



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efectos del trauma acústico y rol del sistema eferente durante el periodo crítico del desarrollo del sistema auditivo

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas.

Lic. Valeria Carolina Castagna

Directora: Dra. María Eugenia Gómez Casati

Co director: Dr. Mariano Nicolas Di Guilmi

Consejera de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Mayo 2024.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis fueron publicados en:

Alejandro O. Sodero *, **Valeria C. Castagna ***, Setiembre D. Elorza, Sara M. Gonzalez-Rodulfo, María A. Paulazo, Jimena A. Ballesterio, Mauricio G. Martin and María Eugenia Gomez-Casati Phytosterols reverse antiretroviral-induced hearing loss, with potential implications for cochlear aging. Plos Biology (2023) 21(8):e3002257. * **señala igual contribución**

Boero LE*, **Castagna VC***, Terreros GB, Moglie JM, Silva S, Maass JC, Fuchs PA, Delano PH, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME. Preventing presbycusis in mice with enhanced medial olivocochlear feedback. PNAS (2020) 117(21):11811-11819. * **señala igual contribución.**

Di Guilmi MN, Boero LE, **Castagna VC**, Rodríguez-Contreras A, Wedemeyer C, Gómez-Casati ME, Elgoyhen AB. Strengthening of the Efferent Olivocochlear System Leads to Synaptic Dysfunction and Tonotopy Disruption of a Central Auditory Nucleus. Journal of Neuroscience (2019) 39(36):7037-7048.

Boero LE, **Castagna VC**, Di Guilmi MN, Goutman JD, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME. Enhancement of the Medial Olivocochlear System prevents Hidden Hearing Loss. Journal of Neuroscience (2018) 38(34):7440-7451.

En el marco de proyectos en colaboración fueron publicados los siguientes trabajos:

Anabella P. Trigila, **Valeria C. Castagna**, Lara Berasain, Dante Montini, Marcelo Rubinstein, Maria Eugenia Gomez-Casati & Lucía F. Franchini. Accelerated evolution analysis uncovers PKNOX2 as a key transcription factor in the mammalian cochlea. Molecular Biology and Evolution (2023) 40(7):msad128

Francisco Pisciotto, Matías Stopiello, Alejandro R Cinalli, **Valeria Castagna**, Ana Belén Elgoyhen, Marcelo Rubinstein, María Eugenia Gómez-Casati and Lucia Florencia Franchini. Inner Ear Genes Underwent Positive Selection and Adaptation in the Mammalian Lineage. Molecular Biology and Evolution (2019) 36(8):1653-1670

A mis amigos que son y serán siempre mi hogar.

AGRADECIMIENTOS

Hacer un doctorado no es tarea fácil y quien diga lo contrario es porque nunca hizo uno. Sumarle atravesar una pandemia en el interín lo vuelve casi una misión imposible. Solo puede ser logrado si en el proceso uno se encuentra rodeado de las personas correctas, entonces he aquí un agradecimiento honesto y sincero a todas esas personas.

A Maru, mi directora en esta travesía, ni siquiera la inteligencia artificial podría haberme dado una mejor persona para este rol. Fuiste una directora extraordinaria, con una capacidad de empuje que pocas veces vi, estoy muy orgullosa de todo el trabajo que realizamos estos años y extremadamente agradecida por la libertad que tuve siempre. Aprendí muchísimo de vos y deseo que nuestros caminos se vuelvan a cruzar en el futuro.

A Mariano, yo me consideraba una persona eficiente hasta que lo conocí. Además de realizar mil tareas y todas con el mismo nivel de compromiso y excelencia, está siempre al pie del cañón. Su apoyo, comentarios, ideas y marcadas de camino fueron invaluable para mí. Considero un privilegio haber aprendido de él.

A Belén por ser una referente extraordinaria de lo que es ser una mujer en ciencia, por armar un laboratorio que es una gran familia y por siempre darme la confianza para seguir adelante.

A todos los integrantes del laboratorio: Guchi, Eleo, Caro, Vivi, Pao, Paula, Lu, Jime, Claudia, Lucía, Dani, Cami, Mati y Walen por todos los momentos compartidos y el apoyo durante estos años.

Al team de ex becarios del laboratorio, ahora amigos, con los que compartí parte de mi trayecto. Iri, Lucas, Marce, Agus, Lucho, Tais y Sofi, gracias por marcarme el camino tan claramente, enseñarme aún cuando creían que no lo hacían. Gracias por ser parte de cada momento aún estando lejos. Son el dream team.

Para Tais y Sofi podría escribir un capítulo entero de agradecimientos. Me voy a limitar a decir que sin ustedes no lo hubiera logrado y son una de las mejores cosas que me llevo de estos años. Las amo profundamente y me llenan de orgullo.

A Lucho por ser mi primer maestro, y guiarme con tanta paciencia y cariño cuando todo comenzó. Gracias por seguir estando presente en el día a día a pesar de la distancia, gracias por los audios estilo podcast, por ser el dealer de chismeríos y de papers, por la amistad incondicional y las risas infinitas.

A mis amigas de la facultad, Belén, Ro, Gisi y Celeste. La Universidad de Buenos Aires me regaló unas amigas para toda la vida que amo y admiro profundamente. En ellas encuentro ejemplo a diario, me enseñan y son un bálsamo en los tiempos difíciles. Sin duda este doctorado no hubiera sido posible sin ellas. A Bel y Meli gracias por compartir el camino codo a codo, gracias por las SAN compartidas, por hacer que la neurociencia sea un planazo dentro y fuera del laboratorio y por el empuje enorme en la recta final. A Lula y Flor gracias por la amistad todos estos años, por ser un refugio y un lugar de risas, por la paciencia y la incondicionalidad.

A mis amigas de la vida Noe, Meli, Flor y Marian, gracias por mostrarme que el tiempo puede pasar, pero algunas cosas logran permanecer, tal vez mutan pero la esencia es la misma. Las quiero siempre.

A Franchu, Gael y Manu, mis sobris/ahijados por sacar lo mejor de mí, por mostrarme lo que verdaderamente importa. Por hacerme ejercitar la paciencia y el amor incondicional.

A Ceci mi amiga incondicional, gracias por bancarme en todas y ser la que está ahí siempre.

A Santiago mi mejor amigo, mi compinche desde los 6 años, gracias por conocerme mejor que nadie y aun así seguir en mi vida.

A mi mamá por el amor, la paciencia y todas las posibilidades que tuve en mi vida.

*Para finalizar voy a tomarme la libertad de citar a Wos, que en una de sus letras dice “No hables de meritocracia, me da gracia, no me jodas, que sin oportunidades esta m*erda no funciona”. Todo el trabajo narrado en esta tesis (y muchísimo más) fue posible gracias a la infinidad de oportunidades que me ha brindado la educación pública de nuestro país. En estos tiempos la educación pública atraviesa una más de sus crisis, viéndose amenazada por personas que denostan la educación de calidad que ella ofrece y muestran un profundo temor a que todos los habitantes de la república argentina tengan igualdad de oportunidades. Por ello quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Universidad de Buenos Aires, en especial a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, lugar que por muchos años fue mi segundo hogar y por siempre será parte fundamental de mi historia. Gracias UBA, te defenderé en cualquier rincón del mundo.*

RESUMEN

“Efectos del trauma acústico y rol del sistema eferente medial olivococlear durante el periodo crítico del desarrollo del sistema auditivo”

La pérdida de audición es uno de los problemas de salud crónicos más comunes que afecta a personas de todas las edades y nivel socioeconómico. La Organización Mundial de la Salud estima que en la actualidad hay aproximadamente 360 millones de personas con una pérdida de audición incapacitante. Esta condición representa un desafío significativo para la población mundial, ya que afecta su capacidad de comunicarse efectivamente y llevar a cabo tareas cotidianas. Entre las causas no congénitas de la pérdida de la audición se destacan: el proceso de envejecimiento, infecciones, el uso de algunos antibióticos aminoglucósidos, fármacos antirretrovirales, agentes antineoplásicos y la exposición a ruidos intensos. Cada día existen más evidencias sobre la creciente importancia que ha tomado la exposición a sonidos intensos como desencadenante de déficits en el procesamiento auditivo, la cual cobra una relevancia adicional si se tiene en cuenta que las nuevas generaciones están sometidas a niveles de contaminación acústica cada vez mayores. Recientemente, algunos trabajos han documentado que la exposición temprana a ruidos intensos lleva a una mayor vulnerabilidad al proceso de envejecimiento, y a su vez, se ha observado que no todas las personas son igualmente susceptibles a la pérdida de audición por exposición al ruido y que esa variabilidad podría tener bases genéticas.

Por lo tanto, en esta tesis se buscó estudiar el efecto de la exposición temprana a sonidos de alta intensidad, utilizando líneas de ratones transgénicos con distinto nivel de actividad del sistema eferente olivococlear medial (MOC), el cual se propone entre otras de sus funciones, como un mecanismo “protector” contra el trauma acústico. Adicionalmente, se ha estudiado los efectos de la administración de fitoesteroides ante la pérdida auditiva causada por drogas antirretrovirales y su posible uso para el tratamiento de la pérdida auditiva por envejecimiento.

El presente trabajo muestra que la exposición a sonidos intensos en etapas tempranas del desarrollo causa una disminución en la sensibilidad auditiva que perdura hasta la adultez, acompañado de una notoria pérdida de sinapsis aferentes y una disminución de la actividad en los núcleos superiores de la vía auditiva. Además, brinda evidencias de que la actividad del sistema MOC constituye un mecanismo eficiente de protección frente al trauma acústico temprano. Por último, esta tesis sienta precedente del uso de fitoesteroides para restaurar la pérdida auditiva generada por drogas antirretrovirales y constituye una primera evidencia de su posible uso terapéutico.

Palabras claves: desarrollo, trauma acústico, pérdida de audición, sistema olivococlear, fármacos antirretrovirales, fitoesteroides.

ABSTRACT

"Effects of acoustic trauma and the role of the medial olivocochlear efferent system during the critical period of auditory system development"

Hearing loss is one of the most common chronic health issues affecting individuals of all ages and socioeconomic levels. The World Health Organization estimates that currently there are approximately 360 million people with disabling hearing loss. Hearing loss poses a significant challenge to the global population, impacting daily communication and task performance for those affected. Among the non-congenital causes of hearing loss, notable factors include aging, infections, the use of certain aminoglycoside antibiotics, antiretroviral drugs, antineoplastic agents, and exposure to loud noises. Every day, there is increasing evidence of the growing importance of exposure to intense sounds as a trigger for deficits in auditory processing, particularly significant considering that newer generations are exposed progressively higher levels of noise pollution. Recent studies have documented that early exposure to loud noises leads to increased vulnerability to the aging process. Additionally, it has been observed that not all individuals are equally susceptible to hearing loss due to noise exposure, and this variability may have genetic bases.

Therefore, this thesis aimed to study the effect of early exposure to high-intensity sounds using transgenic mouse lines with varying levels of medial olivocochlear system (MOC) activity, which has been proposed as a "protective" mechanism against acoustic trauma. Furthermore, the effects of phytosterol administration in combating hearing loss caused by antiretroviral drugs were investigated, exploring their potential use in the treatment of age-related hearing loss.

The present work reveals that exposure to intense sounds during early development causes a long-lasting decrease in auditory sensitivity that persists into adulthood. This is accompanied by a noticeable loss of afferent synapses and a decrease in activity in the upper nuclei of the auditory pathway. Additionally, it provides evidence that MOC system activity constitutes an efficient protective mechanism against early acoustic trauma. Finally, this thesis establishes a precedent for the use of phytosterols to restore hearing loss caused by antiretroviral drugs, representing an initial indication of their potential therapeutic use.

Keywords: development, acoustic trauma, hearing loss, olivocochlear system, antiretroviral drugs, phytosterols.

AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN.....	13
Generalidades del sistema auditivo	13
Anatomía y organización del sistema auditivo periférico	13
La transducción de los estímulos auditivos.....	15
Inervación del órgano de Corti maduro	19
Inhibición colinérgica de la amplificación coclear	24
Desarrollo post natal del sistema auditivo	26
Cambios postnatales en la estructura y función del órgano de Corti	26
Sinaptogénesis aferente al órgano de Corti	27
Actividad eléctrica espontánea en la cóclea	30
Inervación eferente coclear durante el desarrollo postnatal.....	31
Causas no congénitas de pérdida auditiva	33
Pérdida auditiva por exposición a ruidos intensos.....	34
OBJETIVOS GENERALES.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS	40
Animales.....	40
Tratamiento con Efavirenz y Fitoesteroides	41
Sistema de registro y exposición	41
Exposición a ruido	42
Evaluaciones de fisiología auditiva	42
ABRs	45
DPOAEs.....	46
Inmunofluorescencia	47
Análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía	49

Análisis estadístico	51
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A RUIDOS INTENSOS DURANTE EL PERIODO CRÍTICO DE DESARROLLO DEL SISTEMA AUDITIVO	52
OBJETIVOS PARTICULARES.....	52
INTRODUCCIÓN	52
RESULTADOS	55
Caracterización de la capacidad auditiva a edades tempranas.....	55
Capacidad auditiva luego de la exposición a sonidos intensos.	59
Evaluación del número de sinapsis aferentes post exposición a trauma acústico.....	68
Caracterización de los cambios en los volúmenes de los elementos sinápticos luego de la exposición a sonidos intensos.	74
DISCUSIÓN.....	76
CAPÍTULO II. IMPACTO DE LOS FITOESTEROLES EN LA PÉRDIDA DE AUDICIÓN INDUCIDA POR MEDICAMENTOS ANTIRRETROVIRALES Y SU POSIBLE RELEVANCIA EN LA PRESBIACUSIA.....	88
OBJETIVOS PARTICULARES.....	88
INTRODUCCIÓN	88
RESULTADOS	90
Homeostasis del colesterol en el oído interno durante el envejecimiento	90
Efecto de la activación farmacológica de CYP46A1 sobre la sensibilidad auditiva	94
La pérdida de función de las células ciliadas externas puede ser rescatada por fitoesteroides	95
Contenido de colesterol en las células ciliadas externas	97
Distribución de la prestina en las células ciliadas externas.....	99
DISCUSIÓN.....	101
ANEXO	106
BIBLIOGRAFÍA	108

ABREVIATURAS

ABR: potenciales evocados del tronco cerebral (por sus siglas en inglés, auditory brainstem response)

ACh: acetilcolina

BK: canal de potasio dependiente de Ca^{2+} de conductancia grande

Ca^{2+} : ion calcio

CCDV: canales de Ca^{2+} activados por voltaje

CCEs: células ciliadas externas

CCIs: células ciliadas internas

CYP46A1: enzima citocromo P450 46A1 (24-colesterol-hidroxilasa)

dB: decibelios

DPOAEs: Emisiones de los productos de distorsión otoacústicos (por sus siglas en inglés, distortion product otoacoustic emissions)

EX: X día embrionario

Hz: Hertz

LOC: Sistema olivococlear lateral (por sus siglas en inglés, lateral olivocochlear complex)

M: molar (moles/litro)

MB: membrana basilar

MNTB: núcleo medial del cuerpo trapezoide (por sus siglas en inglés, medial nucleus of the trapezoid body)

MOC: Sistema olivococlear medial (por sus siglas en inglés, medial olivocochlear complex)

μV : microvoltios ($\text{V} \cdot 10^{-6}$)

ms: milisegundos

mV: milivoltios ($\text{V} \cdot 10^{-3}$)

nAChR: receptor colinérgico nicotínico

NGE: neurona del ganglio espiral

PSF: Función de dispersión de punto (por sus siglas en inglés, point spread function)

PTS: Cambio permanente de umbrales (por sus siglas en inglés, permanent threshold shift)

PX: X días postnatal

ROI: región de interés (por sus siglas en inglés, region of interest)

S.E.M.: error estándar de la media (por sus siglas en inglés, standard error of mean)

S.D.: desvío estándar (por sus siglas en inglés, standard deviation)

SK2: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña

SNC: sistema nervioso central

TA: trauma acústico

TTS: Cambio transitorio de umbrales (por sus siglas en inglés, temporary threshold shift)

u.a.: unidad arbitraria

V: voltaje

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

Generalidades del sistema auditivo

Anatomía y organización del sistema auditivo periférico

La organización general del sistema auditivo es compartida por todos los amniotas y se destaca por la diferenciación en tres partes: oído externo, oído medio y oído interno. La *Figura 1a* muestra una representación esquemática del oído humano. El oído externo colecta las ondas sonoras y las dirige hacia la membrana timpánica. El oído medio consiste en una cavidad llena de aire que funciona como un transductor de impedancia entre los medios aéreo y acuoso. Las variaciones en la presión del aire generadas por los sonidos hacen vibrar a la membrana timpánica, y desde allí se transmite el movimiento a los huesecillos del oído medio. Seguidamente, la vibración de los huesecillos es transmitida a la ventana oval de la cóclea, una estructura ósea en forma de caracol que contiene el epitelio sensorial, donde tiene lugar la mecanotransducción de los estímulos auditivos. Esta estructura, junto con los componentes del sistema vestibular, forman el oído interno (*Figura 1b*). Una vez alcanzada la cóclea, las ondas de sonido se propagan en medio líquido. La *Figura 1c* muestra un corte transversal de la cóclea el cual revela la existencia de tres compartimentos que se extienden a lo largo de todo el caracol: la escala vestibular, la escala timpánica y la escala media. Las dos primeras se conectan en el extremo apical de la cóclea, mientras que la escala media está completamente separada de los otros compartimentos por diferentes membranas. Por otro lado, estos compartimentos también se diferencian en términos de los fluidos que contienen. La escala vestibular y la escala timpánica están bañadas por un fluido conocido como perilinfa, caracterizado por una baja concentración de K^+ (~5 mM), y altas concentraciones de Na^+ (~140 mM) y Ca^{2+} (~1.3 mM). La escala media, por su parte, presenta en su interior una solución denominada endolinfa, la cual posee una alta concentración de K^+ (~150 mM), y una baja concentración de Na^+ (~1 mM) y Ca^{2+} (~0.2 mM). El órgano de Corti, el epitelio sensorial auditivo de los mamíferos (*Figura 1c*), se encuentra entre las escalas media y timpánica. Allí residen las células ciliadas, las cuales son responsables de la transducción de las ondas mecánicas de sonido a señales eléctricas. Las células ciliadas se diferencian en internas y externas (CCIs y CCEs, respectivamente). Las CCIs forman una única fila, mientras que las CCEs se agrupan en tres filas a lo largo de la cóclea. Ambos tipos celulares reciben su nombre a raíz de los esteriocilios que presentan en su cara apical, estructuras compuestas por filamentos de actina que se insertan en la membrana

plasmática de las células ciliadas (Hudspeth, 2014; Goutman et al., 2015). Los estereocilios, a su vez, en su extremo superior contactan a la membrana tectorial (MT) que se extiende a lo largo de todo el órgano de Corti. Además de las células ciliadas, en el epitelio sensorial existen otros tipos celulares que han sido englobados bajo la categoría de células de soporte y que cumplen diversas funciones metabólicas y estructurales. La organización del epitelio sensorial determina, además, que las células ciliadas estén en contacto con la endolinfa a través de su cara apical, mientras que su membrana basolateral es bañada por líquido perilinfático. El hecho de que las concentraciones iónicas sean diferentes entre la endolinfa y la perilinfa da lugar a la existencia de un potencial electroquímico conocido como potencial endococlear, el cual es de alrededor de +80 mV (Corey & Hudspeth, 1979). La particular concentración iónica de la endolinfa es sostenida a través de la acción de canales iónicos, cotransportadores y bombas electrogénicas presentes en la *stria vascularis*, un tejido altamente vascularizado ubicado en la pared lateral de la cóclea (Heeringa & Köppl, 2019). De este modo, la correcta función de la *stria vascularis* es fundamental para el mantenimiento del potencial endococlear. Por último, el órgano de Corti se apoya sobre una estructura de tejido conectivo conocida como membrana basilar (MB), la cual también se extiende a lo largo de toda la cóclea.

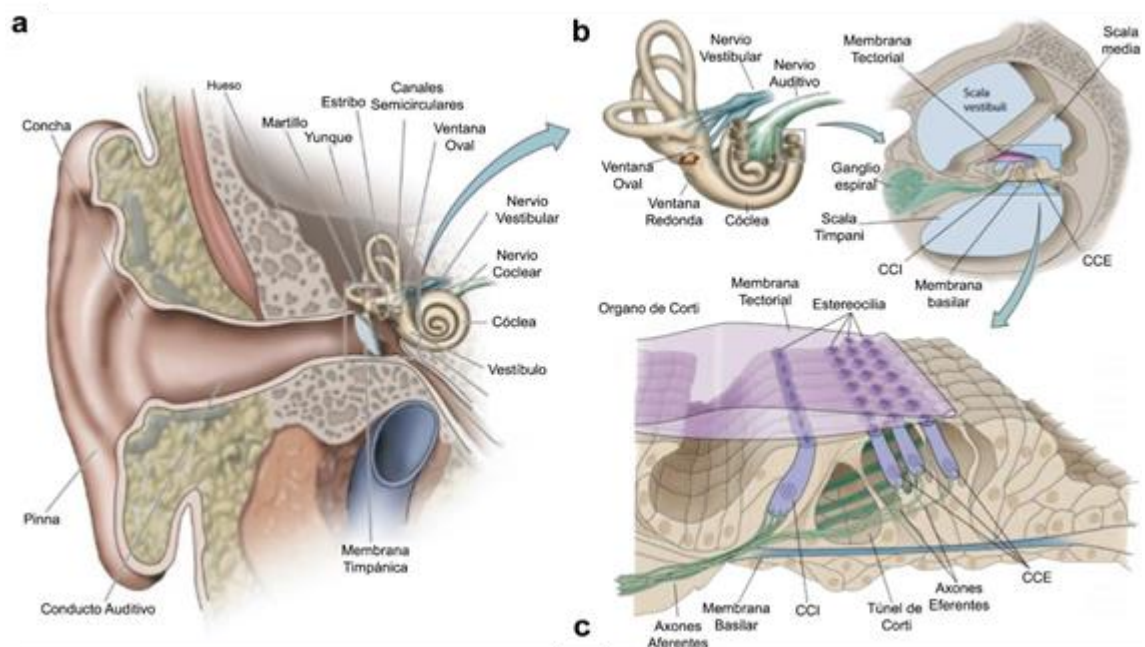


Figura 1 | Estructura anatómica del oído. (a). Estructura general del oído compuesto por el oído externo, medio e interno. **(b).** La cóclea en vista frontal y en una sección transversal, observándose la *scala vestibuli*, la *scala timpani* y la *scala media* en la cual se encuentra el órgano de Corti. **(c).** Una imagen ampliada del órgano de Corti muestra las células ciliadas ubicadas entre la membrana basilar y tectorial. Adaptado de Purves, 2004.

La transducción de los estímulos auditivos

Una vez que las ondas sonoras atraviesan el oído externo y medio, se propagan a través del fluido perilinfático generando oscilaciones de la MB y, en consecuencia, de todo el epitelio sensorial que es sostenido por esta última. En particular, esto conduce a que los estereocilios de ambos tipos de células ciliadas (*Figura 2a*) se deflecten cíclicamente en direcciones opuestas. Los estereocilios están unidos entre sí por filamentos denominados *tip links* (en inglés) los cuales a su vez están anclados a un complejo mecanotransductor localizado en la porción apical de la membrana de las células ciliadas. La deflexión en una determinada dirección conduce a la apertura de los canales mecanotransductores, que son canales catiónicos no específicos (Beurg et al., 2006; Vollrath et al., 2007; Zhao & Müller, 2015; Fettiplace, 2017). La identidad molecular del complejo mecanotransductor ha sido el foco de intensas investigaciones durante los últimos 40 años. Recientemente, se han identificado las subunidades formadoras de poros TMC1 y/o TMC2 (Pan et al., 2018; Zheng & Holt, 2021; Qiu & Müller, 2022) como los componentes principales del canal mecanotransductor. La apertura del mismo conduce a la despolarización de las células ciliadas, ya que los iones de potasio (K^+) entran en las células, siguiendo su gradiente electroquímico determinado por el potencial endococlear. La presencia de canales de K^+ de tipo BK en el cuello de las células ciliadas permite la salida de gran parte del K^+ entrante hacia la perilinfa y, de este modo, limita la magnitud de la despolarización evocada (*Figura 2b*) (Kros et al., 1998; Pyott et al., 2004). Complementariamente, la deflexión en la dirección opuesta produce el cierre de estos canales y provoca la hiperpolarización de las células ciliadas. En suma, la oscilación del epitelio sensorial y la consecuente deflexión cíclica de los estereocilios conducen a que las CCI y CCE estén sometidas a cambios graduados en su potencial de membrana cuya magnitud depende de la intensidad del estímulo (usualmente, en un rango entre 25 mV y 15 mV, pico a pico, respectivamente) (Russell & Sellick, 1978; Dallos et al., 1982; Dallos, 1985, 1992; Russell & Kössl, 1991). Resulta evidente, entonces, la naturaleza mecanosensorial de las células ciliadas, la cual es fundamental en su rol de transductores de estímulos mecánicos a señales eléctricas. Las CCI son consideradas como los fonorreceptores del sistema auditivo, ya que son aquellas en las que la transducción del estímulo mecánico da lugar a la señal eléctrica que finalmente es transmitida hacia el sistema nervioso central (SNC) (*Figura 2b*). En estas células, el movimiento cíclico de los estereocilios no produce el disparo de potenciales de acción, sino que da lugar a despolarizaciones graduadas de la célula que, a su vez, producen la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo CaV1.3 ubicados en la membrana basolateral de las CCI (Brandt et al., 2003). La apertura de estos canales permite la entrada de Ca^{2+} necesaria para la fusión y liberación de vesículas sinápticas cargadas con glutamato (Fuchs et al., 2003). Estas vesículas

sinápticas se encuentran ancladas a una organela conocida como “cuerpo sináptico” (Smith & Sjöstrand, 1961; Saito, 1980; Glowatzki et al., 2008) y a las sinapsis que contienen esta especialización celular en su presinapsis se las conoce como “sinapsis en cinta” o *ribbon* sinapsis por su nombre en inglés. Las sinapsis en cinta no están presentes únicamente en las CCI, sino que también pueden ser encontradas en los fotorreceptores de la retina, los pinealocitos y las células ciliadas del sistema vestibular (Matthews & Fuchs, 2010). Una vez liberado, el glutamato actúa sobre receptores de tipo AMPA presentes en las dendritas de neuronas del ganglio espiral (NGEs) que contactan a las CCI, lo que induce el disparo de potenciales de acción en las mismas (Glowatzki & Fuchs, 2002; Fuchs et al., 2003). En este contexto, la tasa de disparo evocada en las NGEs es un reflejo de la intensidad del sonido, mientras que el intervalo entre disparos codifica la estructura temporal de los estímulos sonoros (Galambos & Davis, 1943; Fuchs, 2005). En la sección siguiente se presenta una descripción más detallada de la organización espacial y funcional de los contactos sinápticos aferentes sobre las CCI.

