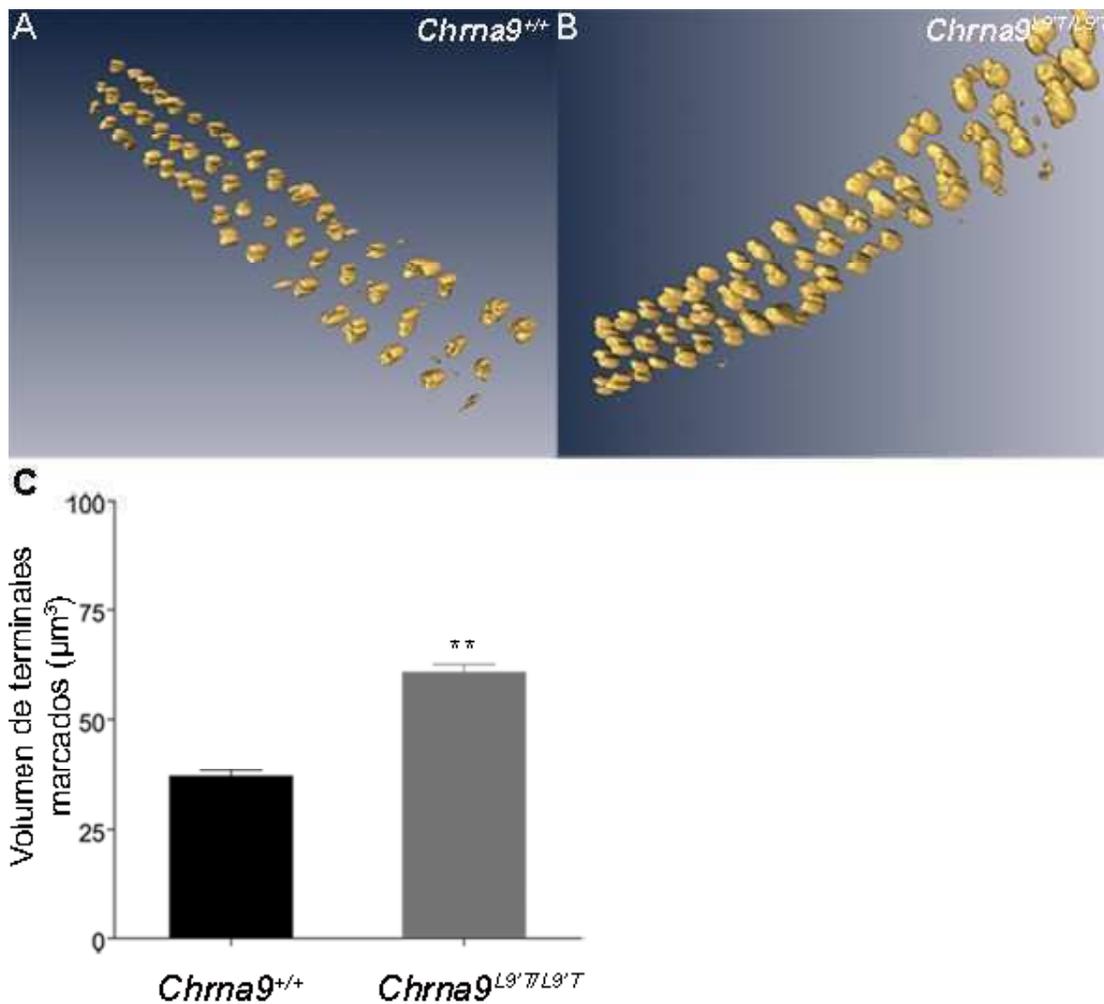


Figura 20. Imágenes 3D digitalizadas por el programa Amira de preparados de cóclea de la vuelta medial marcados con el anticuerpo anti-sinaptofisina (A)

Chrna9^{+/+} (B) *Chrna9*^{L9^T/L9^T} (C) Volumen promedio de terminales sinápticos por CCE. Se utilizaron 2 ratones *Chrna9*^{+/+} (n= 95 CCEs) y 2 ratones *Chrna9*^{L9^T/L9^T} (n=119 CCEs). La barra representa el promedio ± SEM.

4.1.7 Análisis de la fisiología del sistema eferente medial.

4.1.7.1 Incremento del umbral auditivo medido por BERA y PD-EOAs.

La introducción de una mutación en la dominio M2 de la subunidad $\alpha 9$ en el nAChR produjo cambios en las respuestas colinérgicas post-sinápticas, como también en la inervación pre-sináptica. Diferentes estudios, sugieren que la activación del MOC reduce la amplificación coclear derivada de la actividad electromotil de las CCEs (Guinan, 1996; Walsh *et al.*, 1998; Maison *et al.*, 2002; Luebke *et al.*, 2002). Por lo tanto, decidimos realizar diferentes estudios *in vivo* en animales adultos para analizar el efecto de la mutación en la fisiología auditiva. Estudiamos en el *Chrna9*^{L9^T/L9^T} la respuesta auditiva a través de dos tipos de experimentos: BERA y PD-EOAs. Los estudios de BERA miden el umbral de la actividad eléctrica del nervio auditivo y de las CCI y CCEs (Melcher *et al.*, 1996). Los PD-EOAs son generados solamente por la capacidad eletromotil de las CCEs, los cuales se propagan por el canal auditivo. Para generarse no necesitan de las CCI, ni tampoco de las fibras del nervio auditivo (Lieberman *et al.*, 1997). La comparación de estas dos mediciones puede dar indicios sobre la localización de una posible disfunción, por ejemplo CCEs o CCI.

Como se muestra en la Figura 21 A los umbrales auditivos medidos por el BERA fueron de 5-15 dB más altos tanto en *Chrna9*^{+L9^T} ($F_{(1,55)} = 4,30, p = 0.043$) como en *Chrna9*^{L9^T/L9^T} ($F_{(1,79)} = 7,87, p = 0.06$), comparado con *Chrna9*^{+/+}. En el caso de los PD-EOA (Figura 21 B), los umbrales también fueron de 5-15 dB más altos en *Chrna9*^{+L9^T} ($F_{(1,53)} = 14,82, p < 0.001$) como en *Chrna9*^{L9^T/L9^T} ($F_{(1,77)} = 9,20, p = 0.003$), comparado con *Chrna9*^{+/+}. Tanto los cambios en BERA como en PD-EOAs observados en *Chrna9*^{+L9^T} no difirieron significativamente de los obtenidos en *Chrna9*^{L9^T/L9^T}. Los incrementos en los umbrales fueron sólo significativos a frecuencias desde 16 kHz hasta

un máximo aproximado de 40 kHz. Dado que el aumento de los umbrales en el BERA fueron similares a los observados en los PD-EOAs, podemos inferir que la mutación ha producido una modificación en la actividad de las CCEs.

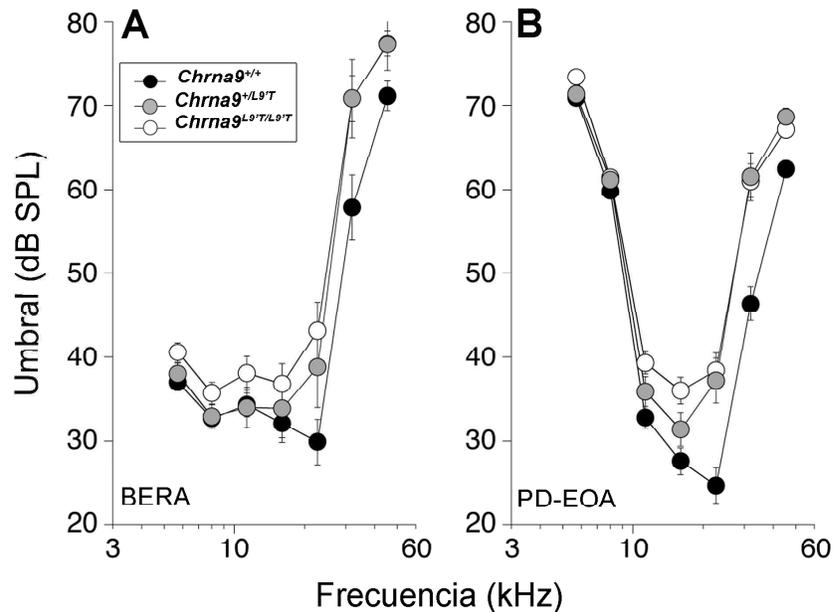


Figura 21. Experimentos de BERA y PD-EOAs muestran umbrales auditivos aumentados en animales *Chrna9*^{L9T/L9T}. Los valores son el promedio \pm S.E.M. El número de experimentos por cada genotipo fue de n=27 para *Chrna9*^{+/+}, n=21 para *Chrna9*^{+/L9T} y n=40 para *Chrna9*^{L9T/L9T}. (A) Los umbrales de los BERA fueron identificados visualmente a través de analizar la serie de ondas a cada frecuencia e intensidad. (B) El umbral de los PD-EOAs fue definido por la interpolación de la presión de sonido del f2 primario requerido para generar un PD-EOAs de 0 dB SPL.