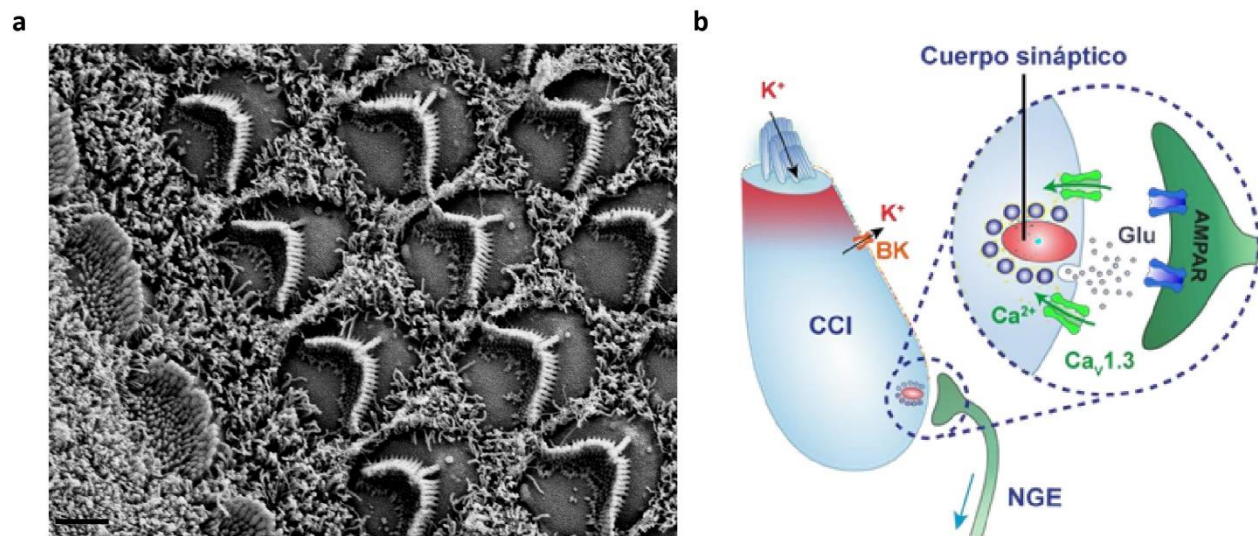


Figura 2| (a). Microscopia electrónica de barrido de una sección de cóclea de un ratón adulto en la que se visibilizan los estereocilios presentes en los ápices de las CCI y CCEs. Barra de escala = 2 μ m. Imagen adquirida durante el curso “Biology of Inner Ear”, en el laboratorio de Biología marina (MBL) en Woods Hole, Massachusetts, EE. UU. **(b).** Esquema de la sinapsis entre una CCI y la dendrita aferente. Se observa el cuerpo sináptico al cual se anclan las vesículas que contienen el neurotransmisor excitatorio, glutamato. La liberación de estas moléculas y posterior activación de los receptores de AMPA que se ubican enfrentados al sitio de liberación causan el disparo de potenciales de acción en la NGE.

En las CCEs, en cambio, se ha demostrado que las oscilaciones en el potencial de membrana de la CCE dan lugar a cambios conformacionales en la prestina, una proteína perteneciente a la familia de

transportadores de aniones SLC26A y que forma multímeros agrupados en torno a la membrana plasmática lateral de la célula (Zheng et al., 2000; Hudspeth, 2008). Si bien los mecanismos moleculares aún son debatidos, se ha estipulado que los cambios conformacionales de la prestina conducen a cambios en la geometría de la CCE (Dallos et al., 2008). Esto avala observaciones previas que mostraban que las CCEs tienen una actividad electromótil: se acortan ante una despolarización y se alargan ante una hiperpolarización (Brownell et al., 1985; Ashmore, 1987). Luego, se demostró que tales ciclos de acortamiento y alargamiento de las CCEs potencian localmente la vibración de la MB, lo que redundaría en una amplificación local de la magnitud de la señal transducida a nivel de las CCI. A este mecanismo de amplificación llevado a cabo por las CCEs también se lo conoce como “amplificador coclear” (Kiang et al., 1986; Dallos, 1992).

Habiendo descrito las propiedades de la mecanotransducción en los dos tipos de células ciliadas, se describirá brevemente cómo las funciones de las distintas estructuras del epitelio sensorial son combinadas para la correcta codificación de las diferentes propiedades de los estímulos sonoros. En primer lugar, la MB no sólo es fundamental en el proceso de mecanotransducción de los estímulos auditivos, sino que además es esencial en la decodificación de las frecuencias de las ondas sonoras. En particular, la MB modifica decrecientemente su rigidez a lo largo de la cóclea, lo que determina que propiedades mecánicas -como la frecuencia característica de resonancia- varíen diferencialmente en toda la extensión del órgano de Corti (Nam & Fettiplace, 2010). Es decir que, si bien los estímulos entrantes generan vibraciones a lo largo de toda la MB, la composición espectral del estímulo determinará la existencia de puntos en los que estas oscilaciones sean máximas. Así, tal como se ve en las *Figuras 3a y b* sonidos de frecuencias bajas generan desplazamientos máximos en la región apical de la cóclea, mientras que sonidos de frecuencias altas lo hacen en la región basal. En consecuencia, en aquellos puntos del órgano de Corti donde las vibraciones inducidas por el sonido sean más intensas, la amplitud de la señal mecanotransducida será mayor.

En segundo lugar, a este mecanismo pasivo de sintonización se suma la contribución del mecanismo activo de amplificación dependiente de la actividad electromótil de las CCEs. En este caso, la contribución del amplificador coclear se encuentra restringida a aquellas regiones cocleares en las que las oscilaciones de la MB fueron capaces de activar a las CCEs, lo que conduce a un incremento local en las oscilaciones de la MB y, en consecuencia, a una amplificación de la señal que es transducida por las CCI. De hecho, el descubrimiento de la función amplificadora de las CCEs fue esencial para explicar la elevada sensibilidad y capacidad de sintonización fina del sistema auditivo de

los mamíferos, puesto que el mecanismo pasivo dependiente de las oscilaciones de la MB era insuficiente para tal fin (Robles & Ruggero, 2001; Hudspeth, 2008).

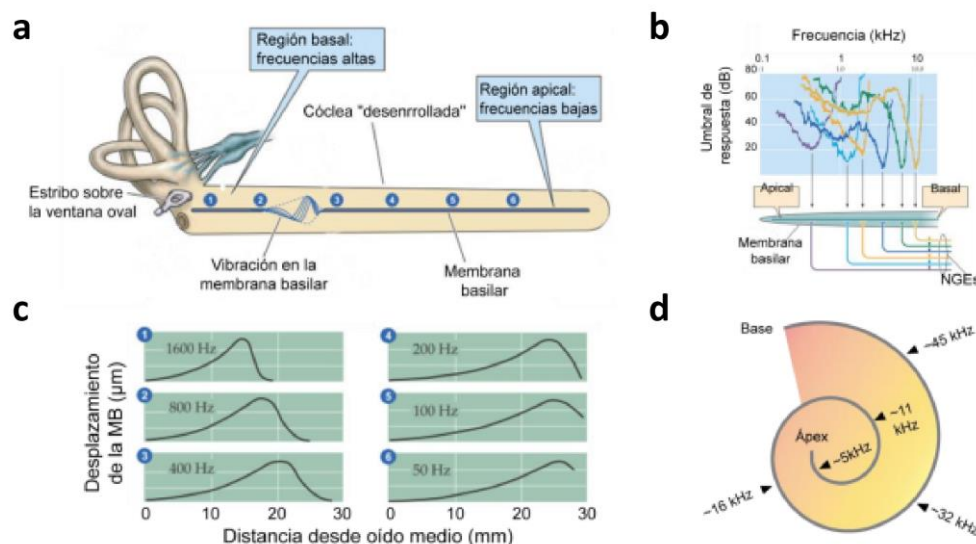


Figura 3 | (a). Representación esquemática de una cóclea de mamífero "desenrollada" con la membrana basilar extendida. La variación diferencial en el grosor y la rigidez de la MB es lo que permite discriminar las frecuencias de los sonidos. Así, en la porción apical se codifican las frecuencias bajas, mientras que en la región basal lo hacen las frecuencias altas. **(b).** Curva de sintonización para distintas NGEs, según la posición de las CCIs que inervan a lo largo de la cóclea. Esta organización de frecuencias en la cóclea constituye un mapa tonotópico que se conserva en los distintos núcleos de la vía auditiva ascendente. Figura modificada a partir de Purves, 2004. **(c).** Representación esquemática de seis puntos (señalados en a) a lo largo de la MB en los que la amplitud de movimiento es máxima para distintas frecuencias. **(d).** Esquemático del mapa tonotópico coclear de un ratón. Las flechas señalan la frecuencia que mayor oscilación genera en esa región de la MB. Imágenes modificadas a partir de Purves 2004 y McGinley et al., 2012.

Es a través de estos mecanismos, que la estimulación sonora produce la activación de una población de CCIs en una región específica de la cóclea, la cual dependerá de la frecuencia del estímulo sonoro. Esa estimulación da lugar a la liberación de glutamato en la sinapsis en cinta y la consecuente activación de las NGEs. Esto se condice con la observación de que cada NGE posee una curva de sintonización de frecuencias individual, es decir, sólo la estimulación en un determinado rango de frecuencias es suficiente para superar el umbral de disparo de potenciales de acción y desencadenar la transmisión de información hacia el SNC (Figura 3c). Se ha descrito que en dicho rango existe un valor de frecuencia característica para el que la respuesta de la NGE es máxima (Lieberman, 1982). De este modo, la discriminación de frecuencias dada por la oscilación diferencial de la MB - amplificada por la actividad de las CCEs- y la selectividad de frecuencias de las NGEs posibilitan

la conformación de un mapa topográfico en la cóclea, también llamado mapa tonotópico, en el que las respuestas a las distintas frecuencias que un mamífero puede procesar se encuentran organizadas espacialmente ya a nivel del órgano de Corti (*Figura 3d*) (Rubel & Fritzsch, 2002). Es decir que las diferentes propiedades de los estímulos sonoros, tales como su intensidad o su estructura temporal, son codificadas a nivel de esta sinapsis en una forma tonotópicamente organizada (Hudspeth, 1997; Fuchs et al., 2003; Fuchs, 2005; Goutman et al., 2015). Adicionalmente, un rasgo importante del sistema auditivo, y que es compartido con otros sistemas sensoriales (Mombaerts, 1999; Gogos et al., 2000; Huberman et al., 2008; Renier et al., 2017), es que esta organización topográfica en la representación de frecuencias se conserva a lo largo de los distintos núcleos que componen la vía auditiva ascendente (Hudspeth, 1997; Kandler et al., 2009).

Inervación del órgano de Corti maduro

Los mecanismos descritos arriba permiten explicar cómo el sistema auditivo periférico es capaz de amplificar los estímulos sonoros y también de codificar sus diferentes características (frecuencia, intensidad, estructura temporal). No obstante, es necesario remarcar que gran parte de la precisión con la que cuenta el sistema auditivo en relación con estos procesos, depende también de la organización de sus circuitos y patrones de inervación a nivel periférico (*Figura 4*), los cuales se detallarán a continuación.

La inervación aferente —es decir, aquella que parte de la cóclea hacia el SNC— es llevada a cabo por las NGEs. En roedores con un sistema auditivo maduro, cada CCI recibe de 10 a 20 contactos sinápticos de NGEs independientes (Liberman, 1980, 1982). A las NGEs que contactan a las CCIs también se las denomina aferentes de tipo I (*Figura 4*). Las NGEs de tipo I son neuronas mielinizadas, representan aproximadamente el 95% de la población total de NGEs y cada una de ellas recibe información desde una única zona activa en una única CCI (Spoendlin, 1972; Perkins & Morest, 1975; Liberman, 1980). El hecho de que cada CCI sea contactada por 10-20 terminales de NGEs de tipo I (Liberman, 1980, 1982), sumado a que cada NGE contacta a una única CCI, facilita la organización del mapa tonotópico en la vía auditiva ascendente. Asimismo, se ha visto que la organización tonotópica a nivel coclear (y también en los núcleos auditivos centrales) se correlaciona con patrones espaciales de distribución de propiedades morfológicas o funcionales. Así, por ejemplo, el número de contactos de NGEs de tipo I sobre las CCIs es mayor en la región medial y decae hacia ambos extremos (Meyer et al., 2009). En este marco, se especula que la mayor inervación aferente en la región medial

contribuye a la mayor sensibilidad auditiva para las frecuencias medias observada en mamíferos (Meyer et al., 2009). Se sabe además que las NGE de tipo 1 pueden subdividirse en tres grupos según sus características morfológicas (Gleich et al., 1993), espaciales y propiedades fisiológicas (Shrestha et al., 2018; Moser et al., 2023). Las NGE del subtipo 1a muestran una alta tasa de disparos espontáneos, se activan con bajos umbrales de sonido y tienden a ser fibras más gruesas. Por otro lado, las del grupo 1b tienen una tasa de disparos espontáneos intermedia y se activan con umbrales de sonido moderados. Por último, las del grupo 1c presentan una baja tasa de disparos espontáneos, se activan con altos umbrales de sonido y tienen un diámetro menor. Se ha observado que estos subtipos neuronales establecen conexiones con las CCI en diferentes áreas de la célula y se conectan con presinapsis en cinta de diversos tamaños a lo largo del eje modiolar-pilar, lo que resulta en un gradiente morfológico en relación con este eje de la célula (*Figura 4b*) (Liberman & Liberman, 2015). En la zona modiolar de la CCI podemos encontrar presinapsis de mayor tamaño contactadas por NGE tipo 1c de diámetro pequeño, mientras que del lado opuesto (pilar) las presinapsis son más pequeñas y los contactos aferentes están a cargo de las NGE del tipo 1a que son de mayor diámetro.

Por otro lado, los cuerpos sinápticos de las CCEs son también contactados por NGEs, denominadas NGEs de tipo II (*Figura 4*). Estas son neuronas amielínicas, contactan varias CCEs al mismo tiempo y sólo representan el 5% de las NGEs totales (Perkins & Morest, 1975; Berglund & Ryugo, 1987; Brown, 1987). Teniendo en cuenta que la sinapsis aferente sobre las CCEs no contribuye significativamente a la transmisión de la información auditiva hacia el SNC, en los últimos años se ha postulado que las NGEs de tipo II estarían involucradas en la señalización de daño en el epitelio auditivo frente a la exposición a sonidos de alta intensidad (Flores et al., 2015; Liu et al., 2015), pero igualmente se trata de una hipótesis aún en discusión. A menos que se explicita específicamente, de aquí en más se usará la abreviatura NGE para referir únicamente a las NGEs de tipo I.

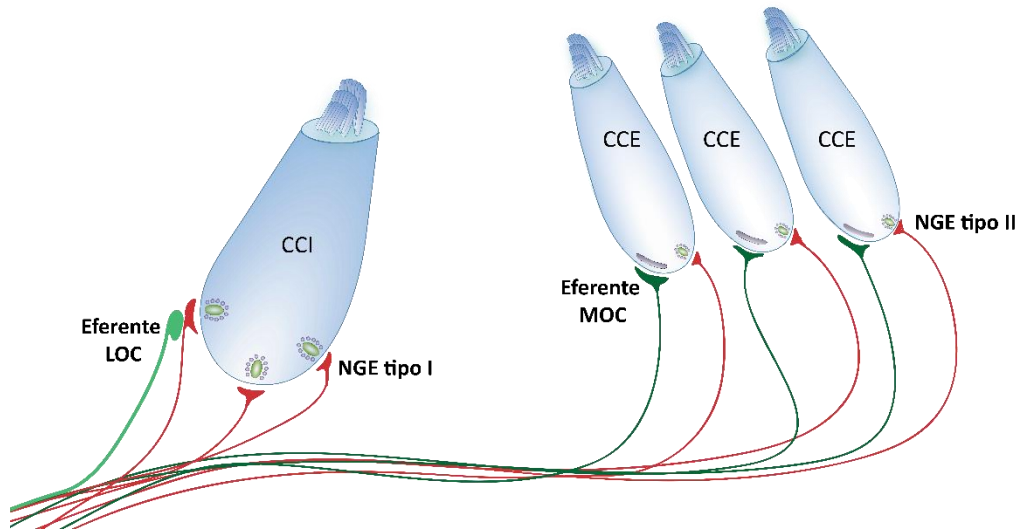
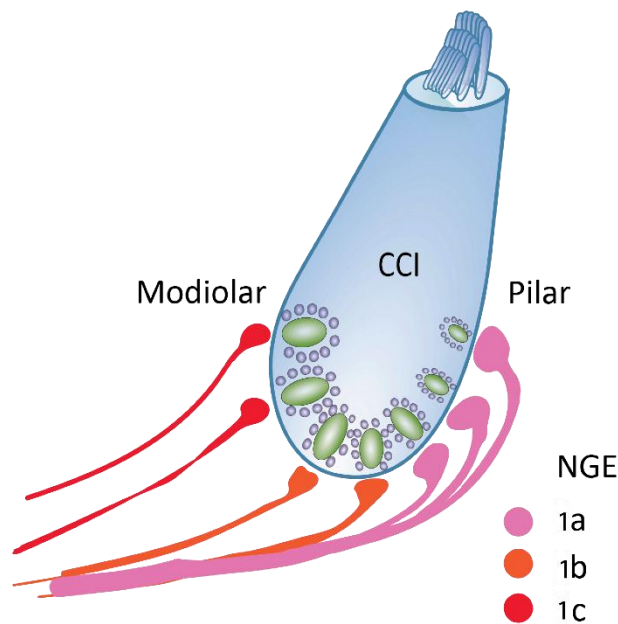
a**b**

Figura 4| (a). Esquema de la innervación aferente y eferente en el órgano de Corti maduro. Los cuerpos sinápticos de las CCIs reciben contacto directo de NGEs de tipo I, mientras que en las CCEs ese contacto es llevado a cabo por las NGEs de tipo II. Las NGEs de tipo I son contactadas, a nivel de sus dendritas, por terminales eferentes del sistema LOC. Los terminales eferentes MOC, en cambio, contactan directamente a las CCEs y, como se verá más adelante modula la actividad del amplificador coclear. **(b).** Detalle de los tipos de NGE que contactan a cada CCI, y del gradiente de tamaño de dichos terminales y de las presinapsis correspondientes.

Los somas de ambos tipos de NGEs se encuentran en el ganglio espiral, el cual se ubica en el modiolo, una estructura ósea que sirve de eje estructural a la cóclea. Desde allí, sus axones se agrupan en el nervio auditivo y abandonan la periferia coclear para llevar la información auditiva hacia el SNC, tal como se ilustra en la *Figura 5a* (Perkins & Morest, 1975; Berglund & Ryugo, 1987; Brown, 1987). Más precisamente, las NGEs forman contactos sinápticos con neuronas presentes en el

núcleo coclear (NC) que se divide anatómica y funcionalmente en una región dorsal (NCD) y ventral (NCV). Desde el NCV parten proyecciones contralaterales al complejo de la oliva superior (SOC, por sus siglas en inglés), integrado por los núcleos de la oliva superior lateral (LSO, por sus siglas en inglés), la oliva superior medial (MSO, por sus siglas en inglés) y el núcleo medial del cuerpo trapezoidal (MNTB, por sus siglas en inglés). Desde el SOC, la transmisión continúa hacia el colículo inferior (CI) y sigue por el tálamo hasta llegar a la corteza auditiva (Knipper et al., 2013). A su vez, también hay una vía paralela que involucra proyecciones desde el NCV al SOC ipsilateral, y desde allí hacia el CI, tálamo y corteza auditiva ipsilateral, aunque su rol funcional es aún discutido (Knipper et al., 2013). En resumen, la transmisión de la información auditiva desde la periferia auditiva hacia los núcleos centrales es principalmente contralateral, a pesar de que a lo largo de la vía existan proyecciones que determinan cierto grado de transmisión ipsilateral (Purves, 2004).

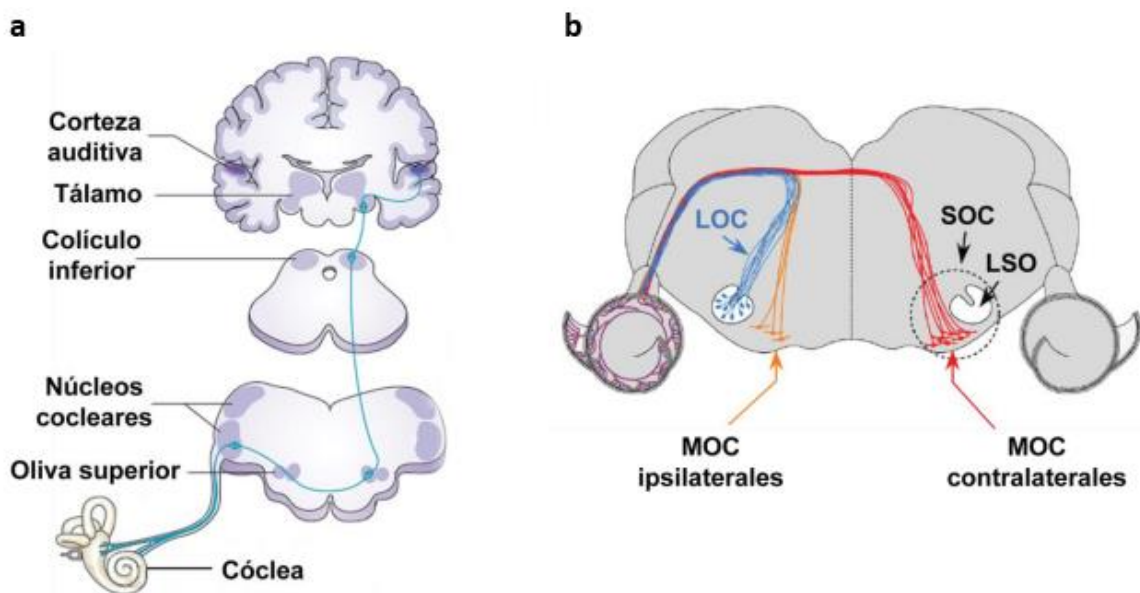


Figura 5 | (a). Esquema de la vía auditiva ascendente. La sinapsis en cinta entre las CCIs y NGEs es la primera sinapsis de la vía ascendente, involucrando múltiples núcleos distribuidos a lo largo del SNC. Figura modificada a partir de Elgoyhen et al., 2015. **(b).** Esquema de los núcleos auditivos a nivel del tallo cerebral que ilustra el origen de las proyecciones eferentes hacia la cóclea. En el complejo de la oliva superior (SOC) se ubica el LSO, en el cual se encuentran los somas de las neuronas LOC que forman contactos axodendríticos con las NGEs de tipo I. En una posición más medial del SOC (específicamente en el VNTB) se ubican los somas de las neuronas MOC que forman contactos directos con las CCEs y regulan la actividad del amplificador coclear. Figura modificada a partir de Maison et al., 2013.

Un rasgo común a todos los vertebrados es que las células ciliadas, presentes en el sistema auditivo, vestibular y la línea lateral de peces, reciben información descendente la cual proviene del

SNC y regula el funcionamiento de las mismas (Simmons, 2002). En este sentido, el sistema auditivo periférico de los mamíferos no es una excepción ya que también recibe una inervación eferente que se origina en el tallo cerebral y permite regular la ganancia del sistema a través de la modulación de la amplificación coclear (Simmons, 2002; Guinan Jr., 2006; Elgoyhen & Katz, 2012; Katz & Elgoyhen, 2014).

La *Figura 5b* muestra que los somas de las neuronas eferentes que inervan la cóclea provienen de dos núcleos ubicados en el tallo cerebral a la altura del cuarto ventrículo: el núcleo ventral del cuerpo trapezoidal (VNTB, por sus siglas en inglés) y el LSO (Warr & Guinan, 1979; Guinan et al., 1983), los cuales a su vez dan origen a las fibras del sistema olivococlear medial y lateral (MOC y LOC, respectivamente, por sus siglas en inglés). En conjunto, ambos grupos conforman el sistema eferente olivococlear, el cual opera como un mecanismo reflejo en respuesta a sonidos contra e ipsilaterales (Buño, 1978; Liberman, 1989). Como ya fuera mencionado previamente, los somas de las neuronas MOC reciben información auditiva proveniente de los NCs contralaterales, lo que produce el disparo de estas neuronas, cuyas fibras envían proyecciones hacia ambos oídos. Cada oído recibe, no obstante, una mayor inervación de fibras MOC contralaterales, en comparación con las ipsilaterales, de manera que las primeras tienen una mayor contribución en el reflejo mediado por fibras MOC (Maison et al., 2003a), como se muestra en el diagrama de la *Figura 5b*. Si bien se conoce que la activación de neuronas del NC conduce al reclutamiento funcional de fibras MOC, no puede excluirse la participación de otros tipos neuronales en el circuito. Por otro lado, existen evidencias que señalan que las neuronas MOC podrían ser reclutadas directamente por proyecciones provenientes desde núcleos ubicados río arriba en la vía auditiva ascendente, tales como la corteza auditiva y el CI (Guinan Jr., 2006; Terreros & Delano, 2015; Maison et al., 2016).

Por otro lado, las neuronas MOC y LOC se diferencian en los blancos a los que se dirige su inervación a nivel periférico. Las neuronas LOC son amielínicas y forman contactos axodendríticos con las NGE de tipo I que inervan a las CCIs (*Figura 4*) en el órgano de Corti y tal inervación es predominantemente ipsilateral (Guinan, 2006). Alrededor de un 30% de las neuronas LOC son dopaminérgicas, mientras que la mayoría de ellas pueden liberar tanto acetilcolina (ACh) como GABA (Maison et al., 2003a; Darrow et al., 2006b; Lendvai et al., 2011). Se ha propuesto que esta inervación permite un control de la excitabilidad de las NGE de tipo I (Liberman et al., 1990; Reijntjes & Pyott, 2016), así como también que podría estar involucrada en la localización espacial del sonido (Darrow et al., 2006a). No obstante, el rol funcional de la inervación LOC sobre las NGEs de tipo I es

aún materia de debate. Las fibras MOC, por su parte, se hallan mielinizadas, contactan directamente a las CCEs en su cara basolateral (*Figura 4*) y tienen un rol inhibitorio sobre la amplificación coclear (Liberman et al., 1990; Guinan, 2006). Se ha encontrado que cada CCE recibe entre 1 y 5 contactos eferentes MOC (Wilson et al., 1991; Vetter et al., 1999; Murthy et al., 2009b), aunque el número varía tonotópicamente: el máximo se encuentra en la región medial de la cóclea y un menor número en los extremos basal y apical (Maison et al., 2003a). Los contactos eferentes MOC sobre las CCEs pueden tomar forma de botón o de copa y, frecuentemente, están asociados con una cisterna subsináptica ubicada dentro de la CCE y en aposición a la membrana plasmática (Fuchs, 1996). Si bien se ha detectado liberación de GABA, CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) y péptidos opioides, el principal neurotransmisor descargado por estas sinapsis es ACh (acetilcolina) (Eybalin, 1993; Maison et al., 2003a). En el siguiente apartado se detalla el mecanismo por el cual la señalización colinérgica de los terminales MOC produce una reducción en la actividad electromotil de las CCEs y, de este modo, reduce el efecto del amplificador coclear.

Inhibición colinérgica de la amplificación coclear

La llegada de un potencial de acción al terminal presináptico MOC produce la liberación de la ACh, la cual gatilla la apertura del receptor nicotínico colinérgico (nAChRs) $\alpha 9\alpha 10$ ubicado en la cara basolateral de las CCEs (*Figura 6*) (Elgoyhen et al., 2001). Este receptor es un canal catiónico no selectivo que posee propiedades farmacológicas y biofísicas que le confieren características mixtas entre receptores nicotínicos y muscarínicos, y presenta una alta permeabilidad relativa al Ca^{2+} (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Gómez-Casati et al., 2005). A su vez, existe un acoplamiento funcional entre el receptor $\alpha 9\alpha 10$ y el canal de K^+ de tipo SK2 (Oliver et al., 2000), cuya actividad depende de la presencia de Ca^{2+} intracelular (Fakler & Adelman, 2008). De este modo, la entrada de Ca^{2+} a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ da lugar a la activación del canal SK2 y, en consecuencia, a la salida de K^+ a favor de su gradiente electroquímico, lo que lleva a la hiperpolarización de la CCE (Elgoyhen & Katz, 2012; Fuchs, 2014; Katz & Elgoyhen, 2014). Además, se ha propuesto que cisternas sinaptoplásmicas cercanas a la membrana basolateral de las CCEs podrían aportar más Ca^{2+} para la activación de los SK2 a partir de mecanismos de liberación de Ca^{2+} inducidos por Ca^{2+} , a la vez que podrían contribuir a la restricción espacial de este catión (Lioudyno et al., 2004; Fuchs, 2014; Fuchs et al., 2014; Moglie et al., 2018). En resumen, la consecuencia funcional de la activación de la sinapsis MOC-CCE es la hiperpolarización y consecuente elongación de las CCEs, lo que resulta en una reducción de la amplificación coclear y, por ende, en una disminución en la magnitud de la señal transducida en las

CCEs (Galambos, 1955; Wiederhold & Kiang, 1970; Gifford & Guinan Jr., 1987).

A través de la modulación de la actividad electromótil de las CCEs, las neuronas MOC conforman un mecanismo reflejo que permite controlar la ganancia del sistema auditivo periférico de los mamíferos. Similar a lo descrito para la vía auditiva ascendente, el sistema eferente MOC también está organizado tonotópicamente (Brown, 2014). Esto implica que la activación de una neurona MOC que proyecta hacia una dada región del órgano de Corti, estará dada por la activación de NGEs de tipo I correspondientes a esa misma región tonotópica, de modo que este mecanismo de retroalimentación negativa se dirija preferencialmente a las regiones que requieren ser moduladas. A su vez, se ha determinado que la actividad inhibitoria MOC aumenta con la intensidad del estímulo y que, por todo lo descrito previamente, produce una reducción en el tamaño de la población de neuronas aferentes activadas por estímulos sonoros, lo que se traduce en una disminución de la sensibilidad auditiva global (Galambos, 1955; Wiederhold & Kiang, 1970; Gifford & Guinan Jr., 1987; Brown, 1989).