La actividad OC medial *in vivo* reduce la capacidad de amplificación del sonido por parte de las CCEs (Guinan, 1996). El aumento en los umbrales auditivos observado puede deberse entonces a un aumento de la actividad del sistema OC medial en el animal mutado. Para analizar esta hipótesis, inyectamos animales con 30mg/kg de estriquina, uno de los bloqueantes más potentes del receptor $\alpha 9\alpha 10$ *in vitro* (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001) e *in vivo* (Maison *et al.*, 2007). Como se observa en la Figura 22 al

inyectar el bloqueante en los animales *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T} se observó una recuperación de 10 dB en los umbrales de los PD-EOAs en las CCEs. Por el contrario, en el caso de animales *Chrna9*^{+/+} no se observó ningún tipo de cambio en el umbral. A los 60 min de la inyección de estricnina los umbrales de los PD-EOAs en los animales *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T} fueron similares a la de los *Chrna9*^{+/+}. Estos resultados son compatibles con un aumento en la actividad del MOC en el *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T} y con una actividad mínima del MOC en condiciones basales en animales salvajes de acuerdo a lo descrito anteriormente (Lieberman *et al.*, 1988)

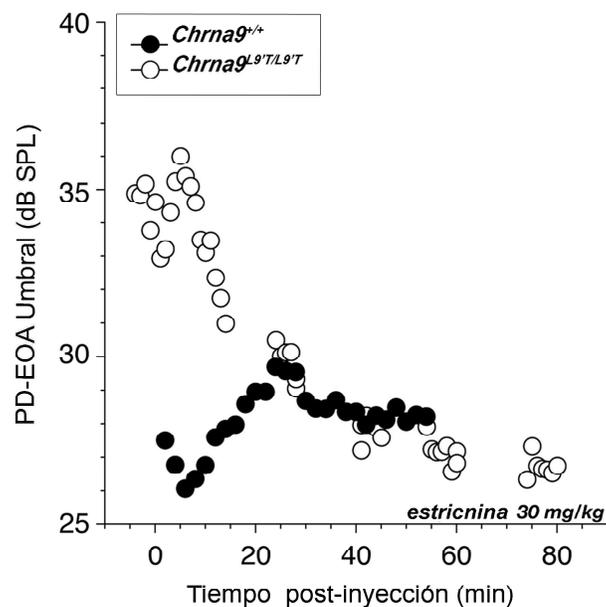


Figura 22. Recuperación del umbral de los PD-EOAs en animales *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T} al utilizar el bloqueante estricnina. Luego de una hora de inyección los umbrales en animales mutantes recuperaron el valor promedio que poseen los animales *Chrna9*^{+/+}. Los umbrales de los PD-EOAs para $f_2=22,6$ kHz fueron repetidamente medidos antes y después de inyectar 30 mg/kg i.p. de estricnina en *Chrna9*^{+/+} y *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T}.

4.1.7.2 Estudio de la actividad del MOC.

Para analizar el efecto del MOC sobre la actividad de las CCEs estimulamos el haz OC en la base del IV ventrículo y medimos el efecto de esta estimulación sobre la amplitud de los PD-EOAs (Vetter *et al.*, 1994; Maison *et al.*, 2007). Como se observa en la Figura 23 A en *Chrna9*^{+/+} se produjo una rápida disminución de la amplitud de los PD-EOAs y una rápida recuperación de la línea de base durante los 70 seg de estimulación. En los animales *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T} el inicio de la supresión tuvo un curso temporal mucho más lento. Durante los 70 seg de estimulación la supresión siguió aumentando hasta perderse en el nivel de ruido y la línea de base sólo se recuperó luego de 10 min de comenzada la estimulación (Figura 23 B). Como se puede ver en la Figura 23 C al elevar la intensidad del tono primario se pudo evidenciar la totalidad de la magnitud de la supresión, la cual alcanzó un pico de supresión de 17 db en los animales *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T} y de 5 db en los animales *Chrna9*^{+/+}. Los animales heterocigotas presentaron un fenotipo intermedio entre el *Chrna9*^{+/+} y el animal *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T}. En la Figura 24 se muestra que en los animales *Chrna9*^{L9[']T/L9[']T} el efecto de la supresión por estimulación del haz OC fue bloqueado al inyectar el bloqueante del receptor $\alpha 9\alpha 10$ estripcina (10 mg/kg), sugiriendo que el incremento de la supresión fue debida a la activación de los receptores $\alpha 9\alpha 10$ mutantes.

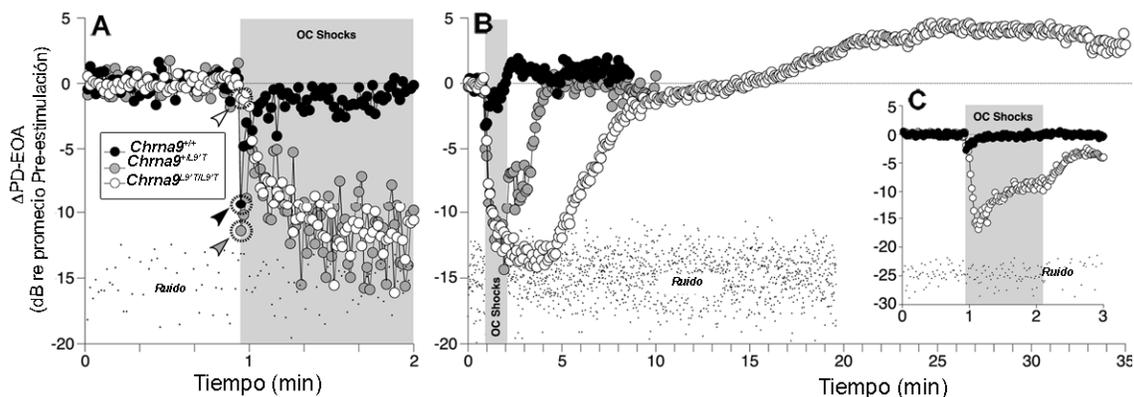


Figura 23. La actividad de la inervación OC medida a través de la amplitud de PD-EOA fue más lenta, de mayor amplitud y mayor duración en los animales *Chrna9^{L9[']TL9[']T}*. (A) y (B) Muestra la magnitud de la supresión de PD-EOA por la estimulación del haz OC, en dos escalas temporales. El sombreado gris indica los 70 seg de estimulación. Los PD-EOA fueron normalizados en cada experimento al promedio de los valores obtenidos en la pre-estimulación y luego promediados para cada genotipo en forma independiente. La cabeza de flecha indica el primer punto luego de la iniciación del estímulo para cada genotipo. El tiempo de adquisición de la información fue de 1seg/punto. El número de experimentos para cada genotipo fue n=3 *Chrna9^{+/+}*, n=3 *Chrna9^{+/L9[']T}*, n=7 *Chrna9^{L9[']TL9[']T}*. Para (A) y (B) el tono primario f2 fue de 22.6 kHz y fueron ajustados para producir PD-EOA ~15 dB por encima del ruido. (C) Para analizar la supresión máxima, se elevó el tono primario y el pre-estímulo para producir PD-EOA de 25 dB por encima del ruido. El pico de supresión en el *Chrna9^{L9[']TL9[']T}* alcanzó ~17dB, mientras que en el *Chrna9^{+/+}* fue de 5 dB.

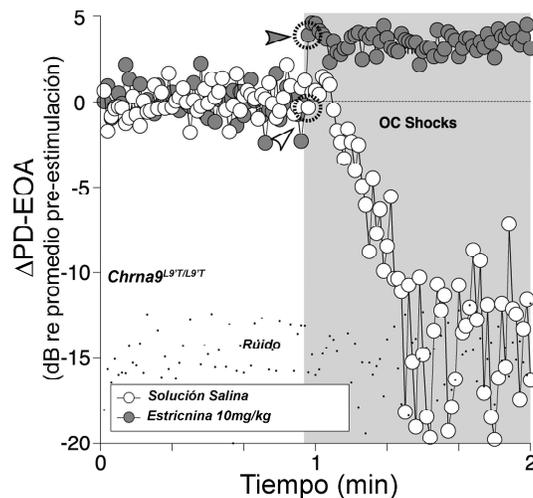


Figura 24. La actividad del haz OC fue bloqueada con estricnina. La inyección de 10 mg/kg de estricnina bloqueó la actividad de la inervación OC en *Chrna9^{L9[']TL9[']T}*. La inyección de la solución salina no produjo cambios. La cabeza de flecha indica el primer punto luego del inicio de la estimulación eléctrica. El tiempo de la adquisición fue de

1seg/por punto.

4.1.7.3 Análisis de trauma acústico.

Dado que se ha sugerido que la inervación eferente OC medial protegería al oído del daño acústico (Guinan, 1996, Rajan, 1988a, Rajan, 1988b), investigamos la susceptibilidad del ratón *Chrna9^{L9[']T/L9[']T}* a la exposición a sonidos intensos. El aumento en el umbral de audición producido por sonidos intensos puede ser reversible o irreversible. Los mecanismos que subyacen a ambos procesos serían diferentes (Nordmann *et al.*, 2000). Como se muestra en la Figura 25 A cuando los animales fueron expuestos a sonidos de intensidad (100 dB) y duración (2 hs) suficientes para producir un cambio irreversible, el aumento en los umbrales auditivos fue significativamente menor en los animales *Chrna9^{L9[']T/L9[']T}* ($F_{(1,8)} 8.894, p=0.018$) y *Chrna9^{L9[']T/+}* ($F_{(1,7)} 6.263, p=0.041$) que en los controles *Chrna9^{+/+}*. Esto indica que en los animales mutantes el aumento de la actividad del MOC estaría protegiendo al sistema auditivo contra daños permanentes producidos por sonidos intensos. Por el contrario, cuando la intensidad (94 dB) y la duración del estímulo (15 min) fueron los necesarios para sólo producir un daño temporario, el cual recupera a las 6 horas de producido, no se observaron cambios significativos entre *Chrna9^{L9[']T/L9[']T}*, *Chrna9^{L9[']T/+}* y *Chrna9^{+/+}* (Figura 25B).