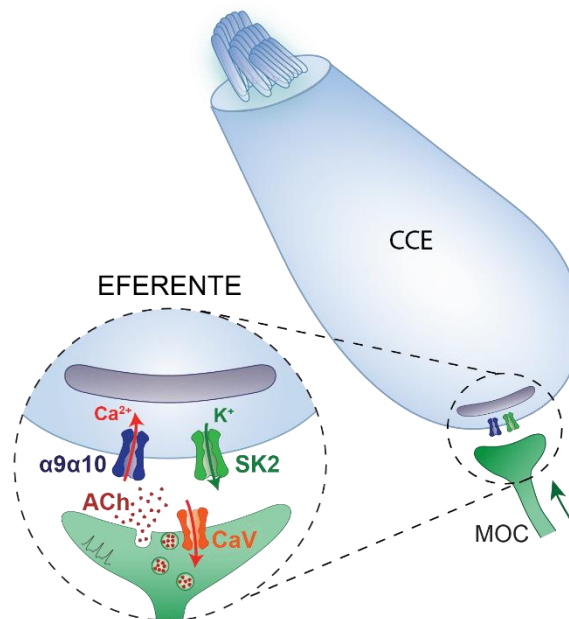


Figura 6 | Esquema de la inervación de una CCE mostrando el termina MOC y una amplificación de la sinapsis MOC-CCE. Allí puede verse que la llegada de un potencial de acción al terminal MOC induce la liberación de ACh. La ACh activa al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ ubicado en la membrana de la CCE, lo que da lugar a la entrada de Ca^{2+} a la CCE. El influjo de Ca^{2+} produce la activación de conductancias de K^{+} de tipo SK2, así como también induce la liberación de más Ca^{2+} desde la cisterna sinaptoplásmica (en gris). La salida de K^{+} a través del canal SK2 da lugar a una hiperpolarización de la CCE que resulta completamente limitante de la actividad electromotil de estas células y, por lo tanto, inhibe la amplificación coclear.

La presencia de un mecanismo evocado por la estimulación sonora, pero que modula negativamente la detección de estímulos auditivos, despertó numerosos debates en torno a su rol funcional. En primer lugar, su capacidad de limitar la activación de NGEs de tipo I podría contribuir al control del rango dinámico de la audición (Guinan, 1996). También se ha postulado que el reflejo olivococlear contribuiría al desenmascaramiento de sonidos en ambientes ruidosos (Dolan & Nuttall, 1988; Winslow & Sachs, 1988; Kawase et al., 1993) y, de este modo, podría también mediar en la atención selectiva en humanos (Wittekindt et al., 2014) y otros mamíferos (Oatman, 1976; Delano et al., 2007; Terreros et al., 2016). Cabe aclarar que el reflejo olivococlear no sería la única estrategia subyacente en los procesos de atención selectiva, ya que hay evidencias que sugieren la participación de distintos niveles dentro de la jerarquía del SNC (Kerlin et al., 2010; Mesgarani & Chang, 2012; Ding & Simon, 2013; Park et al., 2016; Dai et al., 2018) que podrían tanto suprimir estímulos irrelevantes como reforzar los más relevantes (Fritz et al., 2007; Couperus & Mangun, 2010). Por último, se ha indicado que la inhibición de la amplificación coclear mediada por las fibras eferentes MOC podría ser relevante en la protección frente a los daños funcionales y estructurales ocasionados por la exposición a ruidos intensos (Liberman, 1991; Rajan, 2000; Taranda et al., 2009; Maison et al., 2013). Este último aspecto es particularmente relevante en este trabajo, por lo que se desarrollará con mayor profundidad en los siguientes apartados.

Desarrollo post natal del sistema auditivo

Cambios postnatales en la estructura y función del órgano de Corti

En mamíferos altriciales, el desarrollo completo del sistema auditivo ocurre después del nacimiento (Geal-Dor et al., 1993; Puel & Uziel, 1987). En el caso específico de los roedores, este proceso tiene lugar durante las dos primeras semanas después del nacimiento. Durante este período, los roedores no responden a estímulos acústicos externos, aunque las células sensoriales son capaces de detectar estímulos sonoros (Lelli et al., 2009) y existe conexión neuronal con el sistema nervioso central (Hoffpauir et al., 2009). La imposibilidad para detectar el sonido exterior tiene su origen en: a) la oclusión física del canal del oído externo, alrededor de P8 se inicia la apertura paulatina del mismo, lo que permite que las ondas de sonido comiencen a ser transmitidas hacia el oído interno (Mikaelian & Ruben, 1965); b) la subdesarrollada mecánica del oído medio e interno y la composición iónica inmadura de los fluidos cocleares (Bosher & Warren, 1971; Geal-Dor et al., 1993; Rybak et al., 1992;

Woolf & Ryan, 1988) cuyas concentraciones iónicas definitivas en la perilinfa y endolinfa, que determinan el potencial endococlear necesario para la transducción del sonido, se establecen entre P12-14 (Schmidt & Fernandez, 1963) y c) la capacidad subdesarrollada de deflexión de los estereocilios debido a cambios en su longitud y grosor, la cual se completa alrededor de P20 (Krey et al., 2023).

Asimismo, durante este periodo del desarrollo postnatal, el sistema auditivo presenta una actividad eléctrica espontánea e independiente del sonido (Jones et al., 2007; Liberman & Brown, 1986; Sonntag et al., 2009; Tritsch et al., 2007). Distintas líneas de evidencia sugieren que la actividad eléctrica se origina en el órgano auditivo primario del oído interno, la cóclea, y se propaga a lo largo de toda la vía auditiva (Jones et al., 2007; Lippe, 1994; Tritsch et al., 2010), dando lugar a mecanismos de plasticidad y reorganización sináptica (Kandler et al., 2009). De esta manera, previo al comienzo de la audición, el proceso de refinamiento se caracteriza por la formación de sinapsis en exceso (excitatorias e inhibitorias), seguida de su eliminación o podado, hasta adoptar la configuración madura (Bulankina & Moser, 2012). Luego del comienzo de la audición el refinamiento continúa, pero ya no es orquestado por la actividad espontánea si no, por la evocada por sonido. Si esta actividad evocada es alterada de alguna manera (ablación de la cóclea o exposición a ruido) la formación de las proyecciones excitatorias e inhibitorias se ve interrumpida y los circuitos neuronales permanecen en un estado inmaduro (Sanes et al., 1992; Sanes & Takács, 1993; Gabriele et al., 2000; Rybalko & Syka, 2001; Kandler, 2004).

Sinaptogénesis aferente al órgano de Corti

Hacia el final del periodo de gestación, las células ciliadas cocleares son contactadas por neuronas del ganglio espiral (NGE): mielinizadas de tipo I y no mielinizadas de tipo II (*Figura 7a, panel izquierdo*). En este momento del desarrollo, las NGE presentan arborizaciones y proyectan simultáneamente a CCI y CCEs en la misma posición radial (Echteler, 1992; Perkins & Morest, 1975). Cada fibra emite ramificaciones colaterales temporales que se ven sujetas a un refinamiento progresivo durante la primera semana postnatal (Wiechers et al., 1999). La consolidación o remoción de estas sinapsis da lugar a una reducción cercana al 50% en el número de contactos sinápticos aferentes funcionales hacia el final de la segunda semana postnatal. El podado sináptico se atribuye a mecanismos de refinamiento de neuritas, retracción de NGE ramificadas inmaduras y apoptosis neuronal (Barclay et al., 2011; Delacroix & Malgrange, 2015; Huang et al., 2012). Por su parte la pre-

sinapsis o sinapsis en cinta de las CCI también sufre un proceso de maduración y remodelación durante las primeras semanas postnatales. Los primeros rastros de sinapsis en cinta provienen de la segunda semana embrionaria donde los precursores sinápticos se encuentran libres en el citoplasma de las células. Durante la primera semana post natal se produce un proceso de fusión entre varias sinapsis en cinta pequeñas y de forma redondeada, que contienen vesículas de mayor tamaño y las mismas se anclan a la membrana plasmática como se muestra en la *Figura 7b*. Hacia la segunda semana las sinapsis aumentan su tamaño, adoptan una forma de gota y a su vez aumenta el número de vesículas sinápticas ancladas a ellas, ya para la tercera semana postnatal se alcanza la configuración morfológica y funcional estable de las sinapsis en cinta (Voorn et al., 2020). Adicionalmente, se ha descubierto que la definición del gradiente de tamaños de los elementos pre- y postsinápticos en el eje modiolar-pilar es otro proceso muy dinámico que tiene lugar en el primer mes de vida postnatal. Esto fue demostrado en una serie de experimentos en los que se analizaron los volúmenes de los elementos antes mencionados en imágenes de microscopía confocal para diferentes estadios entre P7 y P28 (Liberman & Liberman, 2016). Allí se vio que, si bien a P7 el número de contactos sinápticos por CCI es significativamente mayor al observado en un animal adulto, la distribución en los volúmenes de los elementos sinápticos exhibió el mismo patrón que en ratones adultos: mayores volúmenes sinápticos en el lado modiolar y menores en la cara pilar. No obstante, alrededor del comienzo de la audición, tal patrón desaparece debido a que los cuerpos sinápticos modiolares reducen su tamaño. A partir de P21, la distribución comienza a cambiar nuevamente y es alrededor de P28 que se establecen los gradientes complementarios descritos en el animal adulto (Liberman et al., 2011). Por otro lado, si bien los parches de receptores postsinápticos de AMPA pueden variar su tamaño a lo largo del periodo P7-P28, el volumen de los parches ubicados del lado modiolar es siempre menor al de aquellos ubicados del lado pilar, en consonancia con lo reportado en ratones adultos (Liberman et al., 2011). Estos cambios a lo largo de la maduración postnatal del sistema auditivo periférico fueron también hallados en ratas (Kalluri & Monges-Hernandez, 2017), en las que además se encontró que la diversificación de las tasas de disparo de las NGEs de tipo I se desarrolla entre P15 y P32 (Wu et al., 2016). Por otro lado, existen numerosas evidencias que señalan que el refinamiento en la transmisión de la información sensorial a través de la vía aferente funcional, así como la mielinización de las NGEs, son procesos que terminan de completarse en los primeros dos meses de vida postnatal de los roedores (Shnerson et al., 1981; Romand & Romand, 1985; Kim & Rutherford, 2016)

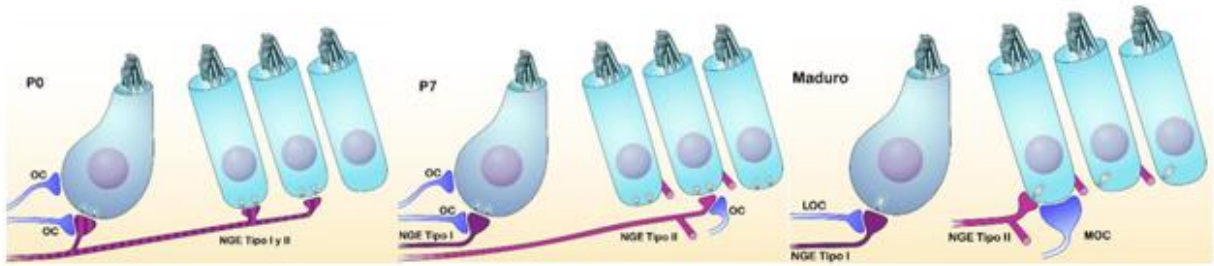
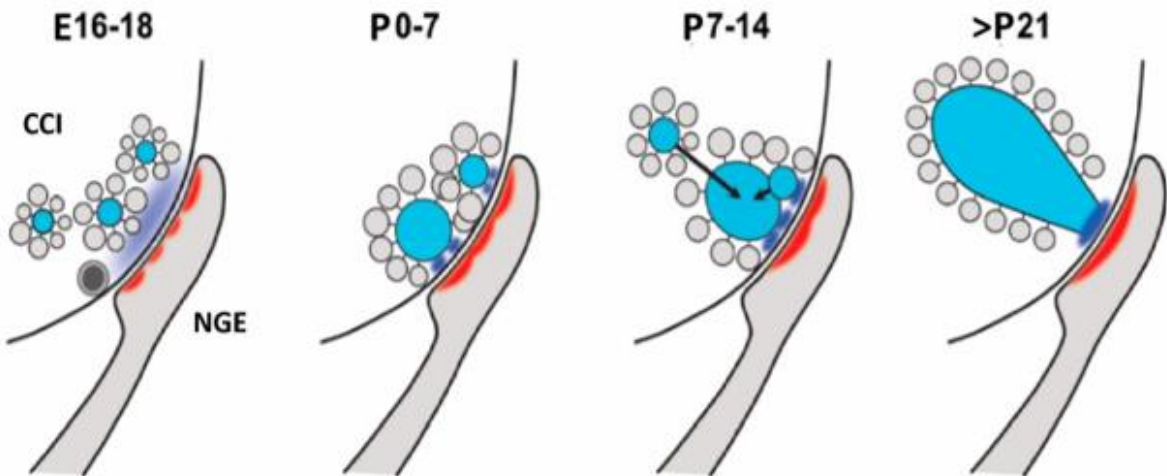
a**b**

Figura 7| (a) Desarrollo postnatal de la innervación coclear. **Panel izquierdo:** al momento del nacimiento, el polo basal de la CCI presenta 3 tipos de sinapsis: 1) aferentes inmaduros axosomáticos; 2) eferentes transitorios axosomáticos; 3) eferentes axodendríticos. Las CCI y las CCEs pueden ser innervadas por la misma NGE. Las CCEs no presentan innervación eferente. **Panel medio:** al finalizar la primera semana, las CCI son innervadas por NGE de tipo I y las CCEs por las de tipo II. Se observan fibras eferentes en proximidad con las CCE. **Panel derecho:** en la cóclea madura, las CCI solo presentan sinapsis aferentes. Las neuronas olivococleares laterales contactan los botones sinápticos de las NGEs de tipo I mientras que los eferentes mediales olivococleares hacen sinapsis directa sobre las CCEs. Adaptado de Bulankina & Moser, 2012. **(b) Desarrollo postnatal de las sinapsis en cinta.** En las primeras etapas postnatales, los precursores de las sinapsis en cintas se adhieren a la membrana presináptica, donde se fusionan junto con sus densidades presinápticas individuales (azul oscuro). Posteriormente, las sinapsis en cintas crecen y el tamaño de las vesículas sinápticas adjuntas disminuye, mientras que su número aumenta hasta el inicio de la audición. Simultáneamente, las densidades postsinápticas cambian de una organización de múltiples conglomerados a una densidad elipsoide por botón. El refinamiento del desarrollo tanto de la pre como de la postsinapsis resulta en la innervación predominantemente de una zona activa por neurona aferente y, en la mayoría de las sinapsis, una sola presinapsis madura, grande y en forma de gota por zona activa. Adaptado de Vorn & Vogl, 2020.

Actividad eléctrica espontánea en la cóclea

Desde estadios embrionarios y hasta el comienzo de la audición en la segunda semana postnatal, la despolarización de las CCIs evoca el disparo de potenciales de acción mediados por Ca^{2+} (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a). La cinética de estas espigas es mucho más lenta que la exhibida por los clásicos potenciales de acción mediados por Na^+ y es sostenida principalmente por canales de Ca^{2+} de tipo L conteniendo la subunidad Cav1.3 (Brandt et al., 2003; Marcotti et al., 2003a; Platzer et al., 2000). En consecuencia, cada potencial de acción es acompañado por el influjo de Ca^{2+} que gatilla la liberación de vesículas conteniendo glutamato hacia las dendritas de las NGEs (Beutner & Moser, 2001; Glowatzki & Fuchs, 2002; Johnson et al., 2005). La activación de los receptores de tipo AMPA en los terminales aferentes permite que la actividad iniciada en la cóclea sea propagada a lo largo de toda la vía auditiva (Tritsch & Bergles, 2010) (*Figura 5a*). En relación con este punto, aún se debate si la actividad eléctrica que exhiben las CCIs se debe a propiedades intrínsecas de la célula (Johnson et al., 2011a, 2012, 2016; Kros et al., 1998), o es inducida/modificada por estímulos ajenos a la misma: se ha demostrado que las células de soporte, vecinas a las CCIs, liberan ATP en forma espontánea, activando una serie de mecanismos que da lugar a la despolarización de las CCIs (Tritsch et al., 2007; Wang et al., 2015; Kersbergen et al., 2023). Las CCIs pierden la capacidad de disparar potenciales de acción en forma espontánea hacia el final de la segunda semana postnatal como consecuencia de la expresión de canales rápidos de K^+ activados por Ca^{2+} del tipo BK (Kros et al., 1998; Marcotti et al., 2003a).

Durante la primera semana postnatal, la actividad espontánea de las CCIs exhibe periodos de intensa actividad separados por intervalos inactivos cuya estructura temporal se organiza progresivamente, dando lugar a un patrón estereotipado con ráfagas de disparo mediadas por largos periodos de silencio (Johnson et al., 2011; Sendin et al., 2014; Tritsch et al., 2010). Registros realizados en NGE *in vitro* muestran el mismo patrón de potenciales de acción en estas neuronas y el disparo de estos sería dependiente de la liberación de neurotransmisor mediada por Ca^{2+} de las CCIs (Tritsch et al., 2010). Datos experimentales obtenidos de estas neuronas muestran que antes del comienzo de la audición la tasa de disparo espontáneo tiene una tasa aproximada de 2 disparos por minuto la cual es propagada hasta la corteza auditiva (Babola et al., 2018). Más aún, esta actividad estructurada se repite en registros realizados *in vivo* en núcleos superiores de la vía auditiva como el colículo inferior y el núcleo medial del cuerpo trapezoide (MNTB), aportando al origen periférico de

la actividad espontánea (Sierksma et al., 2017; Tritsch et al., 2010).

Es ampliamente aceptado que estos patrones de actividad cumplen un rol importante en el desarrollo del sistema auditivo (Clause et al., 2014; Kirkby et al., 2013; Leao et al., 2006; Leighton & Lohmann, 2016). El disparo de las CCI es necesario para la maduración de los procesos de liberación de vesículas en la sinapsis aferente (Johnson et al., 2013a), mientras que el bloqueo de la actividad coclear espontánea conlleva a la degeneración de NGEs y sus blancos postsinápticos en el núcleo ventral coclear (Hashisaki & Rubel, 1989; Hirtz et al., 2011; Seal et al., 2008) e interfiere con la maduración de propiedades neuronales y sinápticas en núcleos superiores de la vía (Kotak & Sanes, 1996; Leao et al., 2006; Walmsley et al., 2006; Youssoufian, 2005). La alteración de la actividad espontánea puede modificar la organización del mapa sensorial en distintos puntos del circuito e incluso cambios en el patrón específico de disparo han demostrado ser perjudiciales para el remodelado sináptico de la vía y el refinamiento del mapa sensorial (Clause et al., 2014; Di Guilmi et al., 2019).

Inervación eferente coclear durante el desarrollo postnatal

Fibras eferentes provenientes de núcleos ubicados en el tallo cerebral invaden la cóclea de roedores cerca del día embrionario (E) 13 (Fritzsche & Nichols, 1993). Las neuronas eferentes mediales olivococleares (MOC), maduran tempranamente y proyectan transitoriamente a las CCI (Bergeron et al., 2005; Simmons, 2002; Simmons et al., 1996; Stewart Cole & Robertson, 1992). En el día P0, los axones eferentes forman sinapsis axosomáticas con las CCI (*Figura 6 panel superior*), de manera que, en el periodo previo al comienzo de la audición, las CCI no solo son contactadas por las NGE, sino que también reciben innervación eferente de origen MOC (*Figura 7*).

Las subunidades del nAChR son expresadas en las CCI desde estadios embrionarios y, mientras el mensajero de la subunidad $\alpha 9$ se mantiene hasta el estadio adulto (Elgoyhen et al., 1994; Simmons & Morley, 1998), el mensajero de la subunidad $\alpha 10$ deja de detectarse en P15 (Elgoyhen et al., 2001; Morley & Simmons, 2002). En términos funcionales, las CCI comienzan a responder a la aplicación exógena de ACh y presentan actividad sináptica desde el día P3, la cual se va incrementando hasta el día P10 (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011). Hacia el día P16, en forma concomitantemente con la desaparición de la subunidad $\alpha 10$, la sensibilidad colinérgica se ve reducida y la actividad sináptica eferente es indetectable (Katz et al., 2004; Morley & Simmons, 2002). De esta manera, al final del periodo de desarrollo previo al comienzo de la audición, la sinapsis axosomática a las CCI desaparece completamente y solo se detecta innervación eferente MOC a las CCI que se mantendrá en el individuo adulto (Simmons, 2002; Simmons et al., 1996) (*Figura 8*).

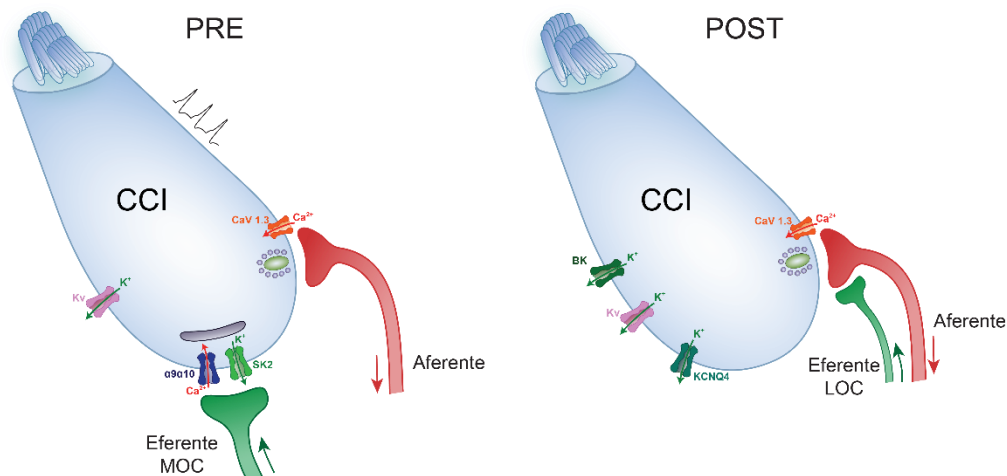


Figura 8 | Esquema de la inervación a la CCI pre y post comienzo de la audición. Se observa que las CCI previo al comienzo de la audición cuenta con una sinapsis inhibitoria del sistema eferente MOC mediada por el nAChR $\alpha 9 \alpha 10$. Dicha sinapsis es transitoria y desaparece en el estadio adulto.

Un amplio cuerpo de evidencia sostiene que el sistema eferente cumple un rol inhibitorio sobre el disparo de los potenciales de acción de la CCI (Clause et al., 2014; Gifford & Guinan, 1983; Glowatzki & Fuchs, 2000; Goutman et al., 2005; Guinan & Gifford, 1988; Johnson et al., 2005, 2011a; Sendin et al., 2014). En este sentido, se ha demostrado que la generación de potenciales de acción en las CCIs puede ser inhibida tanto por la aplicación exógena de ACh (Glowatzki & Fuchs, 2000) como por la activación eléctrica de las fibras eferentes que las contactan transitoriamente en este periodo (Goutman et al., 2005; Johnson et al., 2011). En la preparación de explantos cocleares se ha reportado que el bloqueo de los nAChRs $\alpha 9 \alpha 10$ genera un incremento robusto en la tasa de disparo de la CCI (Johnson et al., 2011a; Sendin et al., 2014), mientras que otros trabajos indican que la actividad eferente no es requerida para iniciar el disparo de potenciales de acción (Tritsch et al., 2010). Sin embargo, se ha de tener en cuenta que en esta preparación *ex vivo*, los axones eferentes son separados del soma neuronal durante la disección coclear, imposibilitando un análisis de sus patrones de actividad fisiológicos. En todo caso, la ablación quirúrgica de la inervación MOC durante el desarrollo postnatal interfiere con el normal desarrollo de la función coclear (Walsh et al., 1998; Walsh & McGee, 1997), así como la ausencia de dicha inhibición sináptica en ratones mutantes nulos para el nAChR produce anomalías en el correcto establecimiento del circuito que conllevarían a déficits en la capacidad de distinguir frecuencias y localizar fuentes sonoras (Clause et al., 2014, 2017).

La coexistencia de la inervación eferente y aferente sobre las CCIs durante este periodo crítico

plantea ciertos interrogantes acerca de la capacidad de estas células de integrar ambas señales en el limitado volumen celular debido a que ambas sinapsis son mediadas por Ca^{2+} y presentan efectos antagónicos en relación con la activación de la vía auditiva. En este sentido, incrementos en los niveles de Ca^{2+} producidos por la actividad colinérgica eferente activan los canales SK2, produciendo inhibición sináptica; mientras que la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV está acoplada a la liberación de vesículas sobre la sinapsis aferente y la consecuente activación de la vía auditiva. En consecuencia, es posible plantear un escenario en el que el influjo de Ca^{2+} a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ promueva la exocitosis en la sinapsis aferente en forma cruzada mientras la CCI se encuentra silenciada desde el punto de vista eléctrico. Ha sido demostrado que dicha activación cruzada es evitada gracias a un eficiente mecanismo de compartimentalización, el cual involucra cisternas subsinápticas asociadas a los botones eferentes, de manera que el Ca^{2+} entrante a través del nAChRs es rápidamente captado por estas y evita que activen el mecanismo de liberación en la vía aferente (Moglie et al., 2018).

Causas no congénitas de pérdida auditiva

La pérdida de audición es uno de los problemas de salud crónicos más comunes que afecta a personas de todas las edades y nivel socioeconómico. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que actualmente hay alrededor de 360 millones de personas con una pérdida de audición incapacitante (OMS, 2017). La pérdida de audición representa un desafío considerable para la población mundial, puesto que quienes son afectados ven reducidas sus posibilidades de comunicación y sus oportunidades laborales (Graydon et al., 2019). Entre las causas no congénitas de la pérdida de la audición se destacan: el proceso de envejecimiento, infecciones, el uso de algunos antibióticos aminoglucósidos, agentes antineoplásicos y la exposición a ruidos intensos. Históricamente, la pérdida de audición debida al envejecimiento, también conocida como presbiacusia, fue considerada como la principal causa de pérdida de audición en adultos. Estudios enfocados a la situación sanitaria de diversas franjas etarias han demostrado que la pérdida de audición está fuertemente relacionada al deterioro en la función cognitiva y al desarrollo de demencia en adultos mayores (Livingston et al., 2017; Deal et al., 2018; Loughrey et al., 2018). La pérdida de audición por envejecimiento comienza con una pérdida de conexiones sinápticas entre las CCIs y las fibras aferentes de tipo I, y una pérdida de CCEs en la región basal de la cóclea que codifica para las altas frecuencias (Fernandez et al., 2015; Gates & Mills, 2005; C. M. Liberman et al., 2014; M. C. Liberman, 2017; Stamatakis et al., 2006). Si bien se conocen y se han descripto mucho las modificaciones que se dan durante ese periodo, los mecanismos celulares y moleculares que subyacen

a esas modificaciones relacionadas al envejecimiento son desconocidas hasta el momento. Asimismo, al proceso natural de pérdida auditiva por envejecimiento se le suman condiciones médicas adyacentes que aceleran el proceso ya sea por la condición *per se* o por la medicación necesaria para el tratamiento. Un ejemplo de esto lo constituyen los pacientes que sufren VIH-SIDA, ya que uno de los antirretrovirales presente en los cocteles que se usan en la actualidad para el tratamiento de dicha condición modifica la actividad de la enzima que degrada colesterol (Mast et al., 2014), lo que entre otras muchas cosas afecta la estabilidad de la pared celular de las células del oído y causa una disminución en su actividad con la consecuente pérdida de la capacidad auditiva. El mecanismo detrás de este proceso será desarrollado en el capítulo II de esta tesis.