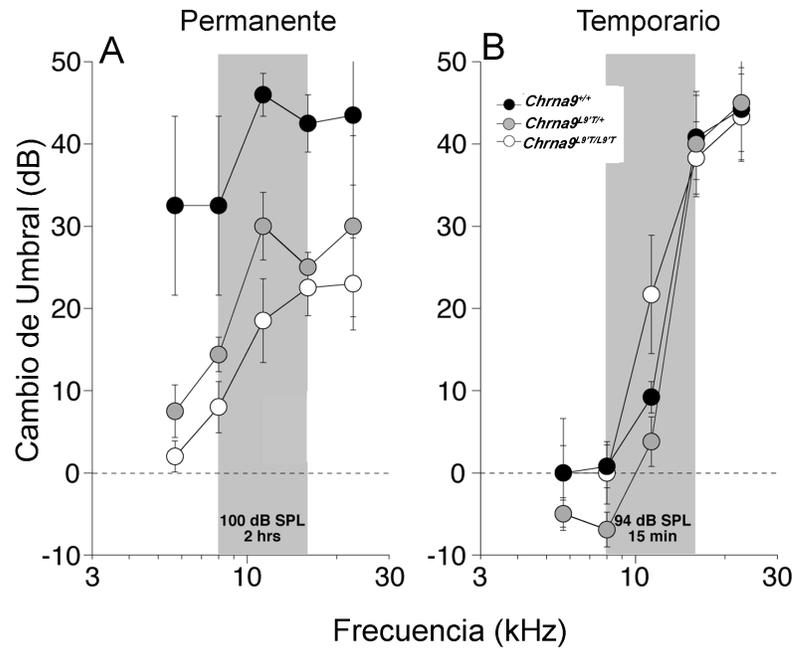


Figura 25. El animal *Chrna9*^{L9'T/L9'T} fue más resistente al daño acústico permanente.

(A) Una semana después de someter a los animales a un trauma acústico permanente (100 db por 2 horas a 8-16 kHz) se analizó el cambio de umbral auditivo producido en los tres genotipos. El número de experimentos para cada genotipo fue n=5 para *Chrna9*^{+/+}, n=5 para *Chrna9*^{+/L9'T}, n=5 para *Chrna9*^{L9'T/L9'T} (B) Igual que A pero luego de someter a los animales a un trauma acústico temporario (94 dB por 15 min a 8-16 kHz). El número de experimentos para cada genotipo fue n=4 para *Chrna9*^{+/+}, n=4 para *Chrna9*^{+/L9'T}, n=4 para *Chrna9*^{L9'T/L9'T}. Cada gráfico muestra el promedio de los umbrales con su S.E.M.

4.2 Expresión constitutiva de la subunidad $\alpha 10$ en las células ciliadas de la cóclea.

Parte II

4.2.1 Introducción General

Durante el desarrollo de la cóclea de la rata y del ratón la expresión de los genes *Chrna9* y *Chrna10* es diferente. El gen *Chrna9* inicia su expresión en el estadio embrionario y se mantiene constante en el adulto tanto en las CCIs como en las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 1994, Luo *et al.*, 1998, Morley *et al.*, 1998). Por el contrario, la expresión de *Chrna10* en las CCIs se inicia en el estadio embrionario y continúa sólo hasta la segunda semana postnatal, mientras que en las CCEs la expresión persiste hasta la edad adulta (Elgoyhen *et al.*, 2001, Morley *et al.*, 2002, Katz *et al.*, 2004). Las células ciliadas embrionarias poseen canales de transducción funcionales y canales de K^+ , de Na^+ y de Ca^{2+} dependientes del voltaje. En forma conjunta estos canales pueden participar en las espigas de Ca^{2+} características de CCIs inmaduras, las cuales modificarían el ritmo de la actividad de neuronas de vías auditivas superiores (Marcotti *et al.*, 2003). Esta actividad eléctrica de las células ciliadas promueve la liberación de neurotrofina y puede influenciar la sinaptogénesis. Durante la maduración del epitelio una cierta cantidad de cambios reducen la actividad eléctrica de las CCIs: los canales de Na^+ y Ca^{2+} y canales de K^+ de rectificación rápida entrante disminuyen, mientras que los de rectificación saliente aumentan (Beutner y Moser, 2001; Marcotti *et al.*, 2003). Estos cambios demarcan la transformación de un epitelio en desarrollo con una activa formación de sinapsis en un epitelio sensorial donde los impulsos mecánicos son transducidos en impulsos eléctricos.

Estos cambios están acompañados por modificaciones en la inervación eferente a las CCIs (Figura 7). Antes del comienzo de la audición (~P13) las CCIs reciben una inervación eferente transitoria, que a partir del día postnatal 10 (P10) inicia un proceso de retracción. En forma simultánea a la retracción de estas fibras de la CCIs, comienza la llegada de fibras eferentes mediales a las CCEs y la aparición de los primeros contactos sinápticos. Este proceso finaliza luego del comienzo de la audición; al mismo tiempo deja de expresarse el gen *Chrna10* en las CCIs y el receptor $\alpha 9\alpha 10$ deja de ser funcional en dicha células (Liberman *et al.*, 1990; Simmons, 2002; Katz *et al.*, 2004). Si bien se desconoce cual es la función de la sinapsis transitoria en las CCIs, se propone que estaría involucrada en el establecimiento y maduración de las vías auditivas durante el desarrollo. La inervación eferente a las CCIs podría jugar un papel importante en la

II

regulación del disparo de espigas de fibras aferentes inmaduras (Eatock y Hurley, 2003; Glowatzki y Fuchs, 2000; Fuchs, 2006). Experimentos realizados en gatos han demostrado que la lesión quirúrgica de las fibras eferentes resulta en la falla del desarrollo normal de la audición (Puel *et al.*, 1995).

Con el objetivo de generar una herramienta para estudiar esta plasticidad neuronal se generó un animal que expresa en forma constitutiva a la subunidad $\alpha 10$ en las CCI, aún luego del comienzo de la audición. Nuestra hipótesis de trabajo fue que la presencia de la subunidad $\alpha 10$ se traduciría en la presencia de la respuesta a ACh después de P13 y que este cambio estaría acompañado en el desarrollo de modificaciones en el desarrollo de las células ciliadas y de sus contactos sinápticos.

4.2.2 Generación de un ratón que expresa la subunidad $\alpha 10$ (*Pou4f3- $\alpha 10$*) en forma constitutiva en las células ciliadas de la cóclea.

Como se observa en la Figura 26, para expresar en forma constitutiva a la subunidad $\alpha 10$ de rata utilizamos el promotor del factor de transcripción *Pou4f3* (Erkman *et al.*, 1996; Sage *et al.*, 2006). Este inicia su expresión en el estadio E14.5 en las células ciliadas de la cóclea y su expresión persiste durante el estadio adulto. La construcción utilizada también contiene una secuencia intrónica del gen *Hbb* (β -globina) de conejo, río arriba del ADNc de $\alpha 10$, necesaria para lograr una alta expresión del transgén y una señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humano, río abajo del ADNc de $\alpha 10$. Una secuencia *FLAG* fue insertada antes del codón de terminación del ADNc de $\alpha 10$.

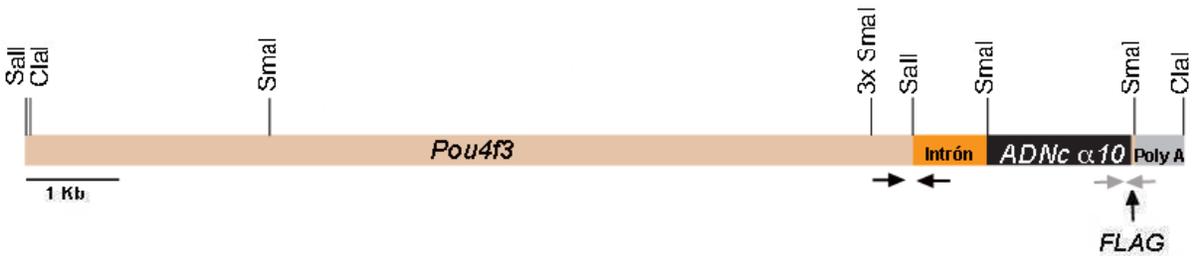


Figura 26. Vector utilizado para la generación del *Pou4f3-α10*. Esquema en detalle de la construcción con los sitios de restricción utilizados para la generación del vector. Se utilizó el promotor del gen *Pou4f3* (9 kb), una secuencia intrónica del gen *Hbb* (β -globina) de conejo (0,6 kb, intrón), el ADNc que codifica para la subunidad $\alpha 10$ (1,3 kb) y una señal de poliadenilación (0,5 kb, poly A) del gen de la hormona de crecimiento humano. Las flechas negras indican los oligonucleótidos cebadores para detectar al transgénico $\alpha 10$ y las flechas en gris indican los oligonucleótidos cebadores que utilizamos para detectar el ARNm del transgén *Pou4f3-α10*.