En paralelo, en los últimos años el alto nivel de exposición acústica presente en las sociedades modernas adjunta un componente adicional al proceso intrínseco de envejecimiento (Ren et al., 2013). Cada día existen más evidencias sobre la creciente importancia que ha tomado la exposición a sonidos intensos como desencadenante de déficits en el procesamiento auditivo, la cual cobra una relevancia adicional si se tiene en cuenta que las nuevas generaciones están sometidas a niveles de contaminación acústica cada vez mayores (Sliwinska-Kowalska & Davis, 2012). De hecho, existen estimaciones de la OMS que señalan que el 10% de la población mundial se encuentra expuesto a niveles de sonido potencialmente peligrosos (Graydon et al., 2019). Recientemente, trabajos en modelos murinos han documentado que la exposición temprana a ruidos intensos lleva a una mayor vulnerabilidad al proceso de envejecimiento (Kujawa & Liberman, 2006; Fernandez et al., 2015; Fetoni et al., 2022), aunque los mecanismos a través de los cuales ambas etiologías interactúan son aún desconocidos. A su vez, se ha observado que no todas las personas son igualmente susceptibles a la pérdida de audición por exposición al ruido (Henderson et al., 1993) y que esa variabilidad podría tener bases genéticas (Sliwinska-Kowalska & Pawelczyk, 2013). La identificación de los genes y las mutaciones que confieren tales fenotipos podría aportar nuevas evidencias sobre los mecanismos moleculares que median en la pérdida de audición por efecto de la exposición a ruido, también conocida como trauma acústico. Al mismo tiempo, la determinación de los mecanismos moleculares que participan de tales procesos resulta esencial para el desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas para la prevención y el tratamiento de estas patologías.

Pérdida auditiva por exposición a ruidos intensos

El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene laboral de Estados Unidos determina que 85 dB SPL es el nivel máximo de intensidad sonora al que se puede estar sometido durante una jornada

laboral (8 horas) para evitar daños al sistema auditivo. Se recomienda que si las intensidades sonoras son superiores, se debe reducir el tiempo de exposición para evitar efectos perjudiciales. Según la Organización Mundial de la Salud, en varias ciudades del mundo la población se encuentra expuesta diariamente a niveles sonoros superiores a los límites establecidos y que esto afecta principalmente a jóvenes, adultos mayores e incluso constituye una amenaza para los animales, alterando las comunicaciones y el comportamiento de varias especies, incluyendo aves, insectos y anfibios. Debido a ello es que en los últimos años se ha prestado particular interés en estudiar las consecuencias de la sobreestimulación acústica.

Las consecuencias de los efectos de la sobreestimulación acústica dependen de la intensidad del estímulo sonoro y del tiempo de exposición (Spoendlin, 1971). La forma más frecuente de evaluar sus efectos fisiológicos ha sido a través de la implementación de evaluaciones funcionales de la sensibilidad auditiva mediante ABRs (respuestas auditivas del tronco cerebral), DPOAEs (productos de distorsión otoacústicos) y otras pruebas audiométricas. En base a ello, se postularon dos categorías según el efecto producido por la exposición al ruido: aquel que produce una elevación permanente en los umbrales (PTS, por sus siglas en inglés) y el que produce una elevación transitoria de umbrales (TTS, por sus siglas en inglés). Las PTS se asocian a exposiciones intensas y/o prolongadas y se destacan por la muerte de las células ciliadas y la degeneración de NGEs de tipo I (Spoendlin, 1985; Nordmann et al., 2000). La elevación en los umbrales auditivos es permanente debido a que las células ciliadas de los mamíferos –a diferencia del resto de los tetrápodos– no tienen capacidad de regeneración (Edge & Chen, 2008). En este contexto, las CCEs suelen ser más susceptibles a morir que las CCI (Saunders et al., 1991). Sumado a su mayor susceptibilidad, se ha descripto que estas células muestran signos de agotamiento metabólico y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ante la exposición a sonidos intensos (Lynch et al., 2004; Kamogashira et al., 2015). En paralelo, se ha observado que inmediatamente después del trauma acústico se produce un incremento en los niveles de Ca^{2+} libre en las CCEs (Fridberger et al., 1998) y la activación de la calcineurina que podrían desencadenar un proceso apoptótico en ausencia de acumulación de ROS (Minami et al., 2004). Además, se ha demostrado que la exposición a ruido tiene la capacidad de provocar alteraciones sobre las NGEs de tipo I que inervan a las CCI, entre las que se destaca el hinchamiento de las dendritas aferentes que contactan a las CCI (Spoendlin, 1971; Robertson, 1983). Se piensa que este fenómeno responde a algún tipo de mecanismo excitotóxico inducido por la liberación de glutamato durante la exposición a ruido (Pujol et al., 1993; Pujol & Puel, 1999), puesto que la aplicación de agonistas de receptores de AMPA en cócleas de animales intactos fue capaz de recapitular el fenotipo, mientras

que el uso de antagonistas previno la aparición de ese signo (Puel et al., 1995; Ruel et al., 2007). Las TTS, por su parte, fueron durante mucho tiempo asociadas a exposiciones de menor intensidad o duración, caracterizadas por la aparición de signos de daño estructural y disfunción de los estereocilios, pero sin ningún compromiso de la viabilidad de las células ciliadas y de las neuronas aferentes (Liberman & Dodds, 1984; Nordmann et al., 2000; Schneider et al., 2002). Si bien se ha descrito que en un contexto de TTS podían encontrarse signos de hinchamiento en las dendritas de las NGEs de tipo I, se encontró que seguidamente tenía lugar una rápida restauración de la ultraestructura de los contactos sinápticos cocleares, lo que durante mucho tiempo sugirió que los terminales aferentes afectados podían recuperarse o regenerarse (Puel et al., 1998). Sin embargo, trabajos más recientes han comenzado a señalar que la exposición a un trauma capaz de desencadenar TTS puede llegar a tener efectos permanentes sobre la transducción de los estímulos sonoros (Kujawa & Liberman, 2009; Furman et al., 2013; Jensen et al., 2015; Liberman & Liberman, 2015; Valero et al., 2017). Por ejemplo, en el trabajo de Kujawa (2009), 2 semanas post exposición a un ruido de 100 dB por dos horas se encontró una recuperación total de los umbrales de ABRs y DPOAEs; no obstante, a las 8 semanas post exposición las amplitudes del pico I de ABR seguían disminuidas, al igual que el número de sinapsis CCI-NGE. A partir de ello, comenzó a especularse con que la ausencia en la recuperación de las amplitudes del pico I era consecuencia de la pérdida de sinapsis CCI-NGS, fenómeno que comenzó a ser conocido también bajo el nombre de de-aferentación o sinaptopatía aferente. En paralelo, diversos reportes en humanos encontraron que pacientes con umbrales de audición normales experimentaban, a su vez, dificultades en tareas que requerían el procesamiento de estímulos auditivos en presencia de otros sonidos o un ruido de fondo (Demanez et al., 2003; Weisz et al., 2006; Hind et al., 2011; Ruggles et al., 2011). Estos déficits en el procesamiento auditivo, además, resultaron prevalentes en poblaciones no envejecidas (Ruggles et al., 2012), lo que descartó que las dificultades estuviesen asociadas al proceso de envejecimiento. Un estudio basado en datos de pacientes y modelos computacionales llevó a postular la existencia de una nueva condición conocida como pérdida de audición oculta (HHL por sus siglas en inglés, hidden hearing loss) en la que los afectados exhiben una reducción en la señal que sale de la cóclea -que puede ser compensada con una mayor ganancia en las conexiones a nivel de los núcleos centrales- sin que exista una disminución en la sensibilidad auditiva (Schaette & McAlpine, 2011). Adicionalmente, en ese mismo trabajo, la HHL ha sido propuesta como un mecanismo subyacente al desarrollo de algunas formas de acúfenos y, en conexión con ello, como una condición capaz de explicar los desórdenes observados en humanos respecto del procesamiento de tonos o palabras en ambientes ruidosos. En este marco, se ha

especulado con que la reducción en la señal enviada desde la cóclea hacia los núcleos centrales de la vía auditiva ascendente sea consecuencia de un cierto nivel de sinaptopatía aferente. Sobre tales bases clínicas fue que luego se desarrollaron diferentes investigaciones en modelos murinos abocadas a profundizar la descripción de las causas y los efectos de la de-aferentación a nivel coclear. Así, un estudio reciente en cobayos demostró que la exposición a ruido fue capaz de inducir una reducción en el tamaño de la población de NGEs con baja tasa de disparo espontánea y alto umbral de activación (Furman et al., 2013). En paralelo, un estudio más reciente en ratones encontró que la exposición a ruido era capaz de provocar un decremento en el número de sinapsis ubicadas en la porción modiolar de las CCIs (Liberman & Liberman, 2015), las cuales han sido asociadas a NGEs con baja tasa de disparo espontánea y alto umbral de activación (*Figura 4b*) (Liberman et al., 2011). Del mismo modo se desprende que las fibras de bajo umbral de activación y alta tasa de disparo espontánea son aquellas que se ven menos afectadas por efecto de la exposición a ruido, lo que explicaría la recuperación advertida en los umbrales de ABR que, por definición, señalan la intensidad mínima frente a la cual se detecta una respuesta en la vía auditiva. En suma, la información recabada en los últimos trabajos sobre el tema revela que la pérdida de algunas poblaciones sinápticas podría ser la causa subyacente a la HHL en humanos, a la vez que señala que ese cuadro clínico puede ser recapitulado en roedores luego de la exposición a ruidos intensos.

En este escenario, el efecto inhibitorio que la activación de las fibras MOC tiene sobre la amplificación coclear llevada a cabo por las CCEs (*Figura 6*) ha llevado a proponer al reflejo olivococlear como un mecanismo natural de protección del trauma acústico. Así, en experimentos con animales anestesiados se advirtió que, si durante la exposición a ruido se estimulaban eléctricamente las fibras MOC, el déficit auditivo generado era significativamente menor (Rajan, 1988; Reiter & Liberman, 1995). Seguidamente, se sucedieron numerosos experimentos basados en la remoción quirúrgica de las fibras del sistema eferente olivococlear (Reiter & Liberman, 1995; Kujawa & Liberman, 1997; Zheng et al., 1997a, 1997c). En todos ellos se verificó que los animales que no contaban con un reflejo MOC funcional resultaron más sensibles a sufrir un PTS como resultado de la estimulación con un ruido de alta intensidad. La elucidación de los mecanismos moleculares involucrados en la inhibición colinérgica de las CCEs (Elgoyhen et al., 1994, 2001; Oliver et al., 2000) motivó el desarrollo de líneas de ratones genéticamente modificados que permitieran diseccionar las contribuciones de cada uno de los componentes inhibitorios de la vía y manipular globalmente la actividad del sistema MOC. Primeramente, se generaron los ratones *knock-out* (KO α 9) (los cuales fueron usados en el Capítulo I de esta tesis), en los que se observó que la estimulación eléctrica de las

fibras MOC era incapaz de inhibir la generación de DPOAE, lo que fue tomado como evidencia de la falta de inhibición colinérgica del sistema MOC sobre las CCEs (Vetter et al., 1999). La exposición a ruido en este genotipo no demostró tener efectos significativos sobre los umbrales de audición, pero sí se observaron déficits en el procesamiento temporal de la información auditiva (Lauer & May, 2011). En cualquier caso, la exposición a ruido utilizada en ese trabajo no era controlada en términos de duración o intensidad y, posiblemente, ésta última haya sido menor a las empleadas en los trabajos mencionados en los párrafos anteriores.

Paralelamente, estudios en un sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* revelaron que una mutación puntual sobre el (L9'T) sobre el dominio transmembrana 2 de la subunidad $\alpha 9$, daban lugar al ensamblaje de receptores colinérgicos $\alpha 9\alpha 10$ caracterizados por una mayor afinidad por ACh, una menor tasa de desensibilización y un incremento en el tiempo promedio de apertura del canal (Plazas et al., 2005). El desarrollo de un ratón *knock-in* con esta mutación (KI $\alpha 9$)-animal usado en el Capítulo I de esta tesis- permitió la evaluación *in vivo* de las consecuencias fisiológicas e histológicas de la ganancia de función en el receptor colinérgico (Murthy et al., 2009b; Taranda et al., 2009). Las evidencias demuestran que, el receptor colinérgico con la mutación L9'T expresado en la cóclea de ratones, desplegaba las mismas propiedades biofísicas que los canales clonados expresados en ovocitos. Asimismo, las corrientes post-sinápticas correspondientes a $\alpha 9\alpha 10$ -SK2 resultaron de menor amplitud, pero más prolongadas en el tiempo en el KI $\alpha 9$ que en el WT, lo que sugirió una mayor transferencia de carga a la CCE (Taranda et al., 2009). Por último, se demostró que la ganancia de función en términos de las propiedades biofísicas del canal también tenía efectos en la funcionalidad del reflejo olivococlear: umbrales de audición más elevados (previo a la exposición a ruido), mayor supresión del DPOAE durante la estimulación de las fibras MOC y menor incremento en los umbrales de ABR luego de la exposición a ruido (Taranda et al., 2009). A su vez, en este mismo trabajo se mostró que tales efectos podían ser revertidos mediante la aplicación de estricnina -un bloqueante de los receptores $\alpha 9\alpha 10$ - lo que reconfirmó el rol protagónico del receptor colinérgico en esta vía de señalización.

OBJETIVOS GENERALES

- 1) Estudiar los cambios fisiológicos e histológicos derivados de la exposición a ruido durante el periodo de desarrollo en animales cuya modificación genética conduce a distintos grados de actividad del sistema olivococlear.
- 2) Estudiar las consecuencias a nivel fisiológico e histológico de la alteración farmacológica de los niveles de colesterol y el efecto de la suplementación con fitoesteroles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de los experimentos presentes en el capítulo I de esta tesis se utilizaron animales de ambos sexos provenientes de dos líneas de ratones genéticamente modificados que cuentan con diferentes niveles de actividad del sistema eferente medial olivococlear. La cepa *Chrna9* KO (KO α 9; Vetter et al., 1999) (fondo genético: FVB.129P2-Pde6bp Tyrc-ch/AntJ) no expresa la subunidad α 9 del receptor nicotínico, con lo cual es incapaz de ensamblar receptores α 9 α 10 funcionales, por lo tanto, estos animales carecen del reflejo inhibitorio que el sistema MOC ejerce sobre las CCEs durante la adultez y sobre las CCIIs durante el desarrollo. Por otro lado, la cepa *Chrna9*L9'T KI (KI α 9) (fondo genético: FVB.129P2-Pde6bp Tyrc-ch/AntJ) posee una mutación puntual en el gen de la subunidad α 9. Dicha mutación consiste en el cambio de una treonina por una leucina (L9'T) en la posición 9' del segundo dominio transmembrana de la subunidad. Se ha reportado que los receptores α 9 α 10 que contienen dicha mutación presentan un aumento en la afinidad por acetilcolina y una disminución en la tasa de desensibilización. (Plazas et al., 2005; Taranda et al., 2009). La conjunción de estos efectos da como resultado una potenciación del efecto inhibitorio del sistema eferente medial sobre la amplificación coclear (Taranda et al., 2009). Por último, se emplearon ratones con las variantes salvajes (*wild type*, WT) para el gen de la subunidad α 9 del receptor nicotínico cuyo fondo genético es idéntico al de las cepas antes mencionadas.

Para los experimentos mostrados en el capítulo II se utilizaron ratones macho C57BL/6J de dos meses y dos años de edad.

Todos los animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos, bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y libre acceso a agua y alimento.

Todos los protocolos experimentales fueron realizados de acuerdo con la Guía de Eutanasia de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA, por sus siglas en inglés) Edición 2020, y aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Tratamiento con Efavirenz y Fitoesteroles

Los tratamientos explicados en esta sección y cuyos resultados se muestran en el capítulo II de la presente tesis, fueron realizados en el laboratorio del Dr. Alejandro Soderó del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Católica Argentina.

Se utilizaron ratones macho C57BL/6J de dos meses de edad, el número total de animales fue dividido en tres grupos experimentales: Efavirenz, Efavirenz+ Fitoesteroles y Control. A continuación, se detallan cada uno de los tratamientos.

El grupo experimental 'efavirenz' recibió la droga efavirenz en el agua de bebida durante cuatro semanas en una dosis de 0,09 mg/kg/día, como se describió en trabajos anteriores (Mitroi et al., 2019; Mast et al., 2014). Las soluciones de efavirenz fueron reemplazadas cada tres días durante el total de días del tratamiento.

El grupo experimental 'efavirenz+ fitoesteroles' recibió la misma dosis de efavirenz en el agua de bebida durante cuatro semanas y además durante las últimas tres semanas recibió un suplemento extra de fitoesteroles (marca Vitatech, el principal tipo de fitosterol presente en este compuesto es el Sitostanol) incluidos en los pellets de comida estándar (Cooperación, Argentina) en una concentración 2% m/m. Esta comida estaba a disposición de los animales *ad libitum*.

El grupo experimental 'control' bebió agua y se alimentó a base de pellets de comida estándar (Cooperación, Argentina). Durante todo el tratamiento se registró el peso de los animales y no se observaron diferencias significativas en los grupos al terminar los tratamientos (Ver Anexo *Tabla 4*).

Sistema de registro y exposición

Las pruebas de fisiología auditiva, así como también la exposición al ruido, fueron realizadas en una cámara anecoica. Dicha cámara fue construida con materiales a prueba de sonido y diseñada especialmente para la tarea, logrando aislar más de 50 dB SPL. Su interior fue mantenido a una temperatura de 30°C con el objeto de contrarrestar la hipotermia que pudieran sufrir los ratones como consecuencia de la aplicación de anestésicos.

En cada caso, la estimulación auditiva fue efectuada mediante el uso de un transductor acústico de fabricación casera compuesto por dos altavoces electrostáticos CDMG15008-03 (CUI, Estados Unidos) dispuestos como fuentes de sonido y un micrófono en miniatura FG23329-P07 (Knowles, Estados Unidos) emplazado para medir la intensidad de sonido al nivel del canal auditivo del animal. Los estímulos sonoros fueron generados digitalmente y el procesamiento de las respuestas fue

llevado a cabo utilizando una consola de tipo I-O (National Instruments, Estados Unidos) dirigida desde el programa EPL Cochlear Function Test Suite, un software específico escrito en LabVIEW y otorgado por el Dr. M. Charles Liberman (EatonPeabody Laboratory, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Estados Unidos).

Exposición a ruido

En el capítulo I, ratones de P15 de las tres cepas ya mencionadas fueron expuestos bajo anestesia (ketamina 50 mg/ml (Holliday-Scott, Argentina) (100 mg/kg, i.p.) y xilazina al 2% (Laboratorios König, Argentina) (10 mg/kg i.p.)), a un ruido de 100 dB SPL, con un ancho de banda de 1 a 16 kHz, durante 1 hora.

Inmediatamente antes de someter a los animales al ruido se realizó una calibración del sistema acústico para asegurar la entrega de la intensidad de sonido correcta.

Evaluaciones de fisiología auditiva

El estudio de la fisiología auditiva de los animales fue llevado adelante mediante el testeado de los potenciales evocados del tronco cerebral (ABRs) y, complementariamente, a través del registro de los productos de distorsión de las emisiones otoacústicas (DPOAEs). Los fundamentos de dichas técnicas serán descriptos brevemente a continuación.

Los potenciales evocados del tronco cerebral (ABRs, por sus siglas en inglés “Auditory brainstem response”) son obtenidos en respuesta a estímulos auditivos. Básicamente, consiste en el registro de los potenciales de acción compuestos que se suceden a lo largo de la vía auditiva frente a la estimulación con un tono puro de un sonido de tipo “pip”. Un ABR típico consiste en cinco ondas o picos prominentes que ocurren dentro de los 10 ms posteriores a la presentación del estímulo sonoro. Se ha establecido que los diferentes picos de las ondas de ABR pueden ser asignados a diferentes partes de la vía auditiva ascendente (*Figura 9*) (Melcher et al., 1996). De este modo, la onda I corresponde a la suma de la actividad de las NGE al nivel de la cóclea, con lo cual, constituye una buena herramienta para estimar el estado de la codificación de la información auditiva a nivel periférico (Melcher et al., 1996; Kujawa & Liberman, 2009). Las ondas II, III, IV y V corresponden a la actividad sincrónica de las neuronas de la vía auditiva situadas a nivel del tallo cerebral. Acorde a una caracterización previa (Melcher et al., 1996), la onda II es generada fundamentalmente por la actividad del NC, la onda III corresponde a los disparos de neuronas en el SOC, la IV al lemnisco

lateral (LL) y la V refiere a la actividad en el CI. El uso de estímulos de intensidad creciente permite definir un umbral de audición que, a su vez, posibilita la medición de la amplitud y latencia de las ondas supraumbrales. Cabe mencionar que se ha determinado que las amplitudes y latencias de las diferentes ondas de la respuesta de ABR representan buenos estimadores del número de fibras reclutadas en cada núcleo y de la velocidad de conducción de la información sensorial, respectivamente (Buchwald & Huang, 1975; Antoli-Candela & Kiang, 1978). En suma, las pruebas de ABR proporcionan información sobre la dinámica de transmisión de los estímulos auditivos a lo largo de la vía auditiva ascendente, a la vez que permiten evaluar la integridad funcional de los núcleos centrales y periféricos que la conforman.

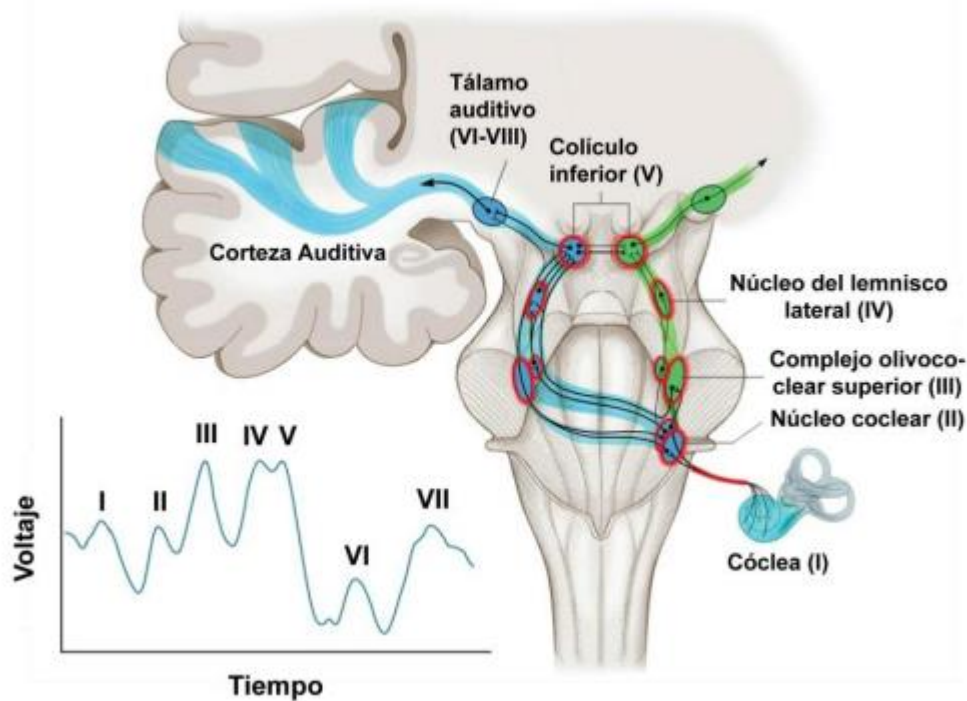


Figura 9| Vía auditiva ascendente. Esquema que muestra la contribución de los diferentes núcleos de la vía auditiva ascendente a la generación de las ondas observadas en un registro de ABR (gráfico inferior izquierdo). El número entre paréntesis que acompaña cada núcleo señala la onda a la cual contribuyen en la señal de ABR. Así, la onda I de la señal de ABR refleja la actividad en la sinapsis CCI-NGE, por lo que su estudio constituye una buena primera aproximación a la evaluación de la integridad funcional de esa sinapsis. Las ondas II a V reflejan la actividad neuronal evocada en los diferentes núcleos auditivos del tallo cerebral, mientras que las subsiguientes dan cuenta del reclutamiento neuronal a nivel del tálamo y la corteza auditiva. Esquema de ABR modificado de “Clinical Practise, 2019”.

Es importante remarcar que los registros de ABRs brindan información sobre la señal que sale de la cóclea hacia el SNC, la cual está en gran medida condicionada por la capacidad de amplificación

coclear de las CCEs. Para elucidar la contribución de las CCEs y su función de amplificador coclear a la sensibilidad auditiva global puede efectuarse, complementariamente, el registro de las emisiones de los productos de distorsión otoacústicas (DPOAEs). Los DPOAEs son sonidos de baja intensidad emitidos por la cóclea tras la estimulación simultánea con dos tonos puros de frecuencias diferentes (f_1 y f_2) pero cercanas en el espectro (Kemp, 1986). La interferencia de las dos ondas sonoras en su propagación a través de la MB genera diferentes tipos de armónicos, cuyas frecuencias resultan de combinaciones aritméticas de las frecuencias de los dos tonos originales (f_1-f_2 , $2f_1-f_2$, $2f_2-f_1$, etc.). Estos armónicos son denominados productos de distorsión y son capaces de provocar vibraciones en la región de la MB que sea específica de su frecuencia con la consecuente activación de las CCEs en esa región tonotópica. El desplazamiento de los estereocilios de las CCEs genera ondas en el fluido coclear que se retropropagan hasta alcanzar la membrana timpánica, en la cual impactan provocando vibraciones mecánicas que dan lugar a la emisión de un sonido cuya frecuencia corresponde a la del producto de distorsión. Experimentalmente, implica registrar con un micrófono en el canal auditivo externo el espectro sonoro que emerge desde la cóclea, el cual va a estar integrado por f_1 , f_2 y las otoemisiones asociadas a los diferentes productos de distorsión. Cabe recordar que, mientras los ABR proveen una descripción de la respuesta global de la cóclea que pondera las contribuciones de la mecanotransducción en las CCIs, el reclutamiento coordinado de las NGEs y la amplificación coclear de las CCEs, los DPOAEs permiten determinar únicamente la integridad funcional de las CCEs en términos de su capacidad de llevar adelante la amplificación coclear. Por este motivo es que los DPOAEs tienen la particularidad de que no se ven afectados ante la muerte de las CCIs o la pérdida de fibras aferentes (Lieberman et al., 1997; Zheng et al., 1997b). Sin embargo, la detección de umbrales de DPOAEs elevados está fuertemente vinculada a umbrales de ABRs también elevados, justamente, debido a la disfunción de las CCEs y la consecuente falla en la amplificación de la señal sonora. Así, la combinación de los resultados de ABRs y DPOAEs resulta una estrategia útil para determinar si los déficits auditivos provienen de daños generados a las CCIs, las CCEs, ambos tipos de células ciliadas, o bien a las NGEs de tipo I que transmiten la información sensorial. Esto resulta especialmente relevante en la evaluación y el diagnóstico de los diferentes tipos de pérdida de audición, independientemente de si tienen una base genética o adquirida.

Para los registros de las técnicas arriba mencionadas los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una solución compuesta por ketamina 50 mg/ml (Holliday-Scott, Argentina) (100 mg/kg, i.p.) y xilazina al 2% (Laboratorios König, Argentina) (10 mg/kg i.p.) y puestos en la cámara a prueba de sonidos descrita anteriormente.

En el capítulo I los registros de ABR y DPOAE se realizaron en tres puntos temporales luego de la exposición al trauma acústico, al día siguiente (P16), a la semana siguiente (P22) y a los dos meses (P75). En cada una de estas instancias se registraron los pesos de los animales, para controlar que no hubiera una diferencia en la ingesta de comida entre los grupos control y expuestos, en ninguno de los casos se observaron diferencias (Ver Anexo *Tabla 5*).

En el capítulo II los registros fueron realizados solo al terminar el tratamiento correspondiente según el grupo experimental.