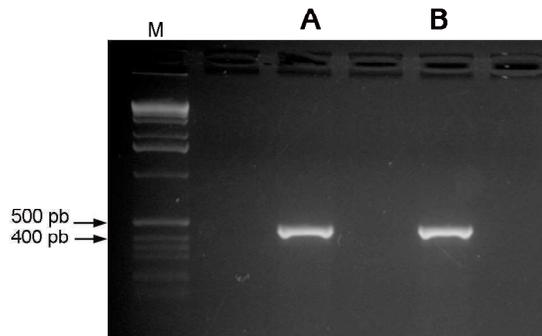


Figura 27. Detección por PCR del *Pou4f3-α10* en el ADN genómico. Los resultados muestran la generación de las dos líneas transgénicas obtenidas (A y B). Para detectar al *Pou4f3-α10* se utilizaron oligonucleótidos cebadores que se unen a la secuencia intrónica y a la secuencia del promotor (indicados en flechas en color negro en la Figura 26). El tamaño del fragmento amplificado es de 475 pb en los animales transgénicos. En los animales salvajes no se detectó ningún tipo de amplificación. M: Marcador de peso molecular.

II

Se microinyectó el vector linealizado en ovocitos de ratón, los cuales fueron implantados en hembras pseudos-preñadas. Para detectar la inserción al azar del transgén en el genoma de ratón, realizamos PCRs a partir del ADN genómico purificado de las colas de los animales. Como se observa en la Figura 27 la aparición de una banda de 475 pb indica la integración de la construcción en el genoma. Dos líneas fundadoras fueron obtenidas, una en el laboratorio de Dr. Marcelo Rubinstein (INGEBI-CONICET, Argentina) y otra en el laboratorio del Dr. Douglas Vetter (Tufts University, Boston, USA). Con el fin de corroborar si el transgén se expresaba dando lugar a ARNm, aislamos las cócleas y por RT-PCR detectamos la presencia del mensajero utilizando los oligonucleótidos cebadores que se unen a la secuencia *FLAG* y al exón 5 del ADNc de $\alpha 10$ de acuerdo a lo indicado en la Figura 26. En animales *Pou4f3- $\alpha 10$* se obtuvo una banda que corresponde al tamaño esperado de 446 pb de acuerdo al diseño del transgén. Al mismo tiempo, se amplificó el mensajero para el gen de *Actb* (β -actina) como control de la purificación de la cóclea y de la RT-PCR (Figura 28). Este resultado nos permitió concluir que en los animales transgénicos estaba presente el ARNm del transgén.

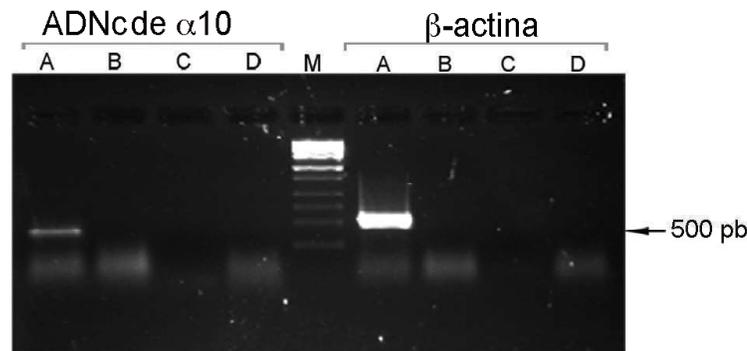


Figura 28. Análisis por RT-PCR de la expresión del transgén *Pou4f3- $\alpha 10$* . La amplificación fue realizada desde extractos de ARN de cóclea de animales adultos *Pou4f3- $\alpha 10$* . A. La banda de 446 pb corresponde a la amplificación en un animal tg $\alpha 10$. Como control se amplificó un fragmento de 490 pb correspondiente al gen de *Actb* (β -actina). Las calles B, C y D en las dos amplificaciones son controles: B, sin transcriptasa reversa, C, sin ARN y D, sin oligo-dT respectivamente. M: Marcador de peso molecular.

Con el fin de determinar la localización de la expresión del transgén realizamos hibridaciones *in situ* con una sonda de ARN anti-sentido de $\alpha 10$ marcada con ^{35}S . Como se observa en la Figura 29 A en animales salvajes de 8 semanas, esto es, luego del comienzo de la audición sólo se observa expresión del *Chrna10* en las CCEs pero no en las CCIs. Por el contrario, en el animal *Pou4f3- $\alpha 10$* (Figura 29 B), se observa marca tanto en CCIs como CCEs. La marca sobre las CCIs sólo puede explicarse a partir de la expresión del transgén dado que el gen endógeno deja de expresarse luego del comienzo de la audición (Figura 29 A) (Morley *et al*, 1998; Katz *et al*, 2004). No se observó un gradiente de expresión a lo largo de las diferentes vueltas de la cóclea (datos no mostrados).

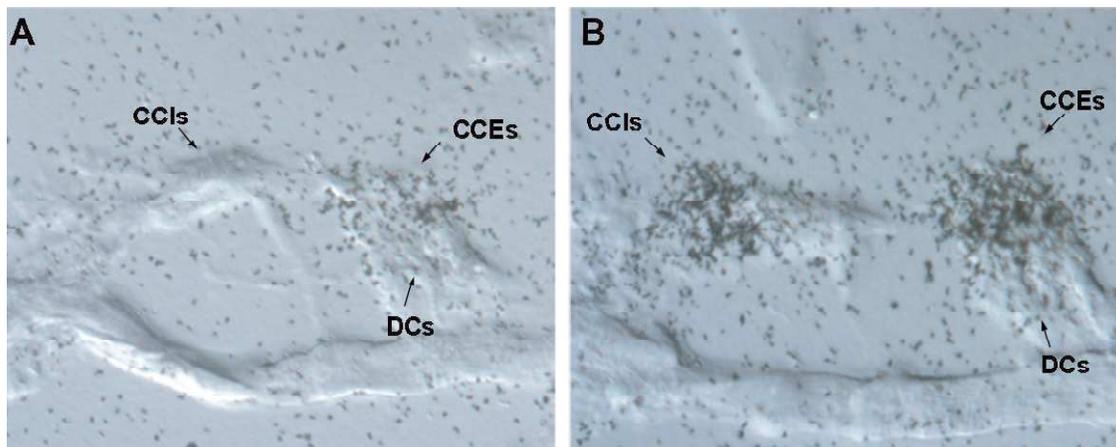


Figura 29. Análisis de la expresión del transgén en el órgano de Corti en animales adultos de 8 semanas. Hibridaciones *in situ* con sondas radiactivas marcadas con ^{35}S en rebanadas de 10 μm de espesor de la vuelta basal de la cóclea. Las flechas indican las CCIs, las CCEs y DCs (células de Deiter) en animales salvajes y *Pou4f3- $\alpha 10$* . (A) Salvaje. (B) *Pou4f3- $\alpha 10$* .

4.2.3 Rescate funcional del *nAChR* $\alpha 9\alpha 10$ en el ratón knock out de la subunidad

II **$\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$).**

Mediante experimentos de inmunohistoquímica intentamos detectar la presencia de la proteína transgénica en las CCIIs utilizando un anticuerpo anti-*FLAG* en animales adultos. Si bien, se obtuvo una señal fluorescente, esta fue muy débil y por lo tanto el experimento fue no concluyente. Por esta razón decidimos realizar un cruzamiento entre el ratón *Pou4f3- $\alpha 10$* y el ratón mutante nulo para la subunidad $\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$). Los estudios funcionales en los animales transgénicos fueron realizados por la Licenciada Jimena Ballesteros. Dado que dichos resultados son importantes para la discusión derivada de la generación *Pou4f3- $\alpha 10$* , dichos experimentos se detallan en la sección Anexo, página 94.

DISCUSIÓN

5. Discusión

Parte I

5.1 Aporte general del trabajo.

El estudio del receptor colinérgico nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ a través de la electrofisiología y la farmacológica ha sido de gran importancia para caracterizar a este receptor dentro de la familia de nAChR (Elgoyhen *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 2000, Weisstaub *et al.*, 2002; Katz *et al.*, 2004; Gomez-Casati *et al.*, 2005). Sin embargo, muchos interrogantes quedan por responder al tratar de comprender el papel que posee el receptor $\alpha 9\alpha 10$ en la fisiología de la inervación eferente y en general en la función de la inervación eferente en la fisiología coclear. El estudio del ratón *knock out* para la subunidad $\alpha 9$ (Vetter *et al.*, 1999) y del ratón *knock out* para la subunidad $\alpha 10$ (Vetter *et al.*, 2007) demostraron la importancia de la presencia de cada una de estas subunidades durante el desarrollo de la inervación eferente. Más aún, la generación de estos animales genéticamente modificados demostró en forma inequívoca que tanto la subunidad $\alpha 9$ como la subunidad $\alpha 10$ son necesarias para ensamblarse en un receptor funcional capaz de mediar la neurotransmisión entre las fibras del MOC y las células ciliadas. Sin embargo, estos animales no fueron de utilidad para analizar las posibles funciones del MOC en la fisiología auditiva. Por ejemplo, no se evidenciaron cambios en los umbrales auditivos en experimentos de BERA o de PD-EOAs. La falta del efecto OC fue sólo evidenciada ante la estimulación eléctrica de las fibras eferentes (Vetter *et al.*, 1999; Vetter *et al.*, 2007). En los últimos años, la ingeniería genética ha desarrollado técnicas que permiten la introducción de mutaciones puntuales de forma específica en genes de mamíferos. Esto ha sido un importante aporte para analizar aspectos funcionales de diferentes genes *in vivo*. Estos modelos, definidos como animales *knock in*, poseen una modificación específica en la secuencia de aminoácidos de una determinada proteína, la cual genera cambios estructurales en la misma y modifica sus propiedades funcionales. Dentro de la familia de nAChR existen diferentes modelos *knock in* como por ejemplo, para las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ (Orr-Urteger *et al.*, 2000; Ziv Gil *et al.*, 2002; Labarca *et*

al., 2001; Tapper *et al.*, 2004; Forck *et al.*, 2003). También se han generado modelos similares en otros receptores como por ejemplo, el de glicina (Findlay *et al.*, 2003). En particular, en la subunidad $\alpha 4$ se realizó una mutación puntual en el dominio M2, generando cambios significativos de hipersensibilidad a la nicotina, tolerancia y síndrome de abstinencia. Este modelo animal permitió demostrar cuan importante es la subunidad $\alpha 4$ de nAChR en la dependencia a la nicotina (Tapper *et al.*, 2004).

En el presente estudio hemos generado un nuevo modelo para el estudio del MOC en mamíferos. Tal como fue descrito en la sección de Materiales y Métodos, el *knock in* $\alpha 9$ se realizó generando una mutación puntual donde el aminoácido leucina en la posición 9' del dominio M2 fue sustituido por treonina (*Chrna9 L9'T*). Dado que el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ es el único receptor involucrado en la transmisión sináptica entre el MOC y las CCEs y que este receptor no se expresa en otra región de la cóclea, la generación del ratón *Chrna9 L9'T* resultó una herramienta muy útil para analizar *in vivo* la función del receptor en la inervación eferente y su papel en la audición de los mamíferos. El *Chrna9 L9'T* fue caracterizado con diferentes técnicas de biología molecular, inmunohistoquímica y fisiología auditiva *in vivo*. La introducción de esta mutación puntual resultó en cambios dramáticos tanto pre- como post-sinápticos. El aumento de terminales pre-sinápticos sobre las CCEs habla de un papel de este receptor en el desarrollo de los contactos sinápticos. A nivel post-sináptico la disminución de la tasa de desensibilización resultó en un receptor con una ganancia de función. Esta ganancia de función se vió reflejada en un marcado aumento de la funcionalidad del sistema MOC, el cual produjo un aumento de los umbrales auditivos. Finalmente, la introducción de la mutación resultó en ratones con una menor sensibilidad al trauma acústico. Nuestros resultados demuestran dos funciones del sistema MOC: 1) la inhibición de la sensibilidad coclear y 2) la protección ante el daño acústico por sonidos intensos.

5.1.1 Análisis de la expresión de genes involucrados en la sinapsis eferente.

La generación de animales *knock in* puede afectar secuencias específicas de regiones codificantes de un determinado gen, estos cambios pueden influir en su expresión

(Tupper *et al.*, 2004). Por ejemplo, se ha reportado en el ratón *knock in* $\alpha 7$ L250'T (mutación similar a la introducida en el presente trabajo en la subunidad $\alpha 9$), una disminución en el nivel de expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 7$ en la corteza somatosensorial (Orr-Urtreger *et al.*, 2000). Otras modificaciones que podrían afectar a la expresión de genes, es la permanencia de secuencias incluidas en el vector de direccionamiento (por ejemplo el cassette de neomicina o los sitios lox P) y utilizadas para la selección durante la incorporación de la mutación en el genoma de las células totipotentes. Por ejemplo, en el ratón *knock in* de la subunidad $\alpha 4$, donde el *cassette* de neomicina no fue removido del genoma, las neuronas dopaminérgicas presentan una disminución en la expresión de la proteína por efecto de la mutación (Labarca *et al.*, 2001). De acuerdo a lo observado en los experimentos de RT-PCR cuantitativa, en el caso del *Chrna9* L9'T, la introducción de la mutación puntual o la secuencia lox P remanente luego de la remoción del *cassette* de neomicina, no produjeron cambios en la expresión del gen *Chrna9*.

Existen evidencias de que el nAChR $\alpha 9\alpha 10$, podría estar involucrado en la regulación de la expresión génica y en la formación y estabilización de la sinapsis tanto eferente como aferente durante el desarrollo de la cóclea (Simmons *et al.* 1996b; Vetter *et al.*, 1994; Vetter *et al.*, 2009). Esto también ha sido postulado para otros tipos de nAChRs, como por ejemplo para el receptor $\alpha 7$, dado que experimentos realizados *in vitro* demuestran un incremento en la proliferación celular al bloquear receptores colinérgicos integrados por esta subunidad (Quik *et al.*, 1994). Por otro lado, Greenberg y colegas, han reportado cambios en los niveles de ARNm de c-fos al incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la activación de nAChRs (Greenberg *et al.*, 1986). En un trabajo reciente donde se caracterizó al *knock out* del canal SK2, se han descrito cambios en la expresión de ciertos genes involucrados en la sinapsis eferente, como por ejemplo los genes *Ryr1*, *Ryr2* y *Knmb1* (BK) (Murthy *et al.*, 2009). En base a estas evidencias y teniendo en cuenta que la subunidad $\alpha 9$ se ensambla con la subunidad $\alpha 10$ (Elgoyhen *et al.*, 1994; Elgoyhen *et al.*, 2001) y que el nAChR resultante se acopla al canal SK2 (Oliver *et al.*, 2003; Katz *et al.*, 2004) y a un sistema de liberación de Ca^{2+} de las cisternas subsinapticas (Lioudyno *et al.*, 2004), uno podría esperar cambios en la expresión de distintos genes que participan en toda la cascada de señalización. Sin

embargo, como se observa a partir de los resultados de RT-PCR cuantitativa, la introducción de la mutación puntual no resultó en cambios en la expresión de la subunidad $\alpha 10$ de nAChR, ni en la expresión del canal SK2. Mas aún, tampoco se observaron cambios en los genes que codifican para Ryr1, Ryr2 y Ryr3, canales de Ca^{2+} tipo L que se expresarían en las cisternas subsinápticas (Lioudyno *et al.*, 2004), ni para otros canales de Ca^{2+} como el BK (Rüttiger *et al.*, 2004) o el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje Cav1.3 que están involucrados en la maduración de las células ciliadas (Brandt *et al.*, 2003).

5.1.2 Efectos funcionales de la mutación L9'T en el receptor colinérgico $\alpha 9\alpha 10$ y sus consecuencias en la inervación eferente.

Receptores colinérgicos que contienen la subunidad $\alpha 7$ presentan una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Castro y Albuquerque, 1995). El estudio del ratón *knock in* $\alpha 7$ L250'T mostró un incremento de la conductividad del receptor mutado para este ión y una mayor acumulación de Ca^{2+} en las células (Orr-Urteger *et al.*, 2000). Los animales homocigotas para esta mutación mueren al primer día del nacimiento. Experimentos realizados en neonatos de un día, detectaron altos niveles de apoptosis celular en diferentes regiones del cerebro, en particular en regiones que expresan la subunidad $\alpha 7$ (Orr-Urteger *et al.*, 2000). Al igual que lo descrito para el caso del receptor $\alpha 7$ (Orr-Urteger *et al.*, 2000) y teniendo en cuenta que el receptor $\alpha 9\alpha 10$ tiene una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Weisstaub *et al.*, 2002), uno podría esperar muerte de las células ciliadas por exitotoxicidad mediada por Ca^{2+} en el ratón *Chrna9* L9'T. Sin embargo, los experimentos de histología mostraron un ducto coclear intacto en todas las vueltas de la cóclea. Más aún, experimentos de electrofisiología, demostraron que las células ciliadas de los animales *Chrna9* L9'T presentaron propiedades normales. Resultados electrofisiológicos realizados en células ciliadas del *Chrna9*^{L9'T/L9'T} por la Lic. Jimena Ballesterro, demostraron que el receptor mutado se acopla correctamente al canal SK2, y que las corrientes post-sinápticas inhibitorias espontáneas están marcadamente prolongadas (Taranda *et al.*, 2009, información no mostrada en esta tesis). Estos

resultados indicarían que probablemente el Ca^{2+} es secuestrado con una alta eficiencia en las células ciliadas ya sea por las cisternas subsinápticas o por las proteínas buffers de Ca^{2+} . Cabe mencionar que la proteína buffer de Ca^{2+} parvalbúmina- β tiene una concentración muy alta en las CCEs (Hackey *et al.*, 2005).