ABRs

Para el registro de los ABRs se utilizaron electrodos de platino colocados de manera intradérmica: el primero en el vértex craneal, otro en forma dorsal y paralela a la oreja y, por último, uno de referencia inserto cerca de la cola del animal. Los estímulos consistieron en tonos puros, de polaridad alternada, de 5 ms a una razón de 33 tonos por segundo. La respuesta obtenida a través de los electrodos fue amplificada con un factor de 10.000 y filtrada con un filtro pasabanda de 0.3 a 3 kHz. Para cada frecuencia e intensidad de sonido, se promediaron 1024 respuestas. Los ABRs fueron testeados usando tonos puros de las siguientes frecuencias: 5.6, 8, 11.33, 16, 22.65, 32 y 45.2 kHz, de modo de cubrir gran parte del espectro de audición de los ratones. La *Figura 10* muestra un registro de ABR obtenido de un animal WT a P22 utilizando un tono puro de 16 kHz. En el panel de la derecha se indican las intensidades del tono - medidas en dB SPL- que fueron empleadas para evocar la respuesta neuronal –medida en microvoltios (μV). Puede observarse que para intensidades por debajo de 35 dB SPL no se detecta señal, mientras que para 40 dB SPL ya se advierten las ondas I y II. Se definió como umbral de ABR a la intensidad media entre la última intensidad que no evoca respuesta y la primera intensidad que efectivamente evoca una respuesta. Por lo tanto, en este ejemplo, el umbral para la frecuencia de 16 kHz es de 37.5 dB SPL. Se observa, además, que conforme se incrementa la intensidad del estímulo, mejora la resolución de la señal, a la vez que se produce una disminución de la latencia y un aumento de la amplitud de las ondas. Así, una vez definido el umbral, se procedió a calcular las latencias y amplitudes supraumbrales de la onda I, puesto que representan buenos estimadores del número de fibras reclutadas a nivel de la sinapsis entre las CCIs y las NGE y de la velocidad de conducción de la información auditiva, respectivamente (Buchwald & Huang, 1975; Antoli-Candela & Kiang, 1978). Dichas latencias y amplitudes siempre fueron calculadas a partir del potencial evocado a 80 dB SPL porque, tal cual se mencionó, es el que presenta mejor resolución.

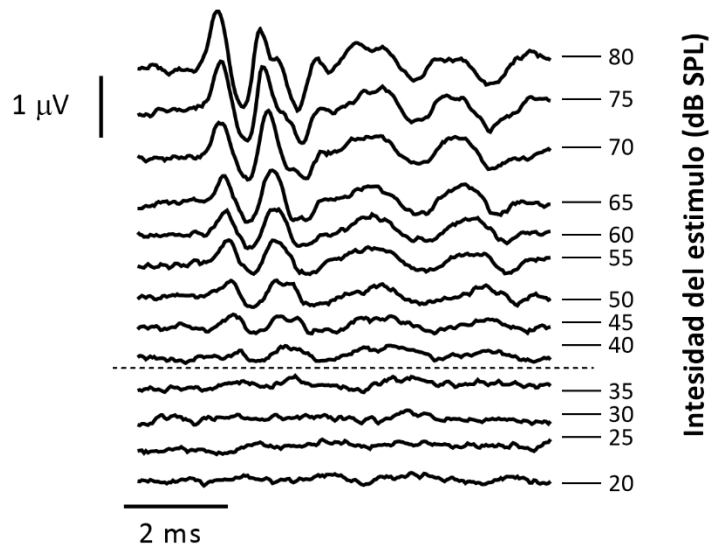


Figura 10| Registro representativo de ABR obtenido de un animal WT a P22 utilizando tonos puros de 16 kHz. Cada trazo representa los potenciales evocados obtenidos a partir de 1024 repeticiones del tono con la intensidad que se indica en el eje de la derecha. La línea punteada señala el umbral de ABR, el cual corresponde a la intensidad promedio entre el menor nivel capaz de evocar una respuesta y el ultimo nivel para el cual no se detecta señal.

DPOAEs

Tal como ya fuera mencionado anteriormente, los DPOAEs constituyen otoemisiones de baja intensidad evocadas por la aplicación de dos tonos puros y que reflejan la integridad funcional de las CCEs. Para su cuantificación se aplicaron dos tonos puros, f_1 y f_2 , con una relación de frecuencias $f_1/f_2 = 1.2$ y una diferencia de 10 dB SPL en la intensidad de ambos. Se efectuó un barrido de intensidades para ambos tonos, de a 5 dB SPL por paso y hasta llegar a un máximo de 80 dB SPL. Los DPOAEs emitidos como resultado de esta estimulación fueron captados mediante el micrófono presente en el transductor, amplificados y digitalizados. Finalmente, a través de la aplicación de una transformada de Fourier se obtuvo el espectro de emisión de DPOAEs para las distintas frecuencias e intensidades. Si bien los productos de distorsión se producen a varias frecuencias, la de mayor amplitud y la más utilizada es el producto de distorsión cúbico $2f_1 - f_2$. En la *Figura 11* se grafica la intensidad del producto de distorsión $2f_1 - f_2$ respecto de la intensidad del tono correspondiente a la f_2 . Además, se grafica la intensidad del nivel basal de ruido medido por el micrófono para cada intensidad de estímulo. Se definió como umbral al valor de intensidad de f_2 a partir del cual la relación señal/ruido fue mayor a 1, y en el que además se cumplió que para intensidades de f_2 mayores, el cociente continúa siendo mayor a 1. Por ejemplo, para la *Figura 11*, el umbral de detección de DPOAE es de 25 dB para una f_2 de 16 kHz.

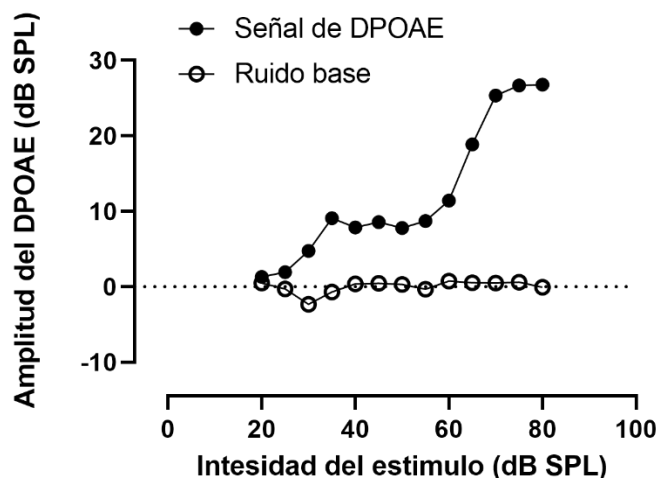


Figura 11 | Registro de la amplitud de DPOAE en función de la intensidad de un tono f_2 de 16 kHz en un ratón de P22. Los círculos negros muestran el sonido captado por el micrófono que corresponde a la señal de DPOAE, mientras que los círculos blancos señalan el nivel de ruido de base existente en la cámara a prueba de sonidos durante la medición. Para este registro ejemplo podemos considerar el umbral de detección en 25 dB SPL, ya que desde esa intensidad en adelante la amplitud de la emisión es siempre superior al ruido.

Inmunofluorescencia

Luego de haber completado las mediciones de fisiología auditiva en los animales WT, KO α 9 y Kl α 9 los mismos fueron sacrificados. Lo mismo fue realizado en el capítulo II con los animales de dos meses de los tres grupos experimentales (control, efavirenz y efavirenz+ fitoesteroides) y los animales de dos años de edad. Primeramente, se obtuvieron los huesos temporales de los ratones y seguidamente se disecaron las cócleas, las cuales fueron inmediatamente perfundidas a través de la ventana redonda con una solución de paraformaldehído (PFA; Sigma, Estados Unidos) al 4% en buffer fosfato salino (PBS) para ser luego incubadas en la misma solución durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las cócleas fueron incubadas en una solución de EDTA 0.12 M por 2 o 3 días para favorecer la decalcificación del hueso que recubre el epitelio sensorial. Finalmente, se procedió a la disección fina de la cóclea para la extracción del órgano de Corti entero y la remoción de la membrana tectorial.

En el capítulo I para los conteos del número de sinapsis en cinta por CCI, en primer lugar, se procedió a separar al órgano de Corti en sus porciones apical, medial y basal y se las permeabilizó mediante el congelado de las muestras por 2 horas a -80 °C en una solución de sacarosa al 30% (Anedra, Argentina). Luego, los tejidos fueron incubados, por 1 hora a temperatura ambiente, en una solución de bloqueo la cual contenía 5% de suero normal de cabra y 1% de Triton X-100 en PBS. Posteriormente, las secciones de cóclea fueron incubadas a 37°C, en agitación en cámara húmeda y durante toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios que fueron agregados a la solución de bloqueo: (1) anti-CtBP2 IgG1 hecho en ratón, 1:200 (BD Biosciences, Estados Unidos), (2) anti-GluA2 IgG2a hecho en ratón, 1:2000 (Millipore, Estados Unidos), (3) anti-Myosin VIIa hecho en conejo, 1:700

(Santa Cruz, Estados Unidos). Dado que CtBP2 y Ribeye constituyen diferentes variantes transcripcionales de un mismo gen, comparten numerosos dominios estructurales y, por lo tanto, los anticuerpos que reconocen a CtBP2 permiten detectar a Ribeye en las sinapsis en cinta (Piatigorsky, 2001). A su vez, como CtBP2 es un represor transcripcional que está continuamente presente en el núcleo de las células, la marcación contra CtBP2 en la cóclea suele revelar los cuerpos sinápticos de las células ciliadas, además de una débil marca a nivel nuclear (Kujawa & Liberman, 2009). El segundo anticuerpo está direccionado contra la subunidad 2 del receptor glutamatérgico de tipo AMPA, lo que permite revelar los receptores postsinápticos de glutamato presentes en las NGE. El anticuerpo número tres nos permite identificar el cuerpo de las células ciliadas internas ya que se une a las fibras de miosina que constituyen el citoesqueleto de la misma. Finalizada la incubación con los anticuerpos primarios se realizaron 4 lavados en una solución de PBS Tritón 1% durante 1 hora y luego se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos: (1) anti ratón IgG1AlexaFluor 568, (2) anti ratón IgG2a AlexaFluor 488, y (3) anti conejo AlexaFluor 647 (Life Technologies, Estados Unidos). Dichos anticuerpos fueron diluidos 1:500 en la solución de bloqueo, y la incubación se realizó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, luego de 4 lavados en PBS durante 1 hora, las secciones de cóclea fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje FluorSave (Millipore, Estados Unidos).

Por último, para el capítulo II se disecaron las cócleas de todos los animales y se las subdividió para la realización de distintas tinciones que se describen a continuación.

Tinción de Filipina y Faloidina: El epitelio sensorial fue aislado, lavado dos veces con PBS 1X y se realizó la fijación del tejido con PFA 4% durante 30 minutos. Luego el tejido fue incubado durante 60 minutos en oscuridad en una solución diluida en PBS 1X de filipina 125 µg/ml (molécula fluorescente) y faloidina conjugada con AlexaFluo 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA; 1:20). La filipina es un antibiótico fluorescente que se une al colesterol, pero no a esteroides esterificados, por lo tanto, es un buen método para detectar colesterol libre en membranas celulares, dicha molécula debe ser excitada con una longitud de onda de unos 360 nm y su emisión se da alrededor de los 480 nm (Maxfield & Wüstner, 2012). Por otro lado, la faloidina es una molécula que se une a los filamentos de actina por lo que resulta un muy buen marcador de los estereocilios de las células sensoriales. Terminada la incubación las secciones de órgano fueron lavadas con PBS 1X y montadas en los portaobjetos con medio de montaje FluorSave.

Tinción de CYP46A1 y Calretinina: Las secciones de órgano de Corti fueron incubadas en una solución de bloqueo la cual contenía 5% de suero normal de cabra y 1% de Triton X-100 en PBS. Seguidamente, se las incubó con los anticuerpos primarios (diluidos en la mencionada solución de bloqueo a 4°C por 16 horas. Los anticuerpos primarios fueron: (1) anti-CYP46A1 hecho en conejo, 1:400 (Proteintech #12486-1-AP) y (2) anti-calretinina hecho en ratón, 1:1000 (Millipore, Billerica, MA; MAB1568). El anticuerpo número uno está direccionado a la enzima Colesterol 24-Hidroxilasa, la cual es la principal responsable de la degradación del colesterol en cerebro. El segundo anticuerpo es un marcador de células ciliadas permitiéndonos identificar la posición de las CCI y CCEs. Finalizada la incubación con los anticuerpos primarios, se procedió a la incubación durante dos horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo: (1) anti-conejo AlexaFluo 488, 1:1000, (2) anti-ratón AlexaFluo 568, 1:1000 (Invitrogen). Finalmente, el tejido fue lavado durante 1 hora y montado en portaobjetos con medio de montaje FluoSave.

Tinción de Prestina y Calretinina: Las secciones de órgano de Corti fueron incubadas en una solución de bloqueo la cual contenía 5% de suero normal de burro y 1% de Triton X-100 en PBS. Los anticuerpos primarios utilizados aquí fueron: (1) anti-prestina hecho en cabra, 1:700 (Santa Cruz Biotechnology Inc. sc22692) y (2) anti-calretinina hecho en ratón, 1:1000 (Millipore, Billerica, MA; MAB1568). En este caso el anticuerpo número uno está dirigido a la proteína prestina presente en la membrana basolateral de las CCEs, responsable de la actividad electromótil de las mismas. Mientras que el anticuerpo número dos está dirigido a la marcación de células ciliadas. La incubación con los anticuerpos secundarios fue igual a la previamente descrita utilizando el mismo anticuerpo secundario para revelar calretinina y (1) anti-cabra AlexaFluo488, 1:1000 para revelar prestina. El lavado y montaje fue igual a como ya se describió.

Análisis cuantitativo de las imágenes de microscopía

Todos los análisis y cuantificaciones mostradas en los capítulos I y II fueron realizados a partir de z-stacks obtenidos en un microscopio confocal Leica TCS SPE (Leica, Alemania) de las diferentes regiones cocleares. Los z-stacks fueron adquiridos con un objetivo de inmersión en aceite de 63X y 1.4 de apertura numérica, usando un *zoom* digital de 1.5 y con un espaciamiento en el eje z de 0.3 μm . Los z-stacks fueron luego importados al software de procesamiento de análisis Fiji (Schindelin et al., 2012), y allí se realizaron los respectivos análisis que se describirán a continuación.

En el capítulo I se realizó la cuantificación de sinapsis en las CCI, las cuales fueron reconocidas a través de marcación con Myosin VII. Usualmente, cada z-stack comprendió de 10 a 20 células. Para automatizar la cuantificación del número de sinapsis, se utilizó un plugin en Fiji capaz de registrar el número de marcas presinápticas, postsinápticas y el número de elementos colocalizados por célula. En particular, se generaron proyecciones de máxima intensidad de cada canal, a partir de las cuales se generó una composición de ellas que fue usada para delimitar el contorno de las regiones de interés (ROIs) correspondientes a cada CCI. En paralelo, las máximas proyecciones de cada canal fueron multiplicadas para generar una nueva imagen de 32 bits con la información de los dos canales. Por último, las máximas proyecciones de cada canal y la imagen resultante de la multiplicación fueron segmentadas manualmente y se efectuó el conteo automático del número de partículas en cada ROI. Además, con las imágenes obtenidas se realizaron mediciones volumétricas, de los diferentes elementos pre y postsinápticos. Dado que el volumen de los elementos participantes en una sinapsis posee un orden de magnitud cercano al límite de resolución del microscopio confocal utilizado, para evitar sobre o subestimaciones se realizó una deconvolución de cada una de las imágenes tomadas. Utilizamos el plugin *DeconvolutionLab2* (Sage et al., 2017) y el algoritmo Richardson-Lucy, el cual ya había sido utilizado para el procesamiento de *whole mounts* de cócleas (Boero & Castagna et al., 2020). Para la deconvolución correcta de cada imagen se separaron los canales, y se utilizó el PSF (del inglés point spread function) correspondiente a cada canal obtenido en nuestro microscopio utilizando el objetivo de 63x.

Una vez realizada la deconvolución los z-stacks fueron cargados en Fiji y mediante el uso del plugin “3D Object Counter” se efectuó una segmentación tridimensional del stack que permitió la individualización de los objetos. Numerosos trabajos previos en la sinapsis CCI-NGE (Lieberman et al., 2011; Gilels et al., 2013; Paquette et al., 2016) encontraron que el volumen de los elementos sinápticos oscila en un rango entre $0.05 \mu m^3$ y $5 \mu m^3$. De este modo, al momento de llevar a cabo la segmentación de los z-stacks, se eligió un rango de partículas admitidas de 20 a 2000 voxels, con un tamaño de voxel de $0.11 \mu m \times 0.11 \mu m \times 0.2 \mu m$. Una vez individualizadas las partículas de interés en cada canal (CtBP2 y GluA2), se procedió a cuantificar el volumen de los elementos sinápticos colocalizados a través del plugin 3D ROI Manager (Ollion et al., 2013). Todos los volúmenes cuantificados fueron controlados con las imágenes originales para verificar que los valores reportados tuvieran coherencia con los límites de resolución del instrumento luego de la segmentación.

En el capítulo II a partir de los z-stacks obtenidos del microscopio confocal se realizó la cuantificación de CYP46A1, filipina y prestina. Se generaron las máximas proyecciones usando la

sumatoria de intensidades de cada stack. La cuantificación de CYP46A1 se realizó en las CCI, CCEs y células de soporte de animales jóvenes y envejecidos. Para ello, se delimitó con un ROI cada una de las células de los distintos tipos y se midió la intensidad media de fluorescencia que presentaba. La medición de filipina se realizó en los mismos tipos celulares, en los mismos animales y a su vez en los animales sometidos a los tratamientos con efavirenz y fitoesteroides descritos anteriormente. La herramienta elegida para su cuantificación fue el trazado de una línea recta a lo largo de una o dos células consecutivas (en los tres tipos celulares) y se midió la intensidad de cada uno de los píxeles que conformaban esa recta. Para los análisis se utilizó tanto la medida de intensidad absoluta como una relativizada al mayor valor detectado. Por último, la cuantificación de prestina solo fue realizada en las CCE ya que es el único tipo celular que cuenta con la expresión de dicha proteína. El método utilizado fue similar al anterior, se trazó una línea recta a lo largo de cada una de las células y se midió la intensidad de fluorescencia píxel a píxel.

Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos fueron analizados en el software estadístico R y en GraphPad Prism. La prueba de Shapiro-Wilks fue empleada para evaluar, primeramente, el ajuste de los datos a una distribución normal. En todos los casos, se consideró la existencia de diferencias significativas al obtener un valor $p < 0.05$.

En los casos donde los datos no seguían una distribución normal, se utilizaron las siguientes pruebas de acuerdo con la independencia o no de los mismos. Para comparaciones entre tres grupos no independientes se hizo uso de la Prueba de Friedman, seguida de un contraste a posteriori específico (Pohlert, 2014). Para los datos obtenidos de grupos independientes la prueba de Kruskal-Wallis seguida de múltiples contrastes según el método de Dunn fue la herramienta seleccionada. Para las comparaciones entre dos grupos se usó la prueba de Mann-Whitney.

En cambio, si los datos seguían una distribución normal las pruebas utilizadas fueron ANOVA de un factor seguidamente de una prueba de Holm-Sidak para las comparaciones de tres grupos o un t- test para las comparaciones entre dos grupos.

Capítulo I. Estudio de los efectos de la exposición a ruidos intensos durante el periodo crítico de desarrollo del sistema auditivo

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el cambio en la sensibilidad auditiva luego del trauma acústico a edades tempranas.
- Analizar los cambios a nivel sináptico sobre las células ciliadas internas luego de la exposición a ruido.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del sistema auditivo en humanos comienza entre la tercera y sexta semana de gestación, ya para la semana 25 los aspectos estructurales necesarios para la audición están desarrollados y el feto puede empezar a percibir sonidos de bajas frecuencias. Los aspectos neuro sensitivos demoran un poco más en desarrollarse y recién en la semana 28 se pueden generar potenciales evocados en el tallo cerebral ante estímulos de frecuencias entre 250 y 500 Hz, mientras que frecuencias más altas recién comienzan a ser procesadas a las 33 semanas de gestación (Zimmerman & Lahav, 2013). El desarrollo del sistema auditivo continúa luego del nacimiento con la diferenciación neuronal y el proceso de mielinización, por lo que el curso de este proceso se ve alterado si se produce el nacimiento antes de término y el bebé debe ingresar a la unidad de cuidados intensivos (UCI). Las estadísticas sostienen que los bebés admitidos a las unidades de cuidados intensivos son 10 veces más propensos a presentar problemas sensoriales e incluso pérdida auditiva (Davis et al., 1992). En primer lugar, la experiencia de percibir sonidos transmitidos en medios acuosos como se da en el vientre materno es muy distinta a la de percibirlos vía aire como ocurre luego del nacimiento. En segundo lugar, los tipos de sonidos y sus intensidades en las salas de cuidado intensivo son muy distintos a los percibidos dentro del útero, lo cual expone a los prematuros a sonidos que no están listos para procesar aún. Las fuentes de sonido que podemos encontrar en las UCI provienen de respiradores, teléfonos, intercomunicadores, alarmas, puertas y conversaciones. En 1997 la Academia Americana de Pediatría estableció que los niveles de intensidad sonora no deberían superar los 45 dB

SPL (American Academy of Pediatrics, 1997). Sin embargo, se ha reportado que en algunas de estas salas los niveles de ruido promedio se encuentran entre los 55 y 67 dB SPL con picos de entre 75 y 120 dB SPL (Kent et al., 2002). Mas aún, registros realizados con pequeños micrófonos colocados en el espacio entre la nariz y el oído de bebés con asistencia respiratoria mecánica arrojó valores de entre 53 y 57 dB SPL, intensidades considerablemente superiores a lo establecido por las normativas vigentes (Surenthiran et al., 2003). Esto representa un riesgo para los bebés prematuros ya que sus habilidades auto regulatorias están disminuidas y son vulnerables a los sonidos intensos dada su inhabilidad de filtrar y procesar estímulos nocivos (Zahr et al., 1995). Algunos estudios observacionales realizados sobre niños que nacieron prematuros y tuvieron una prolongada estadía en hospitales mostraron alteraciones en los ciclos de sueño, en la frecuencia respiratoria, y una baja en la saturación de oxígeno en comparación con bebés nacidos a término (Wachman et al., 2010). Sin embargo, no hay estudios investigando directamente los efectos del ruido de las UCI sobre la audición de los bebés prematuros, la información que existe sobre los efectos de la exposición temprana a ruido proviene de escasos trabajos en modelos animales. Si bien es muy difícil hacer una comparación exacta entre el desarrollo de roedores y humanos, se considera que animales de P10 a P14 constituyen una buena aproximación de la semana 28 a 42 de gestación humana (Shi et al., 2015). Por tal motivo, la utilización de mamíferos altriciales durante las primeras dos semanas postnatales nos brinda una ventana temporal accesible para compararlo con el desarrollo de un bebé nacido antes de término. Si bien no se cuenta con un gran número de antecedentes que profundicen en estas problemáticas, dentro de los trabajos ya publicados se ha visto que en ratas (P7) la exposición continua a ambientes ruidosos durante el período de desarrollo puede generar un retraso en el desarrollo y organización tonotópica de la corteza auditiva primaria (Chang et al., 2003). Además, la exposición aguda al ruido (por ejemplo, 8 minutos a 125 dB SPL) en ratas más maduras (P14) se ha asociado con una disminución en la capacidad para detectar intervalos de ausencia del estímulo sonoro en presencia de ruido de fondo, una mayor probabilidad de desarrollar acúfenos y un retraso en la maduración de las neuronas que codifican para altas frecuencias en el CI (Rybalko et al., 2019) (Grécová et al., 2009). Las implicancias de la exposición al ruido a nivel sináptico resultan en la degeneración de las sinapsis aferentes, fenómeno conocido como sinaptopatía coclear. Las conexiones aferentes entre las NGE y las CCI son las estructuras más sensibles al daño por exposición a ruidos intensos y, si bien hay un porcentaje de regeneración de sinapsis, algunas se pierden de manera irreversible (Wu et al., 2024). Se ha reportado que existe una sensibilidad diferencial entre las NGE ante la exposición a ruidos: las neuronas de baja tasa de disparo espontáneo, que se ubican en la región modiolar de las CCI, son

más sensibles a degeneración (Furman et al., 2013). A su vez, evidencias recientes sugieren que las CCI se subdividen en dos grupos, tipo A y tipo B, dependiendo el ángulo de inclinación con respecto a la lámina reticular (Lu et al., 2024). Mientras que las células de tipo A presentan el gradiente canónicamente establecido de sinapsis en cinta: más grandes en el lado modiolar y más pequeñas en el lado pilar; las de tipo B presentarían predominantemente sinapsis en cinta de mayor tamaño exclusivamente situadas en la región pilar. Al analizar la sensibilidad al trauma de estas sinapsis se encontró que las presinapsis modiolares de las células de tipo A y las pilares, de tipo B, eran las más susceptibles a perderse mientras que las sinapsis pilares del primer tipo celular parecerían aumentar su tamaño luego del trauma en respuesta a algún tipo de mecanismo compensatorio (Lu et al., 2024).

Aunque la mayoría de los estudios de pérdida de la audición asociada a la exposición a ruidos intensos se han centrado en animales adultos, unos pocos trabajos sugieren que el órgano sensorial es particularmente más susceptible a diversos factores ototóxicos, incluido el trauma acústico, durante su desarrollo (Tao et al., 2015; Saunders et al., 1982). Se ha observado que tras la exposición temprana a niveles sonoros elevados (ratones de P10 expuestos a 105 dB SPL durante dos horas), se produce una pérdida de conexiones sinápticas en las CCI a lo largo de toda la cóclea hasta ocho semanas después de la exposición. Esto coincide con una reducción en la amplitud del potencial de acción evocado en respuesta a estímulos sonoros de tipo click (Shi et al., 2015). También se ha observado una pérdida de CCEs como resultado de la exposición al ruido en conejillos de indias de una semana de edad, después de siete días en una incubadora a 90 dB SPL (Douek et al., 1976). Sin embargo, en ninguno de los trabajos mencionados se encontraron elevación de umbrales auditivos permanentes, solo en algunos casos elevaciones transitorias que se recuperaban luego de algunas semanas (Rybalko et al., 2019).

Si nos centramos en el rol del sistema eferente, contamos con antecedentes de trabajos realizados por nuestro grupo en animales adultos. El mismo protocolo de exposición a ruido utilizado en esta tesis fue realizado sobre animales WT, KO α 9 y KI α 9 de 21 días de edad (Boero et al., 2018). Dichos experimentos mostraron que los umbrales auditivos de los animales WT y KO α 9 se elevan al día siguiente post-trauma y luego de siete días los animales con un sistema eferente WT restituyen sus umbrales a los niveles preexposición mientras que los umbrales de los que carecen de inhibición MOC permanecen elevados. Sin embargo, no observamos elevación de umbrales en ratones KI α 9, demostrando que los animales con una potenciación del sistema MOC presentaban una protección contra la sobreexposición a ruidos intensos. También se observó en los animales WT y KO α 9 una pérdida permanente del número de sinapsis CCI-NGE a los siete días de la exposición a ruidos intensos.

Sorprendentemente, en los animales $KI\alpha 9$ con una actividad potenciada del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ se vio un incremento en el número de sinapsis aferentes luego del trauma acústico (Boero et al., 2018).

Contando con todos estos antecedentes, nos dispusimos a evaluar por primera vez los efectos del trauma acústico temprano a nivel de la sensibilidad auditiva a largo plazo en animales con distintos niveles de actividad MOC durante el periodo crítico del desarrollo.

RESULTADOS

Caracterización de la capacidad auditiva a edades tempranas

Como se ha explicado anteriormente, los mamíferos altriciales nacen sin la capacidad auditiva y la terminan de desarrollar en las primeras semanas postnatal. Durante el período crítico, antes del comienzo de la audición, las CCIs inmaduras disparan potenciales de acción que causan la liberación de neurotransmisor (Beutner & Moser, 2001; Glowatzki & Fuchs, 2002; Johnson et al., 2005). Esta actividad está modulada por el sistema MOC, cuyos terminales establecen conexiones sinápticas directas con la base de las CCIs, que desaparecen luego del comienzo de la audición (Katz et al., 2004; Morley & Simmons, 2002). Por lo tanto, es importante estudiar en detalle cómo se ve afectado el desarrollo postnatal de las respuestas auditivas en las cepas de ratones con las que contamos en nuestro laboratorio con distintos niveles de actividad MOC. En primera instancia, nos propusimos establecer en qué momento del desarrollo postnatal estos animales tienen la capacidad de detectar estímulos sonoros y cuán largo es el periodo de establecimiento de los umbrales definitivos de un animal maduro. Para ello, se registraron los ABRs y los DPOAEs de animales WT, $KO\alpha 9$ y $KI\alpha 9$, en distintos momentos del desarrollo: de P12 a P16 diariamente, a P22 y por último a P75. Los ABRs constituyen una aproximación objetiva no invasiva para construir audiogramas a partir de la respuesta global de la vía auditiva a un estímulo sonoro (Hecox & Galambos, 1974). Estas mediciones a lo largo de los días del desarrollo de un animal nos permiten conocer en qué momento se comienzan a detectar señales auditivas. A partir de los umbrales obtenidos de los registros de cada animal a lo largo del periodo crítico postnatal se construyeron los gráficos mostrados en la *Figura 12*.