Los animales *knock out* para las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ han establecido que la presencia del nAChR es fundamental para el desarrollo normal y el establecimiento de los contactos sinápticos en las células ciliadas (Vetter *et al.*, 1999; Vetter *et al.* 2007). La falta de estos receptores produce una disminución en el número de terminales eferentes en la región de las CCEs acompañado de una hipertrofia de las mismas. Asimismo, y en forma llamativa también se observa una desorganización en la inervación eferente lateral a las CCI. Esto podría explicarse en base a experimentos recientes que muestran cambios de expresión en las proteínas de adhesión NCAM, caderinas y neuroligina-1 en el *knock out* de la subunidad $\alpha 9$ (Murdhy *et al.*, 2007), proteínas necesarias para el establecimiento normal del contacto sináptico entre terminales pre-sinápticas y las células ciliadas.

Los resultados observados en el *Chrna9 L9'T* son contrapuestos a los descriptos para el animal *knock out* $\alpha 9$ y *knock out* $\alpha 10$. El aumento del número y del volumen de los contactos sinápticos observados podría resultar de una mayor actividad post-sináptica que provoque una mayor proliferación de terminales. Evidencias recientes han demostrado en células piramidales CA1 del hipocampo que la inducción de LTP (potenciación a largo término) en estas células se traduce en una rápida y persistente expansión de las espinas dendríticas, detectando un alto grado de correlación entre la actividad sináptica y el desarrollo de las espinas dendríticas (Matsuzaki *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008).

En la cóclea una misma fibra eferente del MOC puede contactar diferentes CCEs (Engström, 1958; Spöndlin, 1968). El aumento del número de terminales del MOC en el animal *Chrna9 L9'T* plantea dos tipos de hipótesis. Por un lado, esto podría explicarse por un mayor número de fibras eferentes y por el otro, por el mismo número de fibras con mayores ramificaciones. Para responder a este interrogante, quedaría por analizar que conformación toman las fibras del MOC al atravesar el túnel de Corti y cuantificar el número de fibras en un área determinada de la cóclea.

En la región del haz espiralado interno (*inner spiral bundle*) encontramos un incremento en el número de contactos sinápticos del LOC. Existen evidencias de que este tipo de sinapsis axodendrítica sería del tipo colinérgica. Sin embargo, no existen evidencias de que en esta sinapsis se expresen las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (Morley *et al.*, 1998). Otros autores, señalan que se podrían estar expresando otros receptores como por ejemplo receptores de dopamina o receptores de GABA (Eybalin, 2006). Por lo tanto, los cambios observados en el LOC son llamativos.

Como se explicó en el apartado 1.8 durante el desarrollo, existe una sinapsis transitoria axosomática entre las fibras MOC y las CCIIs. Esta estaría involucrada en la maduración y en el establecimiento de las vías auditivas y es mediada por nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Eatock y Hurley 2003; Glowatzky y Fuchs, 2000; Fuchs, 2006). La generación de una mutación en el receptor $\alpha 9\alpha 10$ que lleva a un incremento en su actividad, podría resultar en cambios de la maduración de las fibras aferentes de tipo I y por consiguiente esto podría resultar en cambios en el número de contactos del LOC con las fibras aferentes de tipo I. Sería interesante lograr realizar estudios de electrofisiología durante el desarrollo y analizar la actividad de las fibras aferentes de tipo I en el animal *Chrna9 L9'T* utilizando técnicas descritas por Glowatzki en publicaciones recientes (Glowatzki y Fuchs, 2000; Goutman *et al.*, 2005).

5.1.3 Fisiología auditiva en el *knock in Chrna9 L9'T*.

En mamíferos, incluidos los humanos, la inervación MOC constituye un reflejo a la estimulación sonora (Folsom y Owsley, 1987; Liberman, 1989). En todas las especies investigadas, la activación eléctrica del sistema olivococlear disminuye la sensibilidad coclear en las diferentes estructuras del sistema auditivo, como por ejemplo las vías aferentes (Galambos, 1956; Desmedí, 1962), los potenciales receptores de las células ciliadas (Brown *et al.*, 1983; Brown y Nuttall, 1984), los PD-EOAs (Mountain *et al.*, 1980; Sieguel y Kim, 1982), o en el movimiento de la membrana basilar (Murugasu y Russel, 1996). La función de la inervación MOC que retroalimenta a las CCEs y que desciende del sistema nervioso central no se conoce en su totalidad. Numerosos reportes

involucran al MOC en funciones tales como el mejoramiento de la detección de una señal sonora en presencia de ruido ambiental (May y Mc. Quone, 1995; Heinz *et al.*, 1998; Winslow y Sachs, 1988), en la protección frente a un trauma acústico (Cody y Johnstone, 1982) y en procesos de atención selectiva (Oatman, 1971; Scharf *et al.*, 1987, 1994). Existen evidencias que la supresión de la amplificación coclear está exclusivamente mediada por la activación de las fibras de MOC, las cuales inervan a las CCEs (Guinan *et al.*, 1983), y en donde el único receptor que participa es el $\alpha 9\alpha 10$ acoplado al canal SK2 (Elgoyhen *et al.*, 1994, Elgoyhen *et al.*, 2001, Vetter *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis demuestran dos funciones propuestas para el sistema MOC: 1) es un sistema inhibitorio y 2) su activación protege al oído ante el trauma acústico.

El hecho que en el animal *Chrna9 L9'T* los umbrales auditivos fueron mayores que los observados en los animales salvajes demuestra la naturaleza inhibitoria del MOC. Si bien se ha sugerido que la actividad del MOC en condiciones basales es muy baja (Lieberman, 1988), el aumento en los umbrales puede explicarse ya sea por una mayor sensibilidad a la ACh liberada en condiciones basales o a un aumento en la probabilidad de apertura de los canales mutados en ausencia de ACh, como ha sido descrito para receptores $\alpha 9L9'T\alpha 10$ mutantes expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* (Plazas *et al.*, 2005). Dado que en presencia de estriquina, uno de los antagonistas más potentes del receptor $\alpha 9\alpha 10$ (Maison *et al.*, 2007), los umbrales auditivos en animales *Chrna9^{L9'T/L9'T}* disminuyeron hasta alcanzar valores similares a los de los animales *Chrna9^{+/+}*, este cambio en los umbrales se debió a una activación de receptores $\alpha 9\alpha 10$. Más aún, el hecho que la estimulación eléctrica del MOC en la base del IV ventrículo produjo una marcada supresión de los PD-EOAs, refuerza la conclusión que el aumento de los umbrales auditivos observados en animales *Chrna9^{L9'T/L9'T}* se debió a un aumento en la funcionalidad del MOC en respuesta a la introducción de la mutación puntual en la subunidad $\alpha 9$ de nAChR.

La introducción de esta mutación puntual no solo produjo un aumento en la magnitud de la supresión al estimular el MOC, sino también un cambio en el curso temporal. Esto se evidenció principalmente por el decaimiento muy lento de la supresión hasta llegar a los valores basales. Si bien esto podría explicarse por una menor tasa de

desensibilización del receptor mutado, muy probablemente el cambio en el curso temporal se deba a la suma de varios factores. Por ejemplo, podría involucrar procesos de facilitación pre-sináptica de la liberación del neurotransmisor o, lo que es más probable, una activación sostenida en el tiempo del receptor post-sináptico por la colina, el metabolito de la hidrólisis de la ACh. Cabe mencionar, que si bien la colina es un agonista parcial y de baja potencia del receptor $\alpha 9\alpha 10$ salvaje, se transforma en un agonista total y más potente del receptor $\alpha 9L9'T\alpha 10$ (Plazas *et al.*, 2005). Finalmente, se ha demostrado que la exposición a ACh altera la rigidez y la motilidad de las CCEs con un curso temporal que supera el orden de los 10 segundos (Sziklai *et al.*, 1996), efecto que no puede ser explicado solamente por cambios en el potencial de la membrana sináptica producidos por la activación del complejo $\alpha 9\alpha 10/SK2$. Cambios en la rigidez y en la motilidad de las CCEs se deben en parte a la prestina, molécula que ha sufrido presión selectiva en mamíferos para adaptarse posiblemente a una nueva función de motor molecular responsable de generar la electromotilidad que lleva a la amplificación sonora en mamíferos (Franchini y Elgoyhen, 2006; Dallos, 2008). Quedaría por demostrar si una entrada prolongada de Ca^{2+} por el receptor $\alpha 9L9'T\alpha 10$ mutante lleva a cambios en la estructura y en la función de la prestina que resulten en un efecto de MOC muy prolongado.