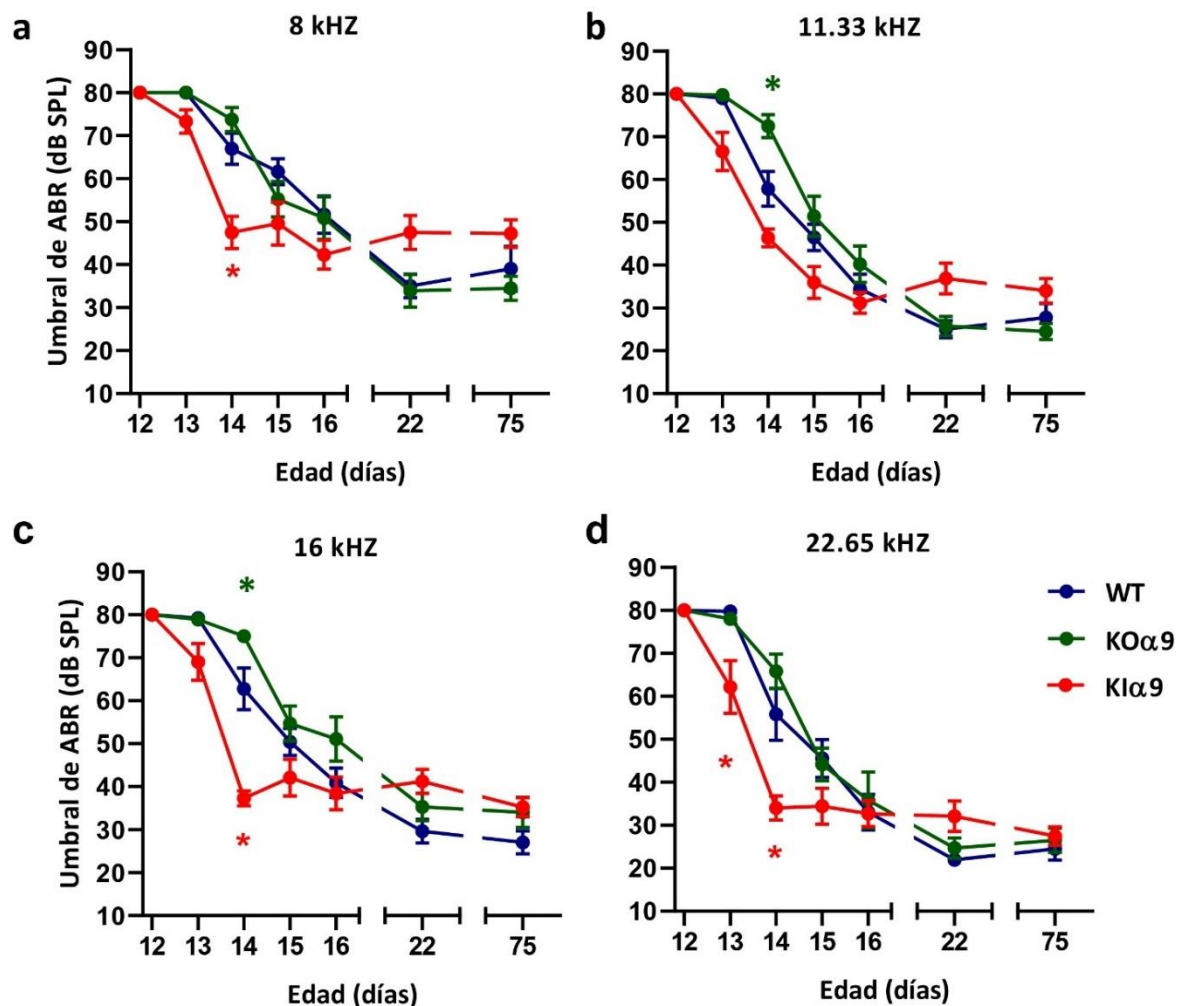


Figura 12 | Umbral de ABR a distintas edades, correspondientes a distintos momentos del desarrollo del sistema auditivo. Se presentan los umbrales de ABRs obtenidos a partir de la estimulación con tonos puros a 8 kHz (**a**), 11.33 kHz (**b**), 16 kHz (**c**) y 22.65 kHz (**d**) en animales de 12, 13, 14, 15, 16, 22 y 75 días de edad. WT: $N_{P12}=N_{P13}=N_{P14}=7$ animales, $N_{P15}=26$ animales, $N_{P16}=N_{P22}=N_{P75}=12$ animales; $KI\alpha9$: $N_{P12}=N_{P13}=N_{P14}=9$ animales, $N_{P15}=22$ animales, $N_{P16}=N_{P22}=N_{P75}=14$ animales y $KO\alpha9$ $N_{P12}=N_{P13}=N_{P14}=8$ animales, $N_{P15}=24$ animales, $N_{P16}=N_{P22}=N_{P75}=14$ animales. Cada punto representa la media $\pm$ SEM. Los asteriscos rojos indican diferencias entre el grupo $KI\alpha9$ y el grupo WT, mientras que los verdes indican diferencias entre $KO\alpha9$ y el grupo WT. Análisis estadístico: Kruskal-Wallis, seguido de un post hoc Dunn test, $*p<0.05$.

A P12 no se registran respuestas auditivas de ABR en ninguno de los tres genotipos. Sin embargo, con el correr de los días, los umbrales de ABR de los tres genotipos disminuyen para todas las frecuencias. Recién en el día 14 los animales WT presentan umbrales auditivos medibles a intensidades superiores a los 50 dB SPL como puede observarse en los trazos azules de la *Figura 12*. En los días subsiguientes los umbrales siguen disminuyendo hasta el día 22 donde alcanzan umbrales de entre 25 y 30 dB SPL.

Dichos valores no se modifican en los meses posteriores (hasta P75), por lo que podemos concluir que a P22 se alcanzó el umbral auditivo correspondiente a la madurez.

En los ratones $Kl\alpha 9$, con una actividad colinérgica del sistema MOC potenciada, ya a los 13 días de edad muestran una respuesta auditiva, con umbrales de entre 60 y 70 dB SPL, como puede observarse en los trazos rojos de la *Figura 12*. Al día siguiente (P14), los umbrales de ABR que se observaron a las frecuencias de 8, 16 y 22.65 kHz son significativamente menores en el grupo $Kl\alpha 9$ en comparación a los otros dos grupos, lo mismo sucede a P15 para la última frecuencia mencionada (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). En este grupo, los umbrales parecen establecerse definitivamente a P22, ya que a partir de esa edad no vemos diferencia en los umbrales hasta P75. Cabe destacar que en los registros realizados a P22 y P75 los umbrales de los animales $Kl\alpha 9$ son superiores, aunque no significativos, en comparación a los otros grupos y esto es debido a la supresión que el sistema eferente realiza sobre las CCEs, inhibiendo la amplificación coclear que ellas generan. Estos resultados indican que los animales $Kl\alpha 9$, con una potenciación del sistema MOC, muestran un desarrollo temprano de las respuestas auditivas, en comparación con los otros dos genotipos. Por el contrario, los animales $KO\alpha 9$ exhiben umbrales detectables a los 14 días postnatales, dichos umbrales para las frecuencias de 11.33 y 16 kHz fueron significativamente más elevados que los de los otros dos grupos como puede observarse en los trazos verdes de la *Figura 12* (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). Estos resultados sugieren un ligero retraso en el desarrollo auditivo en los ratones que carecen de un nAChR $\alpha 9\alpha 10$ funcional. Luego, los umbrales de ABR en el ratón $KO\alpha 9$ continúan descendiendo hasta alcanzar un estado de madurez en P22, con umbrales de entre 20 y 30 dB SPL. Basándonos en los hallazgos obtenidos, que revelan una maduración diferencial de los umbrales auditivos en animales con diferentes niveles de actividad del nAChR $\alpha 9\alpha 10$, observamos que a la edad de P15, los tres genotipos son capaces de responder a estímulos de mediana intensidad. Sin embargo, a P15 el sistema aún no ha alcanzado su plena madurez, ya que los umbrales auditivos continúan disminuyendo hasta llegar a la edad de P22, momento en el que se alcanzaron los umbrales característicos del periodo adulto (ver *Figura 12*). Dichos umbrales no se modificaron en los dos meses posteriores (P75) (Friedman test, $p > 0.05$).

Como se explicó previamente, el umbral auditivo es solo uno de los parámetros que podemos obtener a partir de los registros de ABR. Otro de ellos, es la amplitud de las respectivas ondas de ABR, lo cual nos da una idea de la cantidad de neuronas reclutadas en cada uno de los relevos ante la llegada del estímulo sonoro. En la *Figura 13* se grafica la evolución de la amplitud de la primera onda de los registros de ABR a una intensidad de 80 dB SPL para cuatro frecuencias distintas.

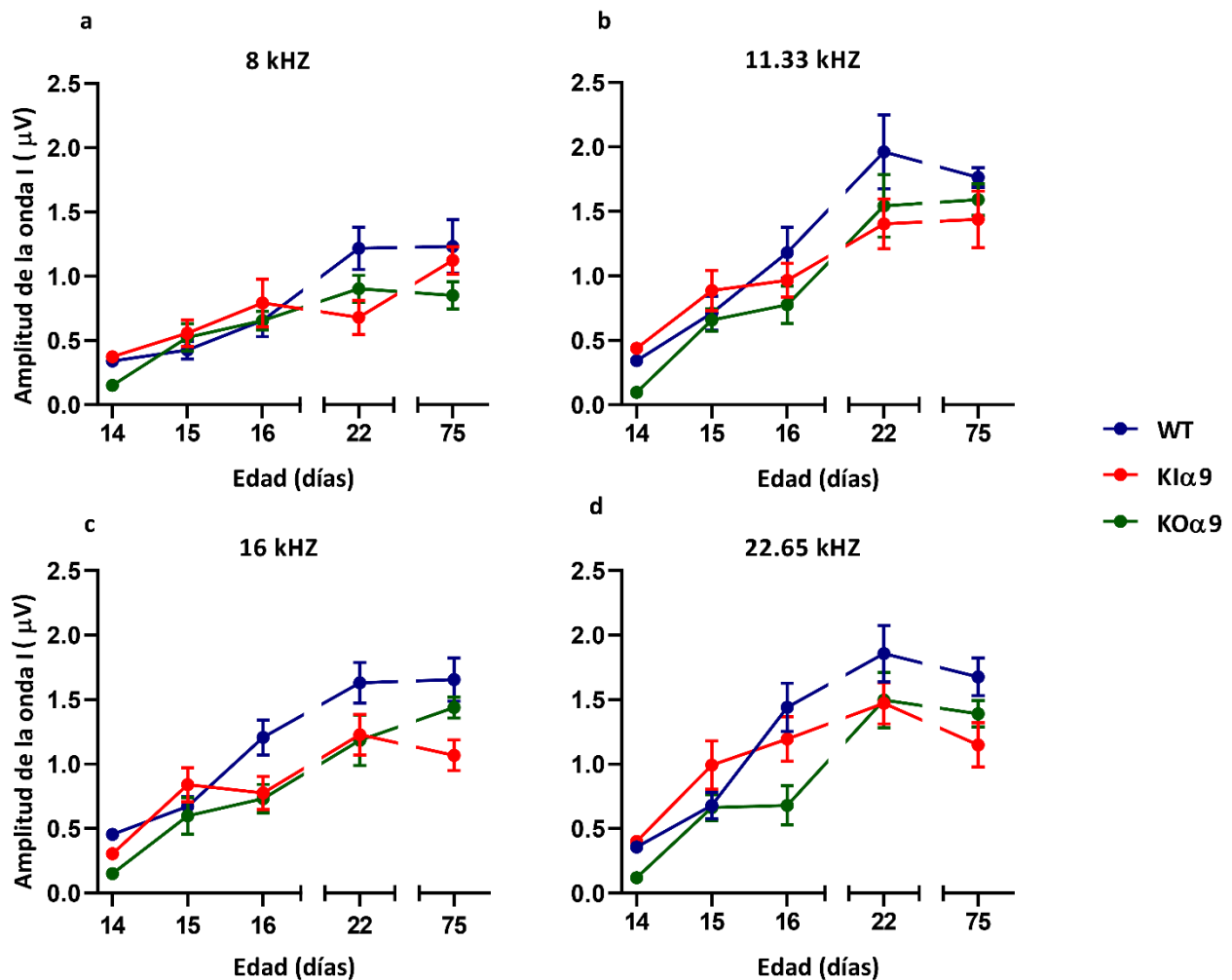


Figura 13| Amplitudes de la onda I de ABR a distintas edades en ratones con distintos niveles de actividad MOC. Se muestran los gráficos de la cuantificación de las amplitudes de la primera onda de ABR a partir de la estimulación con tonos puros de 8 kHz **(a)**, 11.33 kHz **(b)**, 16 kHz **(c)** y 22.65 kHz **(d)** a 80 dB SPL en animales de 12, 13, 14, 15, 16, 22 y 75 días de edad. El número de animales es el mismo que en la Figura 12. Cada punto representa la media $\pm$ SEM.

Las amplitudes de la primera onda de ABR fueron cuantificadas a partir del día 14, momento en el cual los tres grupos presentaban umbrales detectables. Aunque no es significativa, entre P14 y P15 los KIα9 muestran amplitudes levemente mayores a los otros grupos, lo cual se correlaciona con sus umbrales auditivos tempranos. En los días subsiguientes, podemos observar que las amplitudes de la onda I de ABR aumentan para los tres genotipos, hasta P22 donde se alcanzan valores que luego perduran hasta los 75 días de edad. Otra vez, al igual que con los umbrales, encontramos en P15 un estadio similar para los tres grupos donde si bien las amplitudes de la onda I son medibles, aún no

están del todo establecidas. Cabe destacar que hay una tendencia a que las amplitudes en estadios maduros sean mayores en el WT con respecto a los otros grupos, aunque ninguna de estas diferencias fue significativa. Esa tendencia permite inferir que el número de sinapsis aferentes en los WT es mayor al número de los $KI\alpha9$ y $KO\alpha9$, lo cual se desarrollara más adelante en la presente sección. Recordemos que el primer pico del registro de ABR es un indicio de cuantas fibras aferentes de tipo I se ven activadas con la estimulación sonora. Por lo tanto, que dicho parámetro con el correr de los días aumente, significa que el sistema auditivo periférico está en desarrollo y que día a día maduran más sinapsis aferentes que son capaces de activarse con la llegada del sonido.

Por un lado, estos resultados señalan la importancia de la inhibición MOC transitoria en las CCI's para el desarrollo adecuado de la vía auditiva. Por otro lado, nos permitieron determinar que, a los 15 días de edad, tanto los animales WT como los $KI\alpha9$ y $KO\alpha9$ tenían la capacidad de oír, aunque el sistema aún no estaba completamente maduro. Por lo tanto, la edad de P15 resulta ser un momento conveniente para evaluar los efectos de la exposición a sonidos intensos durante una etapa temprana del desarrollo auditivo

Capacidad auditiva luego de la exposición a sonidos intensos.

Previo a estudiar el efecto de la exposición a ruidos intensos sobre la sensibilidad auditiva de animales con diferentes niveles de actividad del sistema MOC durante el desarrollo, se indagó en detalle las diferencias de base a las distintas frecuencias en P15 entre los distintos genotipos. En la *Figura 14a* se encuentra graficado el umbral de detección de la señal de ABR para las diferentes frecuencias de testeo, a partir de lo cual puede construirse el audiograma promedio de los distintos ratones en estudio. En primer lugar, se aprecia que la forma de los tres audiogramas es similar, con menores umbrales en la región de las frecuencias medias y una elevación de estos para aquellas frecuencias que se encuentran en los límites del espectro de audición de los ratones. En segundo lugar, se verifica que no existen diferencias significativas en los umbrales de ABR entre los ratones WT, $KO\alpha9$ y $KI\alpha9$. Si bien los animales $KI\alpha9$ presentan umbrales levemente menores con respecto a los otros dos grupos, consistente con los resultados mencionados anteriormente de que los animales KI muestran un desarrollo temprano en comparación con los otros dos genotipos (ver *Figura 12*), esta diferencia no es significativa. Tampoco se encontraron diferencias en los umbrales de DPOAEs (*Figura 14b*) en los tres genotipos. Como ya fuera mencionado, las amplitudes de los registros de ABR reflejan la actividad sumada de las neuronas del nervio auditivo que fueran reclutadas con ese estímulo, mientras que la latencia revela la velocidad de conducción de la información a través de la vía auditiva

ascendente (Buchwald & Huang, 1975; Antoli-Candela & Kiang, 1978). En consecuencia, la cuantificación de las amplitudes de las ondas de ABR constituye un buen estimador del tamaño de la población de neuronas reclutadas. Para optimizar la cuantificación resulta conveniente utilizar intensidades de estímulo supraumbrales pues ello permite obtener ondas de mayor amplitud y con mejor resolución temporal. Tal como se desprende de la *Figura 14c*, no se detectaron diferencias significativas entre los tres genotipos en relación con las amplitudes de la onda I medidas a 80 dB SPL. Nuevamente, vale la pena mencionar la tendencia (no significativa) de los animales $Kl\alpha9$ a tener amplitudes mayores a P15, producto de su desarrollo temprano. Con respecto a las latencias de la onda I tampoco observamos diferencias: los tres grupos presentan la misma tendencia a que las latencias de las frecuencias bajas sean mayores a las latencias de las frecuencias altas *Figura 14d*.

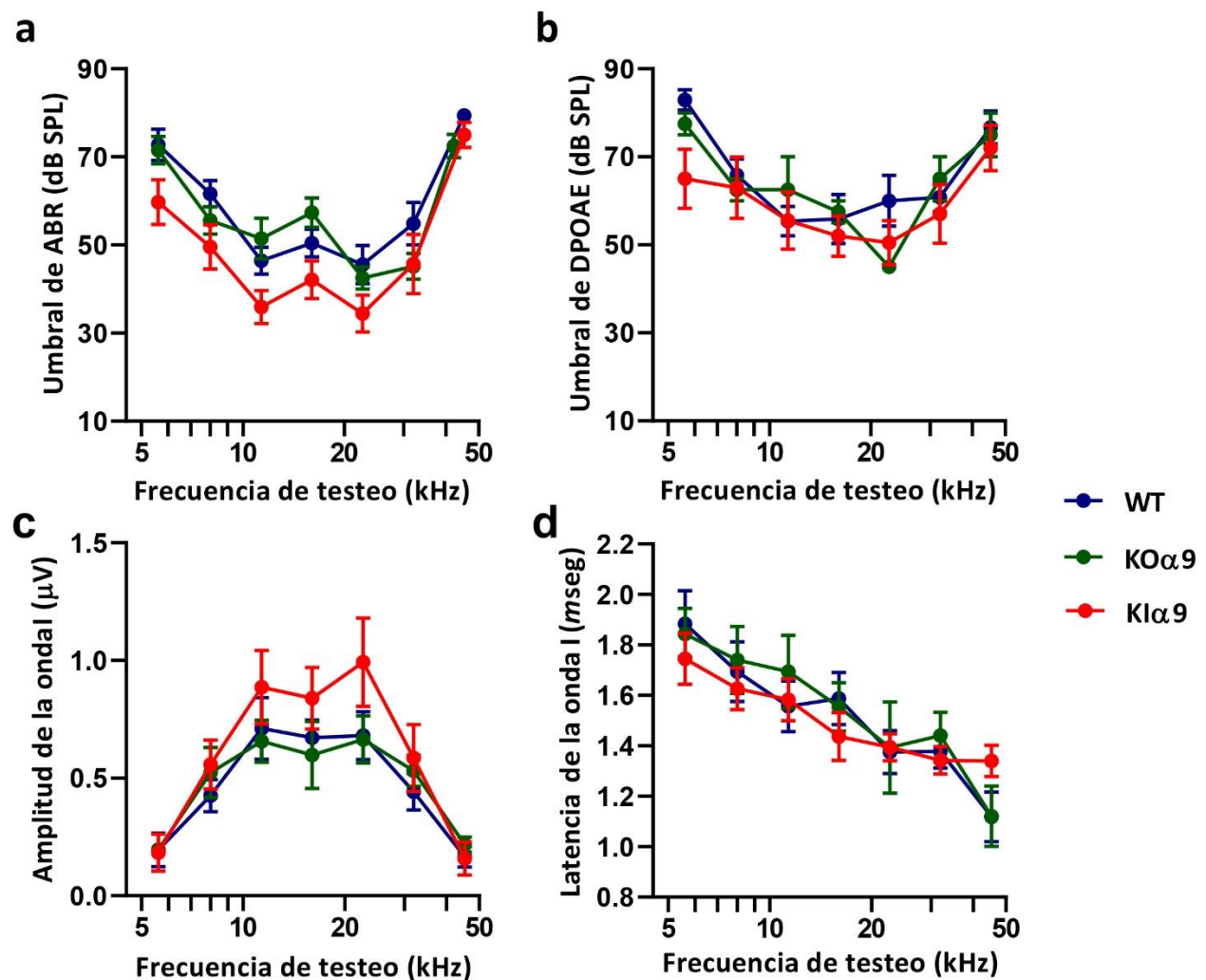


Figura 14| Descripción de la fisiología auditiva a los 15 días de edad en ratones con distintos niveles de actividad del sistema MOC (a). Umbrales de ABR medidos a P15 en animales WT (n= 26), KO α 9 (n= 24), KI α 9 (n= 22). **(b).** Umbrales de DPOAE medidos en los mismos animales **(c).** Amplitudes de la onda I evocadas por estímulos de 80 dB SPL, obtenidas a partir de los ABRs mostrados en el primer panel. **(d).** Latencias de la onda I de ABR en las mismas condiciones que en c. Cada punto representa la media $\pm$ SEM en todos los casos.

Una vez evaluados los animales de P15, se los separó aleatoriamente en dos grupos: control (no expuesto) y expuesto a un ruido de 100 dB SPL con un rango de frecuencias de entre 1 a 16 kHz por una hora. Luego se evaluó la capacidad auditiva de dichos animales en los días posteriores. En la *Figura 15* se presentan los umbrales de ABRs para tres de las frecuencias estudiadas a lo largo de los días post exposición. En ninguno de los grupos a P16 se observaron diferencias entre los controles y los animales que recibieron trauma acústico, pero si se observó una disminución en los umbrales a esta edad con respecto a P15. Este resultado muestra que el proceso de establecimiento de los umbrales definitivos y el refinamiento del sistema no es afectado de manera inmediata por la exposición al ruido.

Luego de siete días, se repitieron las mediciones de ABR. En esa instancia, los umbrales de ABR de los animales WT y KO α 9 que habían sido expuestos al ruido fueron significativamente mayores a los umbrales de los controles (Mann Whitney, $p < 0.05$). En la *Figura 15a* hasta *15f* se observan las diferencias existentes entre los animales controles y los expuestos en los genotipos antes mencionados a P22. Por el contrario, ninguna diferencia se observó en los umbrales de ABR dentro del grupo KI α 9, con una potenciada actividad del nAChR α 9 α 10. La última instancia de registro fue a los dos meses posteriores a la exposición al ruido (P75), y se observó que los umbrales de ABR de los animales WT permanecen significativamente elevados con respecto a los controles (Mann Whitney, $p < 0.05$), mientras que los KO α 9 mostraron una tendencia a la recuperación y no resultaron significativamente distintos de los controles. Por su parte, en los animales KI α 9 tampoco se detectaron cambios en los umbrales de ABR 2 meses después de la exposición al ruido, indicando que a esta edad temprana del desarrollo los mismos están protegidos.

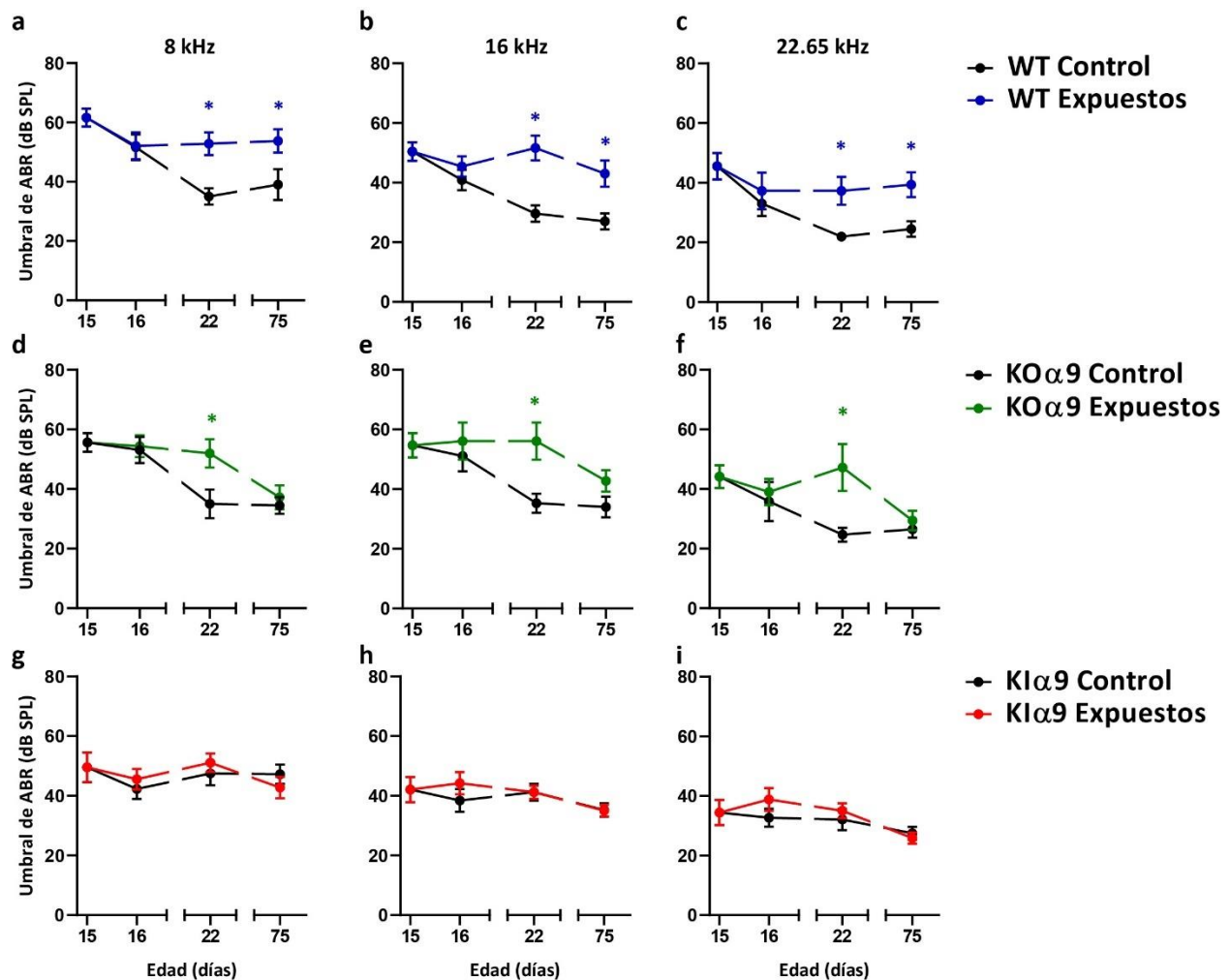


Figura 15| Umbral de ABR para tres frecuencias de testeo (8, 16 y 22.65 kHz) a lo largo del tiempo en animales expuestos a trauma acústico y en controles. Los registros fueron realizados a P15, antes del trauma en el grupo correspondiente, al día siguiente (P16), una semana después (P22) y a los dos meses (P75). *Panel superior:* Umbral de ABR para animales WT controles (trazo negro, n= 14) y animales expuestos a ruido (trazo azul, n= 12). *Panel medio:* Umbral de ABR para animales KO α 9 controles (trazo negro, n= 12) y animales expuestos (trazo verde, n= 12). *Panel inferior:* Umbral de ABR para animales KI α 9 controles (trazo negro, n= 11) y animales expuestos (trazo rojo, n= 11). En todos los casos se muestran las medias $\pm$ error estándar. Las comparaciones a cada edad entre el grupo control y expuestos fueron realizadas con un test no paramétrico, Mann Whitney, * p<0,05.