Uno de los resultados más importantes de la presente tesis es que los animales *Chrna9 L9'T* diseñados para tener un aumento en la funcionalidad del MOC mostraron una marcada resistencia al trauma permanente producido en respuesta a sonidos intensos. Esto es consistente con un trabajo previo en donde animales transgénicos que sobreexpresan la subunidad $\alpha 9$ también presentan resistencia al trauma acústico (Maison *et al.*, 2002). Estudios previos realizados con estimulación eléctrica del MOC han demostrado efectos rápidos y lentos de la ACh en las respuestas cocleares (Sridhar *et al.*, 1995; Sridhar *et al.*, 1997). Por un lado, una supresión rápida con un curso temporal de inicio de 100 msec, que muy probablemente derive del aumento de la conductancia al K^+ a través de los receptores SK2 y que resulta en la hiperpolarización de la membrana celular y en una disminución de la vibración coclear. Por el otro lado, una supresión lenta con un curso temporal de inicio de 10 seg, que muy probablemente requiera de la liberación del Ca^{2+} de las cisternas subsinápticas y que conduce a cambios en la rigidez

de la CCEs, (Lioudyno *et al.*, 2004), muy probablemente dependiente de cambios funcionales en la prestina, pero independientes de la hiperpolarización de la membrana celular y de la activación de canales SK2. El hecho que la sobreexpresión del canal SK2 en células ciliadas de ratones también aumenta la activación del MOC (Maison *et al.*, 2007), pero que a diferencia de lo mostrado en el presente trabajo con el animal *Chrna9 L9'T* y lo reportado para el animal que sobreexpresa a la subunidad $\alpha 9$, no conduce a un efecto protector, indicaría que la protección derivaría de los efectos lentos producidos por la ACh sobre las CCEs y no de los efectos rápidos mediadas por la hiperpolarización.

Existen al menos dos mecanismos diferentes mediante los cuales los efectos lentos resultantes de la activación del receptor $\alpha 9\alpha 10$ podrían derivar en una reducción del trauma producido por sonidos intensos: 1) una reducción de las vibraciones mecánicas de la cóclea y 2) modificaciones en las CCEs en respuesta a la entrada del Ca^{2+} a través del receptor $\alpha 9\alpha 10$. El hecho que en el animal *Chrna9 L9'T* sólo se observó protección ante un estímulo intenso capaz de producir un daño permanente e irreversible pero no ante un estímulo que produce daño reversible, descartaría la hipótesis de una reducción generalizada de las vibraciones cocleares. Los daños permanentes ante la exposición a sonidos intensos acarrear cambios estructurales, como desarreglos y pérdida de los estereocilios, los cuales contienen a los mecanotransductores (Wang *et al.*, 2002). Los experimentos realizados hasta el presente con este animal *Chrna9 L9'T* y los resultados publicados en la bibliografía no permiten todavía delinear una cascada de eventos que van desde la activación del MOC, la entrada de Ca^{2+} a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y la correcta estructura de los estereocilios.

Discusión**Parte II****5.2 Expresión constitutiva de la subunidad $\alpha 10$ en las CCI y CCEs de ratón.**

Antes del comienzo de la audición en roedores que se produce en la segunda semana postnatal, las CCI reciben una inervación colinérgica que hace contactos sinápticos directos con las células y que activa receptores $\alpha 9\alpha 10$ (Simmons *et al.*, 1996a; Emmerling *et al.*, 1990; Glowatzki y Fuchs, 2000). Este inervación desaparece luego del comienzo de la audición. Estudios de microscopía óptica y electrónica han demostrado que luego del P16 las CCI tienen pocos o ningún contacto axosomático eferente (Lieberman *et al.*, 1990; Simmons, 2002). Esta retracción de los eferentes colinérgicos se correlaciona con el cese de la transcripción del gen *Chrna10* (Elgoyhen *et al.*, 2001). En el presente trabajo pusimos a prueba la hipótesis de que la falta de respuestas colinérgicas de las CCI luego del comienzo de la audición podría ser el resultado de la falta de expresión de la subunidad $\alpha 10$. Para ello generamos una línea de animales transgénicos, *tg $\alpha 10$* , que expresa a la subunidad $\alpha 10$ luego del comienzo de la audición. Sin embargo, esta manipulación no fue suficiente como para formar canales $\alpha 9\alpha 10$ funcionales capaces de responder a la ACh luego de P14.

La ausencia de respuestas funcionales a la ACh luego del comienzo de la audición podría tener diversas explicaciones alternativas. Por un lado, podría deberse a la falta de transcripción o a la expresión ectópica del transgén, resultados frecuentemente observados durante la generación de animales transgénicos (Frank *et al.*, 2009). Esto puede descartarse en el *Pou4f3- $\alpha 10$* dado que el ARN derivado del transgén fue detectado por RT-PCR y este se localizó en la región de las CCI después del comienzo de la audición, como lo demuestran los experimentos de hibridación *in situ*. Por otro lado, el ADNc utilizado para la realización del transgén podría haber derivado en una proteína $\alpha 10$ no funcional, en especial dado que la construcción posee una secuencia FLAG antes del codón de terminación. Sin embargo, este no fue el caso dado que el *Pou4f3- $\alpha 10$* pudo

rescatar el fenotipo nulo del animal *knock out* ($\alpha 10^{-/-}$) para la subunidad $\alpha 10$, lo que queda demostrado por la presencia de respuestas a ACh en ratones derivados de la cruce *Pou4f3- $\alpha 10/\alpha 10^{-/-}$* . Este experimento demuestra que *in vivo* la subunidad $\alpha 10$ transgénica se ensambla en forma efectiva con la subunidad $\alpha 9$ endógena resultando en receptores $\alpha 9\alpha 10$ funcionales. Más aún, estos receptores se acoplan en forma eficiente al canal SK2.

5.2.1 Análisis de la corriente colinérgica luego del comienzo de la audición.

Nuestros resultados demuestran que la falta de respuestas colinérgicas en las CCIs luego del comienzo de la audición es independiente de la falta de transcripción del gen *Chrna10* y/o de su traducción a proteína.

Existe la posibilidad, de que luego del comienzo de la audición, también cese la transcripción de otros genes que codifican para proteínas que forman parte de un complejo macromolecular junto con el receptor $\alpha 9\alpha 10$ y que la formación de dicho complejo sea necesaria para el correcto ensamblaje o anclaje del receptor nAChR a la base de las células. Por ejemplo, se ha descrito para otro nAChR, el $\alpha 7$, que la proteína Ric-3 es necesaria para lograr el correcto ensamblado de la subunidad $\alpha 7$ en la membrana de células de mamíferos (Williams *et al.*, 2004; Cabello *et al.*, 2007). Una de las proteínas que probablemente formen parte del complejo macromolecular es el canal SK2, dado que se ha demostrado que la entrada de Ca^{2+} a través del receptor $\alpha 9\alpha 10$ resulta en la activación del canal SK2 y en la hiperpolarización de las células (Housley y Ashmore, 1991; Fuchs y Murrow, 1992, Oliver *et al.*, 2000). Más aún, la generación del animal *knock out* para el canal SK2 ha demostrado en forma reciente que el gen que codifica para la subunidad SK2 es el único responsable de codificar en las células ciliadas para esta clase de canales de K^+ de baja conductancia activados por Ca^{2+} y que no puede ser reemplazado por canales de tipo BK que se expresan luego del comienzo de la audición en CCIs de mamíferos (Kros *et al.*, 1998) y aves (Fettiplace y Fuchs, 1999).

Dado que el canal SK2 también deja de expresarse en CCIs luego del comienzo de la audición (Katz *et al.*, 2004) y que las CCIs de animales *knock out* para el canal SK2 carecen de respuestas colinérgicas (Kong *et al.*, 2008) se podría concluir que el SK2 es

una proteína fundamental en el ensamblado o el anclaje del complejo macromolecular del nAChR en la membrana de las CCI. Sin embargo, en el animal *knock out* para el SK2 se observan cambios en los niveles de expresión de otros genes como *Ryr1*, *Ryr2* y *Knmb1* (BK) como así también una marcada de-ferentación de la cóclea. Por lo tanto, la falta de respuesta colinérgica en estos animales podría deberse a causas ajenas a la simple falta de la proteína SK2 como un factor limitante. En base a los resultados, podemos concluir que la falta de la transcripción de *Chrna10* o su traducción a proteína no es el factor limitante en la expresión de corrientes colinérgicas en las IHCs luego del comienzo de la audición. También sugiere que la expresión de otras proteínas que formarían parte de un complejo macromolecular con un nAChR, estarían también reguladas durante el desarrollo.

CONCLUSIÓN

6. Conclusión

6.1 Conclusión Parte I.

Este trabajo muestra que una mutación puntual en la región M2 del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ de las células ciliadas de la cóclea produce un aumento dramático en la actividad del MOC y que esto resultó en un aumento en los umbrales auditivos y en la protección de la cóclea ante el trauma producido por sonidos intensos. Estos resultados indicarían que el receptor colinérgico $\alpha 9\alpha 10$ es un blanco interesante para diseñar fármacoterapias con el objetivo de prevenir daños producidos en el oído interno en situaciones donde la exposición a sonidos intensos no se puede evitar.

6.2 Conclusión Parte II.

En este trabajo pudimos confirmar que el vector que contiene la región 5' no codificante del gen *Pou4f3* es un buen sistema para dirigir la expresión específica de genes en las células ciliadas de la cóclea, mediante la generación de animales transgénicos. Asimismo, demostramos que la falta de respuestas colinérgicas en las CCI's luego del comienzo de la audición no es debido a la falta de expresión de la subunidad $\alpha 10$. Más aún, estos experimentos, así como otros datos de la bibliografía, llevan a postular que el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ forma parte de un complejo macromolecular que se inserta en la membrana y cuya composición es aún desconocida.

ANEXO

7. Anexo

7.1 Rescate funcional del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en el ratón *knock out* de la subunidad $\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$).

Experimentos de *patch clamp* realizados en el $\alpha 10^{-/-}$ han demostrado la falta de receptores $\alpha 9\alpha 10$ funcionales en las CCIIs antes del comienzo de la audición (Vetter *et al.*, 2007). La presencia de corrientes colinérgicas en CCIIs de ratones *Pou4f3- $\alpha 10/\alpha 10^{-/-}$* , sólo podrá observarse si la proteína transgénica es funcional y se ensambla con la subunidad $\alpha 9$ endógena.

En las células ciliadas de la cóclea, las corrientes colinérgicas están mediadas por un flujo catiónico a través del nAChR y un flujo de K^+ a través de canales K^+ sensibles al Ca^{2+} del tipo SK2 (Fuchs y Murrow 1992b; Blanchet *et al.*, 1996; Evans, 1996; Dulon *et al.*, 1998; Glowatzki y Fuchs, 2000; Oliver *et al.*, 2000). Así, a potenciales de membrana negativos al potencial de equilibrio del K^+ (-82mV), como por ejemplo a -90 mV, la corriente entrante activada por la aplicación de la ACh está mediada por un flujo de corriente tanto por el nAChR como por el canal SK2 (nAChR+SK2) (Katz *et al.*, 2004; Gómez-Casati *et al.*, 2005). Como se muestra en la Figura 1 A en las CCIIs, de animales salvajes, se observan corrientes activadas por la ACh antes del comienzo de la audición. Esta corrientes son entrantes a -90 Vm (panel superior) y salientes a -40 Vm (panel inferior). Las corrientes son salientes a -40 mV dado que este potencial es más positivo que el potencial de reversión del K^+ (-82 mV) y predomina la salida del K^+ por el canal SK2. En la Figura 1 B se muestra la falta de respuesta ante la aplicación de ACh en el ratón $\alpha 10^{-/-}$. La Figura 1 C demuestra que el *Pou4f3- $\alpha 10$* codifica para una subunidad $\alpha 10$ funcional dado que en ratones *Pou4f3- $\alpha 10/\alpha 10^{-/-}$* se observan respuestas entrantes a -90 mV y salientes a -40 mV similares a las observadas en los animales salvajes.

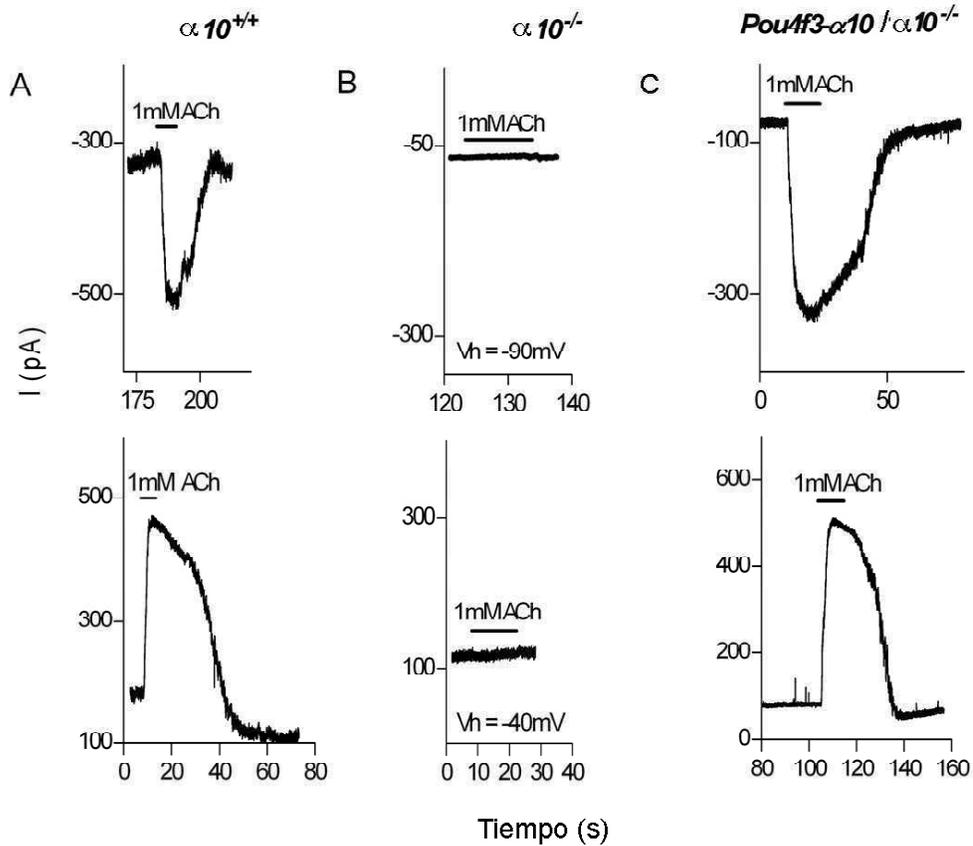


Figura 1. Rescate de las respuestas colinérgicas en CCIs en animales *Pou4f3-α10/α10^{-/-}*. Respuestas colinérgicas de CCIs en (A) animales salvajes $\alpha 10$ (+/+), 2 células, n=1 ratón), (B) animal $\alpha 10^{-/-}$ (2 células, n=2 ratones) y (C) animales *Pou4f3-α10/α10^{-/-}* (6 células, n= 5 ratones). (Panel superior) Registros representativos de las corrientes combinadas (nAChR + SK2) a un voltaje de sostén de -90 Vm provocadas por la aplicación exógena de ACh 1 mM. (Panel inferior) Las mismas condiciones que en el panel superior pero a un voltaje de sostén de -40 Vm.

7.2 Análisis funcional del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en el *Pou4f3-α10* luego del comienzo de la

audición.

En los experimentos anteriores demostramos que el transgén se expresa en una subunidad $\alpha 10$ funcional. En la Figura 2 se observan respuestas de CCIs ante la aplicación de ACh 1mM luego del comienzo de la audición (P17 y P20) en el *Pou4f3- $\alpha 10$* . La Figura 2 A y B muestran que las CCIs no responden a ACh tanto a -90 mV como a -40 mV. Con el fin de aumentar la probabilidad de detectar respuestas muy pequeñas bañamos a la células en una solución con K^+ 40 mM de manera de correr el potencial de reversión del K^+ hasta -32 mV. Esto aumenta la fuerza de entrada en iones K^+ cuando la célula es fijada a un voltaje de -90 mV. En estas condiciones, tampoco se observaron corrientes ante las aplicaciones de ACh. Estos experimentos demuestran que si bien el *Pou4f3- $\alpha 10$* codifica para una subunidad $\alpha 10$ funcional (ver apartado 7.1), la presencia de la subunidad $\alpha 10$ luego del comienzo de la audición no es suficiente para que se forme un receptor nicotínico funcional.

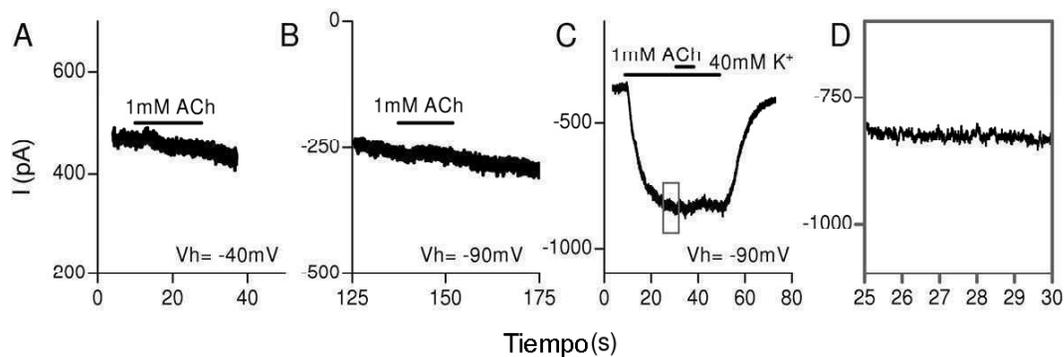


Figura 2. Análisis de las corrientes colinérgicas en las CCIs en animales *Pou4f3- $\alpha 10$* entre P17 y P20. Registros representativos, a un voltaje de sostén de -90 Vm, de las corrientes activadas por ACh 1 mM en presencia de 40 mM K^+ (9 células, n=4 ratones). En el animal *Pou4f3- $\alpha 10$* , como ocurre en el animal salvaje, la respuesta colinérgica se pierde luego del P13.

BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía.

Adler JH, Adler HJ, Belyantseva IA, Merritt RC Jr, Frolenkov GI, Dougherty GW, Kachar B (2003) Expression of prestin, a membrane motor protein, in the mammalian auditory and vestibular periphery. *Hear. Res.* 184: 27-40.

Alford BR, Ruben RJ (1963) Physiological, behavioral and anatomical correlates of the development of hearing in the mouse. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 72: 237-247.

Zuo J, Treadaway J, Buckner TW, Fritsch B (1999) [Visualization of alpha9 acetylcholine receptor expression in hair cells of transgenic mice containing a modified bacterial artificial chromosome.](#) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 14100-14105.

Zurek PM, Clark WW, Kim DO (1982) [The behavior of acoustic distortion products in the ear canals of chinchillas with normal or damaged ears.](#) *J. Acoust. Soc. Am.* 72: 774-780.