Una vez caracterizada la respuesta global del sistema auditivo, luego de la exposición a ruido, se procedió a estudiar el cambio en las amplitudes de las ondas I, II y III de ABR. La primera de dichas ondas constituye una buena herramienta para estimar el nivel de actividad evocada en la sinapsis entre las CCI y las NGE. Esta sinapsis es particularmente relevante ya que se trata de la primera sinapsis de la vía auditiva y además porque la reducción de la amplitud de la onda I ha sido

identificada como un fenómeno propio de la sinaptopatía coclear que se produce con el trauma acústico (Kujawa & Liberman, 2009; Maison et al., 2013).

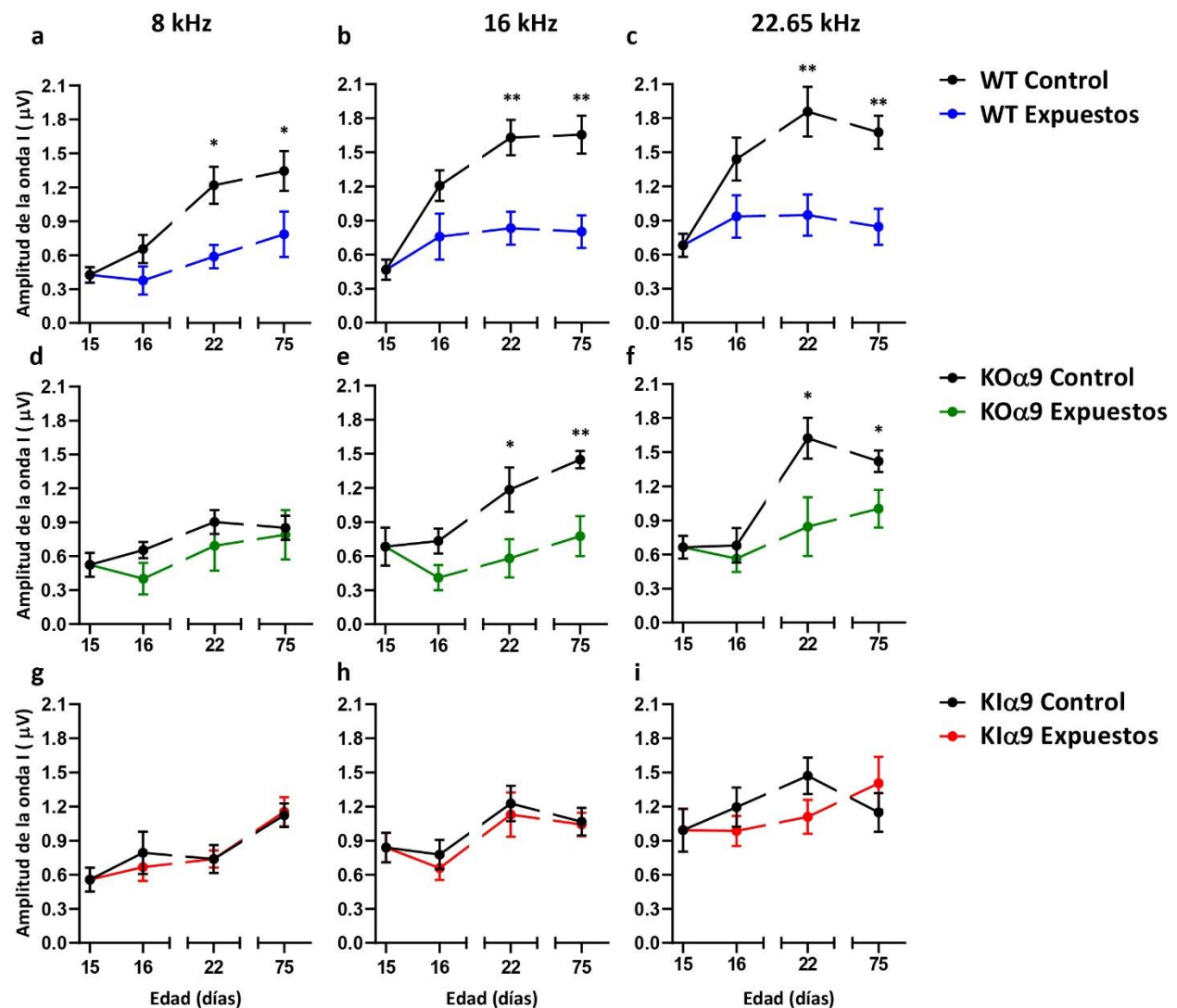


Figura 16| Amplitudes de la onda I de ABR a lo largo del tiempo post exposición a ruido intenso. Los datos aquí graficados fueron obtenidos a partir de los registros de ABRs a 8, 16 y 22.65 kHz con una estimulación de 80 dB SPL. *Panel superior:* amplitudes para animales WT controles (trazo negro, n= 14) y animales expuestos (trazo azul, n= 12). *Panel medio:* amplitudes para animales KOα9 controles (trazo negro, n= 12) y animales expuestos (trazo verde, n= 12). *Panel inferior:* amplitudes para animales KIα9 controles (trazo negro, n= 11) y animales expuestos (trazo rojo, n= 11). En todos los casos se muestran las medias ± error estándar. Las comparaciones a cada edad entre el grupo control y expuestos fueron realizadas con una prueba de t, *p<0.05, **p<0.01.

Comenzando por el grupo de animales WT, observamos en el panel superior de *Figura 16* que al día siguiente del trauma acústico (P16) las amplitudes de la onda I del grupo expuesto a ruido

intenso no difieren del grupo control para ninguna de las frecuencias estudiadas. Dicho panorama cambia a la semana post-trauma, donde las amplitudes de los animales expuestos fueron significativamente menores a las de los animales controles para las tres frecuencias (Mann Whitney, $p < 0.05$), y dicha diferencia se mantiene a lo largo de los días hasta P75 (*Figura 16a-c*). Lo mismo ocurre para los animales KO α 9, los cuales muestran una reducción de la onda I a 16 y 22.65 kHz a la semana del trauma acústico, que se mantiene hasta luego de dos meses (*Figura 16d-f*). En contraste, el grupo de animales que poseen un sistema eferente potenciado (KI α 9) no mostraron ninguna variación en las amplitudes de la onda I a lo largo del tiempo (*Figura 16g-i*).

Luego de analizar las amplitudes que hacen referencia al primer relevo sináptico, se estudiaron las amplitudes de la segunda onda del ABR que corresponden a la sinapsis en el núcleo coclear. En similitud con lo observado para la primera onda, no observamos ninguna diferencia entre los grupos a P16. Recién a la semana post-trauma, se encontró una reducción en la amplitud para los animales WT traumados respecto a los controles, aunque dicho fenómeno fue revertido a los dos meses como se ve en el panel superior de la *Figura 17*. El grupo KO α 9 mostró una tendencia a la disminución de las amplitudes del grupo expuesto a 16 y 22.65 kHz a P22 y luego de dos meses dicha disminución se hizo evidente en 22.65 kHz respecto del grupo control (*Figura 17d-f*). Por otro lado, el grupo KI α 9 no mostró cambios significativos luego de la exposición a ruido (*Figura 17g-i*).

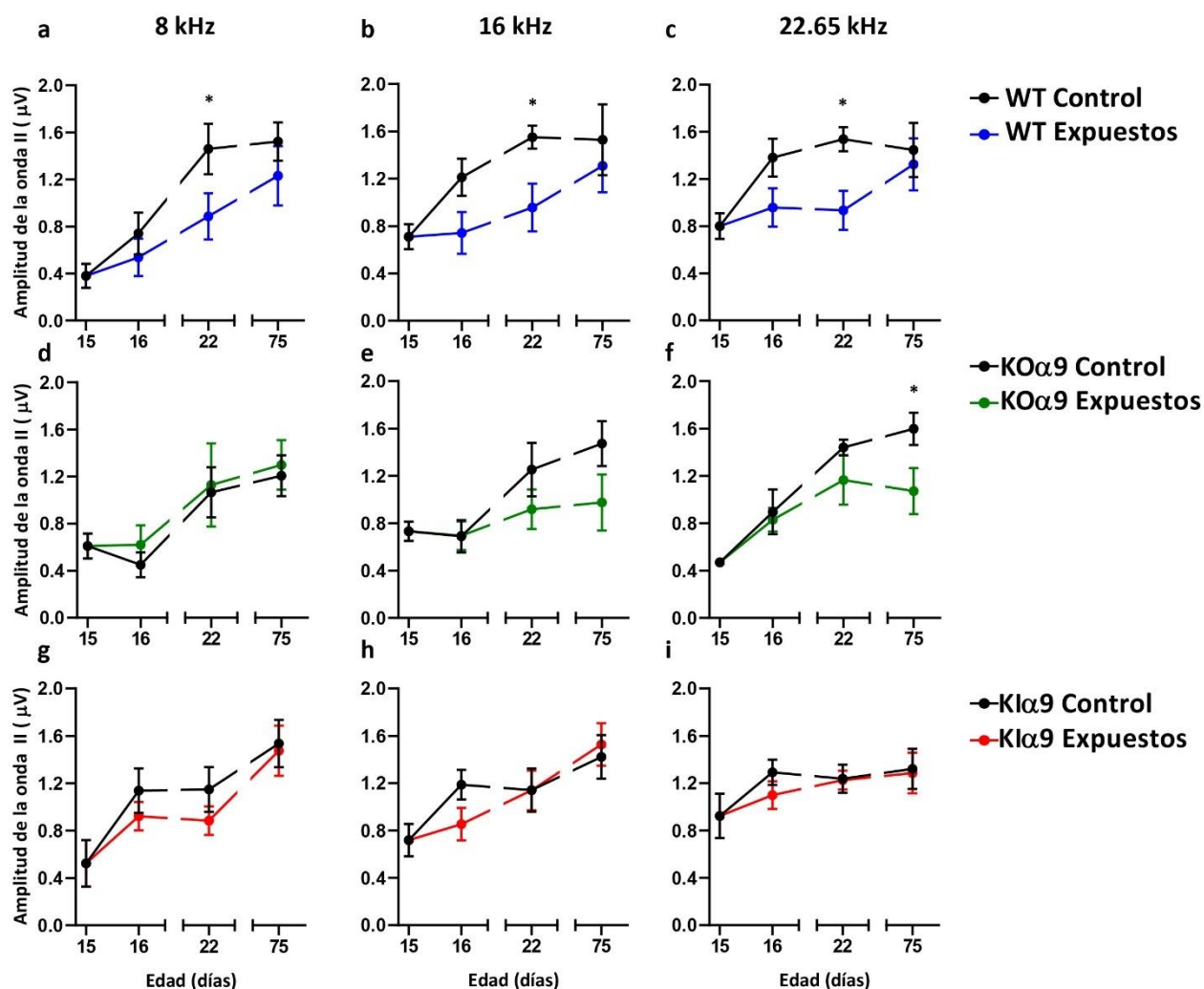


Figura 17| Amplitudes de la segunda onda de ABR a lo largo del tiempo post exposición a ruido intenso. Los datos aquí graficados fueron obtenidos a partir de los registros de ABRs a 8, 16 y 22.65 kHz con una estimulación de 80 dB SPL. *Panel superior:* amplitudes para animales WT controles (trazo negro, n= 14) y animales expuestos (trazo azul, n= 12). *Panel medio:* amplitudes para animales KOα9 controles (trazo negro, n= 12) y animales expuestos (trazo verde, n= 12). *Panel inferior:* amplitudes para animales KIα9 controles (trazo negro, n= 11) y animales expuestos (trazo rojo, n= 11). En todos los casos se muestran las medias ± error estándar. Las comparaciones a cada edad entre el grupo control y expuestos fueron realizadas con una prueba de t, *p<0.05, **p<0.01.

La tercera y última de las ondas analizadas fue la que corresponde a la sinapsis del complejo olivococlear superior. Los datos obtenidos mostraron que al día siguiente del trauma acústico ninguno de los tres genotipos presentó diferencias significativas entre el grupo expuesto y el grupo control (Figura 18). Tales diferencias fueron visibles recién una semana luego de la exposición (P22) para el grupo WT en las frecuencias de 16 y 22.65 kHz (Figura 18a-c) y para el grupo KOα9 en 8 y 16 kHz (Figura 18d-f).

En el caso de los WT, los datos obtenidos a los dos meses muestran que las amplitudes se recuperan y no difieren estadísticamente de los controles (*Figura 18a-c*). Para los KO α 9 también se ve una tendencia de recuperación de las amplitudes, pero dicho proceso parecería ser más lento ya que a 16 y 22.65 kHz las amplitudes continúan siendo menores con respecto a los controles (*Figura 18d-f*).

Al igual que para las amplitudes de las ondas anteriores, en este caso tampoco se ha visto una diferencia significativa dentro de los animales KI α 9, con una potenciada actividad colinérgica (*Figura 18g-i*).

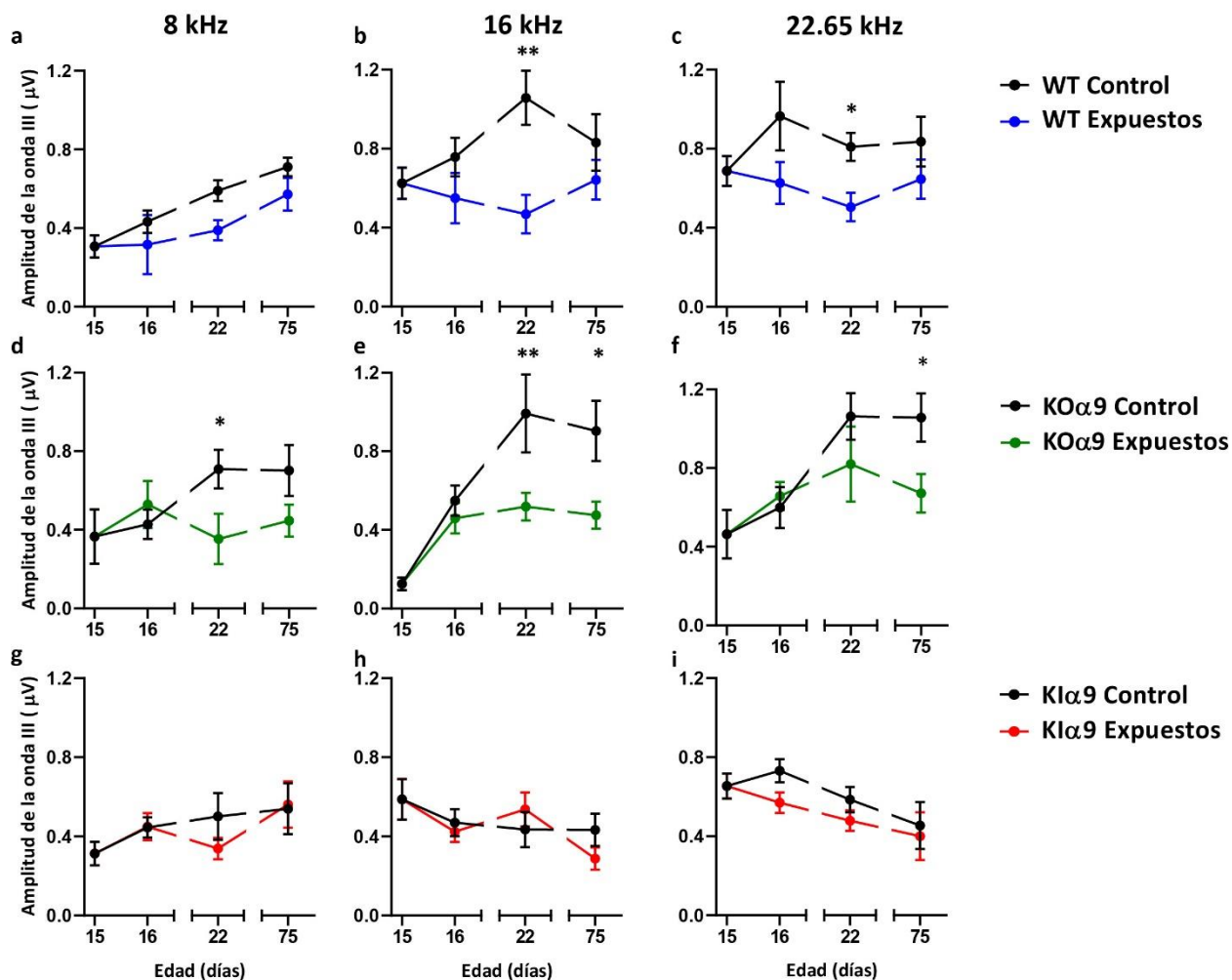


Figura 18| Amplitudes de la tercera onda de ABR a lo largo del tiempo post exposición a ruido intenso. Los datos aquí graficados fueron obtenidos a partir de los registros de ABRs a 8, 16 y 22.65 kHz con una estimulación de 80 dB. **Panel superior:** amplitudes para animales WT controles (trazo negro, n= 14) y animales expuestos (trazo azul, n= 12). **Panel medio:** amplitudes para animales KO α 9 controles (trazo negro, n= 12) y animales expuestos (trazo verde, n= 12). **Panel inferior:** amplitudes para animales KI α 9 controles (trazo negro, n= 11) y animales expuestos (trazo rojo, n= 11). En todos los casos se muestran las medias $\pm$ error estándar. Las

comparaciones a cada edad entre el grupo control y expuestos fueron realizadas con una prueba de t, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En cuanto a las latencias de las ondas I, II y III no se encontró ninguna diferencia en los tres genotipos antes y después de la exposición al ruido (Ver *Tabla 1*, *Tabla 2* y *Tabla 3* en Anexo). Estos resultados sugieren que la velocidad de transmisión y conducción de la señal no se vio afectada luego del trauma acústico.

Con el propósito de estudiar el efecto de la exposición a ruido sobre la integridad funcional de las CCEs y su contribución a la disminución en la sensibilidad auditiva observada en WT y KO α 9, se midieron los umbrales de DPOAE en los tres genotipos y a los mismos tiempos que los ABRs.

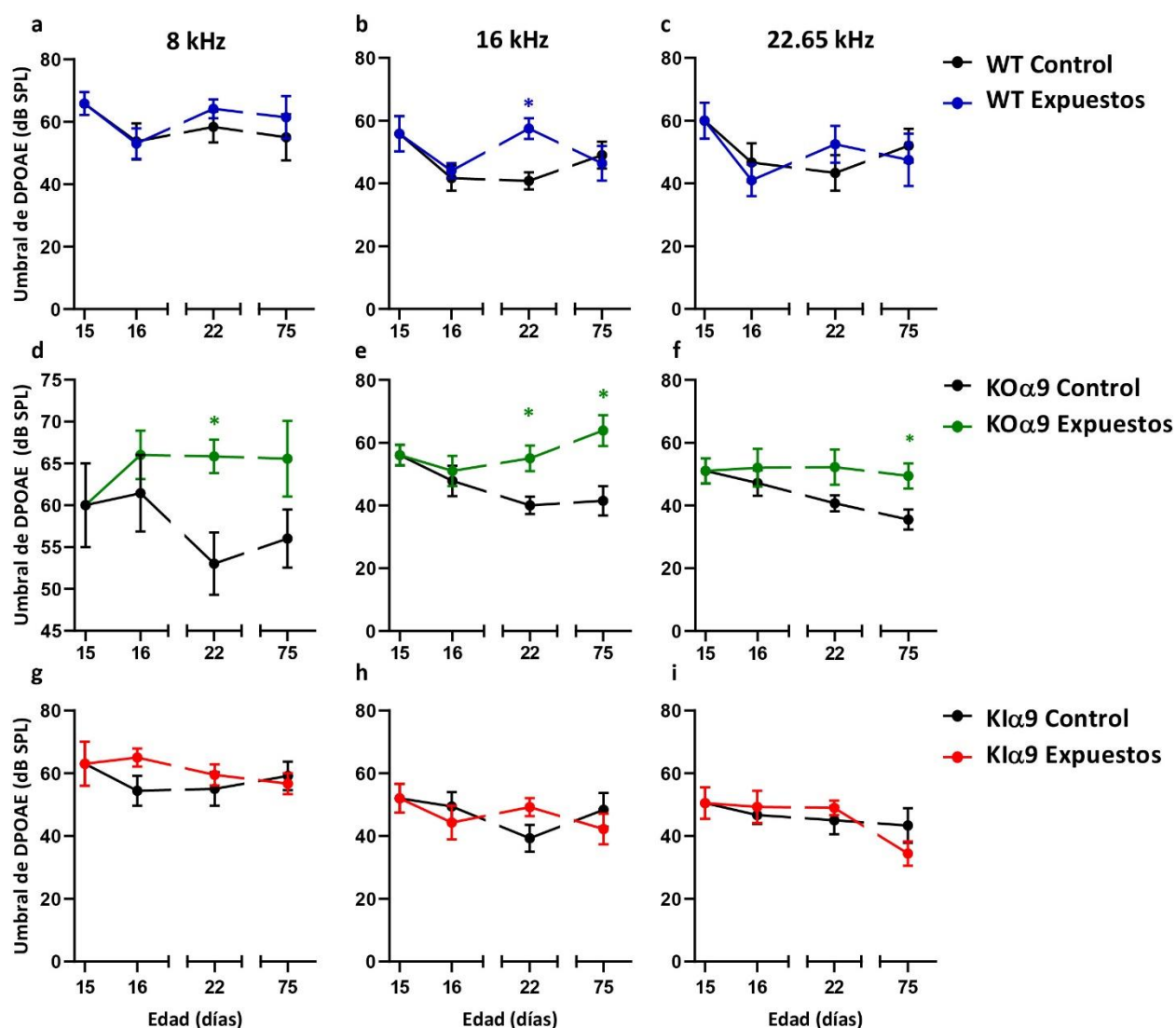


Figura 19| Umbrales de DPOAE para tres frecuencias de testeo (8, 16 y 22.65 kHz) a lo largo del tiempo en animales expuestos a trauma acústico y en controles. Los registros fueron realizados a P15, antes del trauma en el grupo correspondiente, al día siguiente (P16), una semana después (P22) y a los dos meses (P75). **Panel superior:** Umbrales para animales WT controles (trazo negro, n= 14) y animales expuestos (trazo azul, n= 12). **Panel medio:** Umbrales para animales KO α 9 controles (trazo negro, n= 12) y animales expuestos (trazo verde, n= 12). **Panel inferior:** Umbrales para animales KI α 9 controles (trazo negro, n= 11) y animales expuestos (trazo rojo, n= 11). En todos los casos se muestran las medias $\pm$ error estándar. Las comparaciones a cada edad entre el grupo control y expuestos fueron realizadas con un test no paramétrico, Mann Whitney, * p<0,05.

Como se observa en la *Figura 19*, ninguno de los genotipos mostró diferencias al día siguiente del trauma. El grupo WT mostró una elevación en los umbrales una semana luego de la exposición que fue significativa sólo a 16 kHz y a los dos meses los umbrales se recuperaron y no mostraron diferencia con respecto al control (*Figura 19a-c*). Los animales sometidos a trauma acústico del grupo KO α 9, que carecen de un nAChR α 9 α 10 funcional, mostraron una elevación en sus umbrales a P22 que fue estadísticamente significativa a 8 y 16 kHz. Sin embargo, a los dos meses los umbrales tienden a recuperarse, pero a 16 y 22.65 kHz siguen siendo significativamente mayores que los controles lo que indica una leve disfuncionalidad de la amplificación coclear llevada a cabo por las CCEs (*Figura 19d-f*). Finalmente, para los animales KI α 9 no se observaron diferencias significativas luego del trauma acústico a todas las frecuencias testeadas y en todos los estadios post- exposición (*Figura 19 g-i*).

Evaluación del número de sinapsis aferentes post exposición a trauma acústico

Con el propósito de encontrar un correlato histológico de los fenómenos descritos previamente con relación a la función auditiva, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia de manera de poder evaluar el estado de las sinapsis en animales expuestos y no expuestos al ruido. Al igual que antes, primero se consideró necesario caracterizar la inervación aferente sobre las CCI en los tres genotipos en ausencia del efecto de la exposición a ruido. Para ello, se recolectaron secciones de tejido correspondientes a la región apical, medial y basal de cócleas de ratones WT, KO α 9 y KI α 9 no expuestos a ruido a P75, sobre las cuales se realizó una inmunomarcación contra CtBP2-Ribeye (Ribeye es una proteína integral del cuerpo sináptico (Schmitz et al., 2000) y tiene una alta homología con el factor de transcripción CtBP2, es por ello que anticuerpos anti-CtBP2 reconocen específicamente esta proteína) y contra GluA2 (una subunidad del receptor de glutamato de tipo AMPA postsináptico). Luego, a partir de imágenes de microscopía confocal, se cuantificó para cada CCI el número de elementos presinápticos, postsinápticos y de puntos de colocalización entre los dos marcadores. A los puntos de colocalización de los marcadores pre y postsinápticos los denominaremos sinapsis.

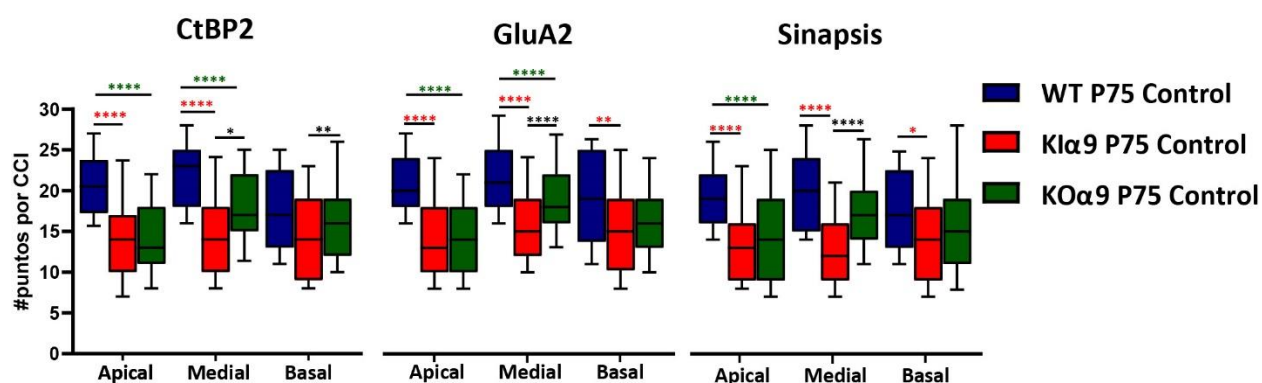


Figura 20| Número de elementos presinápticos, postsinápticos y yuxtapuesto en animales controles de los tres genotipos en las tres regiones de la cóclea. Cuantificación del número de puntos de cuerpos sinápticos (CtBP2-Ribeye), receptores de AMPA postsinápticos (GluA2) y puntos de colocalización (Sinapsis) en ratones WT, KOα9 y K1α9. Las cuantificaciones se obtuvieron a partir de ratones no expuestos a ruido, de los tres genotipos, a P75. Las líneas horizontales dentro de cada boxplot señalan la mediana de los datos, mientras que las barras indican los percentiles 10 a 90. Las comparaciones estadísticas fueron instrumentadas mediante un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido de un post-hoc test (Dunn). Asteriscos rojos representan diferencias significativas entre WT y K1α9, los asteriscos verdes señalan diferencias significativas entre WT y KOα9 y los asteriscos negros diferencias entre el KOα9 y K1α9. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

En la *Figura 20* se advierte que el número de elementos pre y postsinápticos, así como el número de sinapsis, fue menor en ratones KOα9 respecto de los WT para la región apical y medial (Kruskal-Wallis seguido de prueba de Dunn p<0.0001). Al margen de ello, cabe destacar que la distribución espacial de sinapsis aferentes es similar entre animales WT y KOα9, caracterizada por la presencia de un pico en la región medial de la cóclea que, a su vez, coincide con la región de mayor sensibilidad auditiva (Meyer et al., 2009). Con respecto a los ratones K1α9, también se observa un menor número de elementos pre y postsinápticos en las tres regiones de la cóclea con respecto a los animales WT. Asimismo, los ratones K1α9 muestran un menor número de elementos pre, post y sinápticos (esto es de colocalización) en la zona medial con respecto a los animales KOα9. Un detalle no menor que se observa en esta figura es que la distribución característica que se veía en los WT y KOα9, con un mayor número de sinapsis en la zona medial, se ve ausente en el caso de los K1α9, con una potenciada actividad del receptor α9α10. Este mismo resultado ya había sido observado en animales de estos mismos genotipos, pero a edades más jóvenes como P21 (Boero et al., 2018). Esto demuestra que, en condiciones controles, los ratones con distintos niveles de actividad del nAChR α9α10 presentan diferencias en el número de sinapsis aferentes, sugiriendo que la modulación de la

actividad eléctrica espontánea de las CCI por el sistema MOC antes del comienzo de la audición, es importante para el establecimiento correcto de estas sinapsis.

Luego, estudiamos el efecto del trauma acústico a P15 en estos tres grupos de animales con distinto nivel de inhibición olivococlear. En la *Figura 21* se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencia en secciones agudas de órgano de Corti de la región basal, empleando anticuerpos contra Ctbp2-Ribeye, GluA2, el receptor de tipo AMPA presente en la membrana postsináptica del terminal aferente y Myosin VII para marcar las CCI. Las mismas fueron obtenidas de ratones de los tres genotipos en condiciones control (no expuestos a ruido) y 7 días luego de la exposición al ruido. Las imágenes de microscopía confocal permiten ver los puntos de marcación de Ctbp2-Ribeye rodeando la membrana basolateral de las CCI colocalizando con GluA2 que se encuentra en el terminal aferente. Las imágenes de microscopia confocal muestran que hay una aparente pérdida de elementos presinápticos, postsinápticos y por lo tanto de sinapsis propiamente dichas en animales WT y KO α 9 luego de la exposición al ruido (*Figuras 21a-d*) sin ninguna diferencia aparente en los animales KI α 9, con una potenciada actividad del nAChR α 9 α 10 (*Figuras 21 e y f*). En la *Figura 22* se grafican las cuantificaciones de los diferentes elementos sinápticos y las sinapsis (colocalización de elementos pre y postsinápticos) en los tres genotipos de animales controles y expuestos al ruido en las regiones apical, medial y basal de la cóclea. La cuantificación realizada sobre las imágenes obtenidas del confocal muestran que los animales WT expuestos a ruido a P15 exhiben luego de dos meses un menor número de sinapsis en las regiones apical y basal (*Figura 22 a-c*) (Prueba de Mann Whitney, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente). En la región medial de la cóclea de los animales WT sometidos a trauma acústico también se observa una disminución del número de sinapsis, aunque la misma no fue estadísticamente significativa (Prueba de Mann Whitney, $p > 0,05$).

Estos resultados muestran que el trauma acústico en este estadio temprano del desarrollo produce una pérdida permanente de las sinapsis aferentes en los animales WT, lo cual permite explicar la reducción en la onda I de ABR que se presentó en la *Figura 16 a-c*. En el caso de los animales KO α 9, la reducción fue significativa en las tres regiones cocleares en comparación con los animales controles a los 75 días de edad (Prueba de Mann Whitney, $p < 0,01$). Considerando que en estos mismos genotipos se había observado una reducción de la onda I de los ABRs post trauma, conjuntamente con estos, resultados podemos concluir que la disminución de la onda I se debe a la pérdida de contactos aferentes.

En el caso de los animales $KI\alpha 9$ no se observaron diferencias significativas (*Figura 22 g-i*) en los conteos sinápticos luego del trauma acústico, si bien hay una tendencia al incremento de sinapsis post trauma.

En resumen, los ensayos de inmunofluorescencia mostraron la pérdida de elementos pre y postsinápticos en los ratones $KO\alpha 9$ (*Figura 22 d-f*) y WT (*Figura 22 a-c*), lo que resultó en la pérdida de las sinapsis CCI-NGE, también conocida como sinaptopatía coclear. Además, se observó una reducción en la amplitud de la onda I de ABR a los 7 días post- exposición en los ratones WT y $KO\alpha 9$. Estos hallazgos indican la presencia de daño funcional y estructural asociado con el trauma acústico en ambos genotipos. En cuanto a los ratones $KI\alpha 9$, se observó un patrón espacial de inervación aferente sobre las CCIs diferente al de los $KO\alpha 9$ y WT, y la exposición al ruido resultó en un pequeño aumento en el número de sinapsis en lugar del desarrollo de sinaptopatía coclear. Estos resultados sugieren que la potenciación del receptor $\alpha 9\alpha 10$, subyacente al incremento en la fuerza del reflejo MOC, no solo previene los signos fisiológicos y estructurales de la pérdida de audición, sino que también podría promover la formación de nuevas sinapsis después de la exposición al ruido.

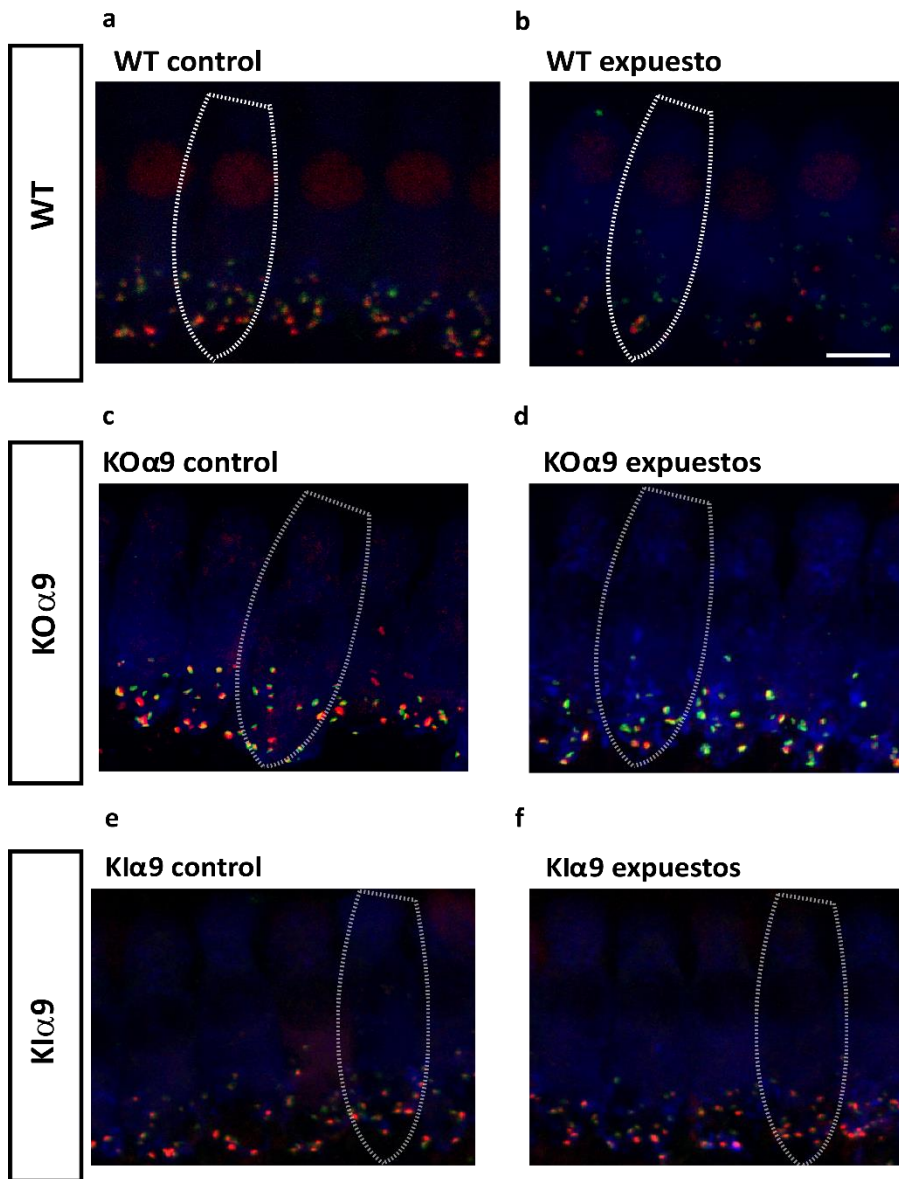


Figura 21| Imágenes de microscopia confocal representativas de los tres genotipos en condiciones control y luego de exposición al trauma acústico. Se muestran imágenes representativas obtenidas a partir de máximas proyecciones de z-stacks provenientes de: en el panel izquierdo de animales no expuestos a ruido (control) y en el panel derecho de animales 2 meses post- exposición (expuestos). Las CCI pueden ser identificadas en azul gracias a la marcación de Myosin VII. El anticuerpo contra CtBP2, color rojo, marca las sinapsis en cinta presentes en las CCI y también marca ligeramente al núcleo de la célula. La marca verde corresponde al anticuerpo anti-GluA2, que marca los receptores de glutamato de tipo AMPA en el terminal de la neurona aferente. La colocalización de ambas marcas indica la conexión sináptica entre ambas partes. La línea punteada blanca delimita aproximadamente el contorno de una CCI. Barra de escala: 8 μ m.

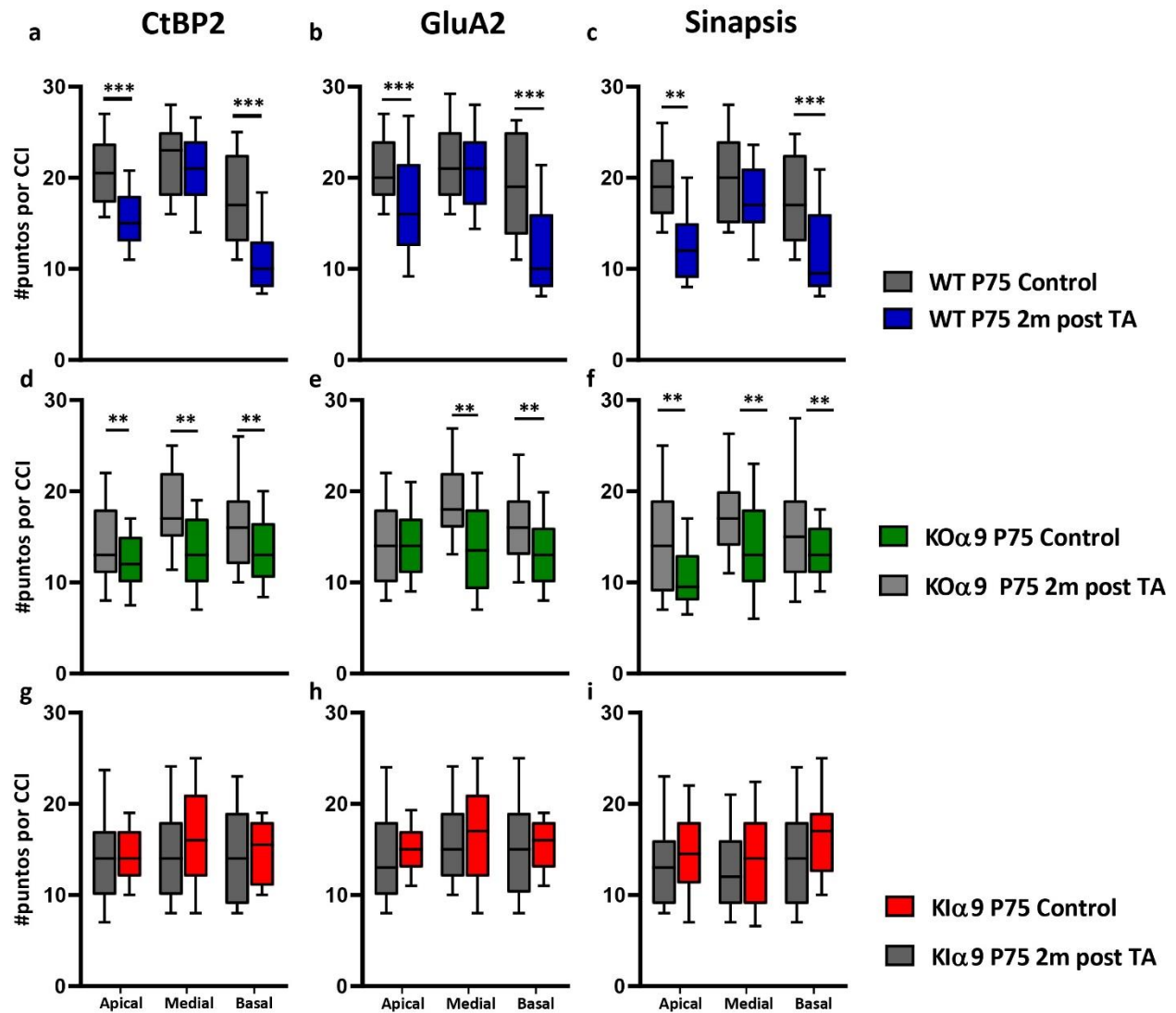


Figura 22 | Análisis cuantitativo de las sinapsis aferentes por CCI en ratones WT **(a)** KOα9 **(b)** y KIα9 **(c)** controles y dos meses después de la exposición a ruido a partir de inmunofluorescencia contra CtBP2 y GluA2. Se muestran las cuantificaciones por CCI del número de marcas de CtBP2, GluA2 y sinapsis – entendidas como la colocalización de los dos marcadores- para animales control (los mismos datos que en la figura 20) y 2 meses post exposición. Tamaños muestrales por grupo: **(a)** WT control, $n_{\text{apical}} = 80$ células, $n_{\text{medial}} = 75$ células, $n_{\text{basal}} = 60$ células; WT 2m post TA, $n_{\text{apical}} = 82$ células, $n_{\text{medial}} = 90$ células, $n_{\text{basal}} = 50$ células; **(b)** KIα9 control, $n_{\text{apical}} = 178$ células, $n_{\text{medial}} = 319$ células, $n_{\text{basal}} = 198$ células; KIα9 2m post TA, $n_{\text{apical}} = 196$ células, $n_{\text{medial}} = 145$ células, $n_{\text{basal}} = 80$ células y **(c)** KOα9 control, $n_{\text{apical}} = 100$ células, $n_{\text{medial}} = 84$ células, $n_{\text{basal}} = 118$ células; KOα9 2m post TA, $n_{\text{apical}} = 234$ células, $n_{\text{medial}} = 60$ células, $n_{\text{basal}} = 90$ células;. Las líneas horizontales dentro de los boxplots señalan la mediana de los datos, mientras que las barras corresponden a los percentiles 10-90. Las comparaciones estadísticas fueron hechas mediante Mann Whitney test. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Caracterización de los cambios en los volúmenes de los elementos sinápticos luego de la exposición a sonidos intensos.

Dentro de las sinapsis remanentes en cada grupo, se analizó el volumen de cada uno de los componentes pre y postsináptico indicado por la marcación de inmunofluorescencia de CtBP2 y GluA2, respectivamente. Como se ha mostrado en la *Figura 4b*, se sabe que existe una distribución espacial dentro de cada CCI en el estadio maduro donde la especialización presináptica de la sinapsis en cinta, que tiene un mayor volumen, se encuentra en el lado modiolar de la célula y se encuentra yuxtapuesta a un terminal de AMPA más pequeño (Liberman & Liberman, 2015). Estas sinapsis modiolares son más susceptibles al daño producido por el trauma acústico (Furman et al., 2013). En contraposición, en el lado pilar de la CCI el volumen de las presinapsis es más pequeño y los terminales de las neuronas aferentes son más grandes. Estas sinapsis pilares son más resistentes a la degeneración por exposición a ruidos intensos (Lu et al., 2024). Dados esos antecedentes, si bien no logramos diferenciar la zona modiolar y pilar de cada célula decidimos estudiar el volumen de las sinapsis remanentes, ya que consideramos que dichas mediciones podrían aportar una valiosa información a la hora de comprender los daños causado por la exposición temprana a ruidos intensos.

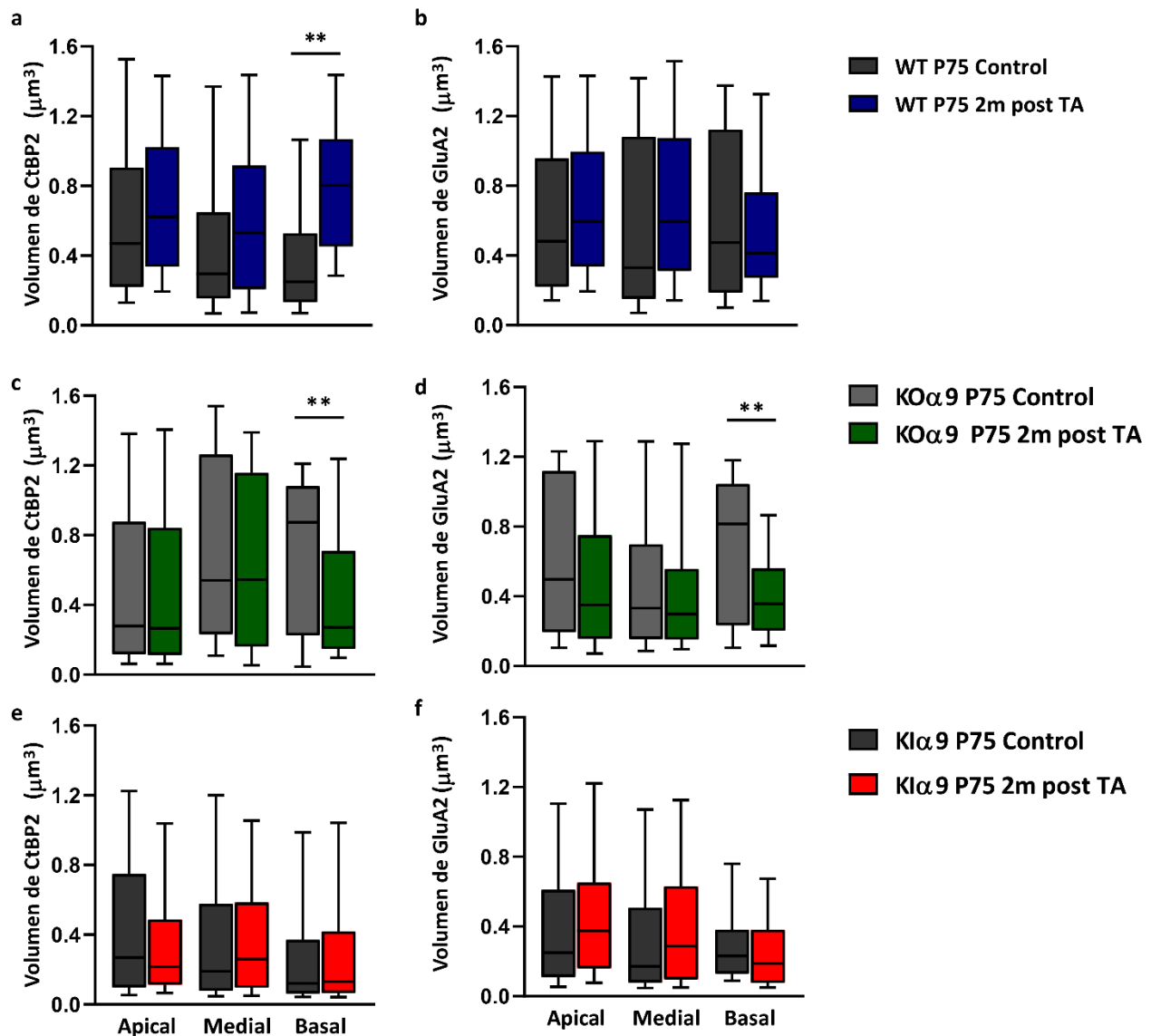


Figura 23|Volúmenes de los elementos pre y post sinápticos en condiciones control y dos meses post exposición. Representación de los volúmenes de los parches de receptores de glutamato (GluA2) y de los cuerpos presinápticos (CtBP2), a través de gráficos boxplot, en animales WT (a, b), KO α 9 (c, d) y KI α 9 (e, f) no expuestos a ruido y a los dos meses post exposición. En cada boxplot la línea del medio señala la mediana de la distribución de datos y las barras corresponden a los percentiles 10-90. Las comparaciones estadísticas fueron hechas mediante prueba de T (** $p < 0.01$)

En la región apical, medial y basal de las cócleas provenientes de animales WT se notó un aumento en el volumen de CtBP2 luego del trauma acústico que fue estadísticamente significativo en la región basal de la cóclea (Prueba de Mann Whitney, ** $p < 0.01$). A nivel post sináptico, no se observaron modificaciones en los volúmenes de GluA2. En el caso de los KO α 9, en la región basal se observó lo opuesto a lo observado en el grupo WT, aquí tanto el volumen de las presinapsis como de las postsinapsis decrece con el trauma acústico (Prueba de Mann Whitney, ** $p < 0.01$). Las cócleas

provenientes de animales $Kl\alpha 9$, no registraron alteraciones en el volumen en ninguna de las tres regiones entre el grupo control y el grupo expuesto, pero si podemos observar una tendencia a que los volúmenes de los controles tengan una menor dispersión que los del grupo WT y $KO\alpha 9$. Este resultado podría ser atribuido a una diferencia propia del desarrollo, indicando que la actividad potenciada de la transmisión colinérgica durante el desarrollo modificaría la estructura de las sinapsis en cinta.

DISCUSIÓN

En esta sección de la tesis se estudiaron las alteraciones fisiológicas y estructurales derivadas de la exposición a ruidos intensos durante el periodo crítico de desarrollo del sistema auditivo en animales con diferentes niveles de actividad del sistema MOC. Específicamente, se estudiaron animales con un nAChR $\alpha 9\alpha 10$ WT, animales que carecen de la subunidad $\alpha 9$ y por lo tanto son incapaces de formar un receptor funcional ($KO\alpha 9$) y animales con una actividad potenciada del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ ($Kl\alpha 9$). En términos funcionales, se evaluaron los cambios en la sensibilidad auditiva global, el tamaño de la población de neuronas reclutadas, la velocidad de conducción de los estímulos sonoros y la integridad funcional de la amplificación coclear llevada a cabo por las CCEs mediante registros de ABR y DPOAEs. A nivel morfológico, se analizaron los efectos inducidos por la sobreestimulación acústica sobre el número y estructura de las sinapsis aferentes que contactan a las CCIs. Los resultados presentados describen las consecuencias de la exposición temprana a ruido a tres tiempos diferentes (1 día, 7 días y 2 meses después post trauma).

Durante la maduración del sistema nervioso, antes de adquirir la capacidad de detectar y responder a estímulos externos, la actividad principal en los circuitos neuronales son los disparos de potenciales de acción espontáneos. Esta actividad espontánea, se caracteriza por ráfagas de potenciales de acción con un patrón rítmico separadas por periodos de quiescencia (Hanson & Landmesser, 2003; Kirkby et al., 2013; Meister et al., 1991). Algo similar se observa durante el desarrollo del sistema auditivo previo al comienzo de la audición, momento en el cual las CCIs disparan potenciales de acción de calcio (Glowatzki & Fuchs, 2000; Johnson et al., 2011; Kros et al., 1998; Tritsch et al., 2007). Estos potenciales de acción son transmitidos a las NGE y de allí son propagados a lo largo de toda la vía hasta llegar a la corteza auditiva (Tritsch et al., 2010). Varios estudios han sugerido que la sinapsis transitoria que se establece entre las fibras MOC provenientes de la oliva superior y las CCIs cumple un rol inhibitorio sobre esta actividad espontánea imponiendo un patrón característico al disparo de potenciales de acción, liberación de glutamato y activación aferente (Glowatzki E & Fuchs PA, 2000; Clause et al. 2014). Se postula que el mantenimiento de los patrones

de actividad y la fidelidad en la transmisión de estas señales serían esenciales para el correcto establecimiento del mapa sensorial y el refinamiento de las conexiones sinápticas (Clause et al. 2014; Hirtz et al. 2011; Leao et al. 2006; Youssoufian, 2005; Di Guilmi et al., 2019). Nuestros resultados muestran que el inicio de la audición, es decir, el momento preciso después del nacimiento en el que detectamos potenciales evocados por sonido, ocurre a la edad de P14 en los grupos WT y KO α 9, y a P13 en el grupo KI α 9. Por lo tanto, una actividad exacerbada del sistema MOC, mediado por un nAChR α 9 α 10 mutado, genera un comienzo de la audición más temprano (P13). Siguiendo la hipótesis con mayor consenso en el área de que la inervación MOC transitoria a las CCI modula el patrón de disparo de estas células, los resultados dan cuenta que una potenciación de la inhibición sobre la actividad espontánea lleva a un desarrollo anticipado de la sensibilidad auditiva. Si bien estos resultados no esclarecen el origen de la actividad espontánea, evidencian el hecho de que el rol del sistema MOC transitorio sobre las CCI es crucial para el desarrollo correcto del sistema auditivo. Al comienzo de la audición (P14 en WT y KO α 9, P13 en KI α 9) se observa que los umbrales tanto de ABR como DPOAEs están elevados para los animales de los tres genotipos y que los umbrales correspondientes a un animal maduro, recién se establecen en P22. Los resultados obtenidos indican que a la edad de P15, en los tres genotipos, el sistema auditivo está preparado para recibir y procesar estímulos sonoros, aunque el proceso de maduración aún no está completo. Una evidencia de esto es que los umbrales de ABR se encuentran elevados a esa edad y que las amplitudes de la onda I de ABR continúan aumentando desde P15 hasta P22, como se muestra en la *Figura 13*. Los resultados de las pruebas de fisiología auditiva reflejaron que, al momento de exponer a los animales a ruidos intensos esto es (en P15), no existían diferencias de base en la sensibilidad auditiva de los tres grupos (*Figura 14*). Si bien el ratón KI α 9 a P15 presenta umbrales de ABR levemente más bajos y amplitudes de la onda I más grandes en comparación con los umbrales de los animales WT y KO α 9, estos no son estadísticamente significativos (*Figura 14*).

Como hemos mencionado en la introducción del presente trabajo de tesis, las consecuencias de los efectos de la sobreestimulación acústica dependen de la intensidad del estímulo sonoro y del tiempo de exposición llevando a cambios transitorios o permanentes (Spoendlin, 1971). De todos modos, resulta difícil traducir proporcionalmente los efectos del trauma acústico y la consecuente pérdida de sinapsis aferentes en una elevación de umbrales (Liberman, 2017). Más aún, tampoco podemos afirmar que un protocolo de trauma específico solo causará efectos transitorios cuando en realidad depende del estado de maduración y plasticidad del sistema.

Uno de los resultados más relevantes de esta investigación revela que la exposición a sonidos intensos a una edad temprana del desarrollo conlleva consecuencias más severas en comparación con la misma exposición en un estadio adulto. En los animales WT, la exposición a ruido (100 dB SPL por 1 hora) a P15 causó una elevación de umbrales de ABRs a los siete días post exposición, los cuales permanecieron elevados hasta luego de dos meses (*Figura 15 a-c*). Ese mismo protocolo de ruido en animales WT de P21 causó una elevación transitoria de los umbrales que fueron restaurados a los 7 días post exposición (Boero et al., 2018). Esta diferencia expone la mayor vulnerabilidad del sistema auditivo a edades tempranas del desarrollo y demuestra que un mismo protocolo de exposición a ruido puede tener distintos efectos dependiendo la edad del animal. Otros reportes previos han demostrado que un mismo esquema de exposición a ruidos intensos causa daños más severos en animales juveniles de 4 semanas que en animales adultos de 16 semanas de edad (Lu et al., 2024, Fernández et al., 2015). Los umbrales de DPOAEs también se vieron elevados a los siete días post exposición (*Figura 19*) aunque los mismos se recuperan luego de dos meses, lo que nos sugiere que no hay pérdida de CCEs o una alteración en su función. Dada esta recuperación de los umbrales de los productos de distorsión, pero la persistencia de umbrales de ABR elevados, podemos inferir que dicha elevación no se debe a un daño en la amplificación coclear sino más bien a una deficiencia en la vía aferente de transmisión de la señal sonora. En concordancia con esto último, los aumentos de los umbrales fueron acompañados por una reducción en la amplitud de la primera onda de ABR, y una disminución del número de sinapsis aferentes por CCI la cual también permanece por un período de dos meses luego del trauma.

El presente trabajo constituye el primer reporte en el cual la elevación de umbrales se mantiene por un periodo tan largo luego de una exposición a 100 dB SPL por 1 hora. Resultados similares se obtuvieron en ratas de 14 días de edad expuestas a 125 dB SPL por 25 min y luego de dos meses post exposición se vio que presentaban una elevación de umbrales a frecuencias altas y una pérdida de elementos presinápticos (CTBP2/Ribeye) (Rybalko et al., 2015). En otro trabajo, en ratas de 10 días de edad expuestas a sonido intensos de 105 dB SPL por dos horas, también observaron una pérdida de elementos presinápticos luego de 8 semanas. Sin embargo, los umbrales auditivos no presentaban cambios (Shi et al., 2015). Una de las fortalezas del trabajo presentado en esta tesis es que, a diferencia de las publicaciones citadas anteriormente, las sinapsis CCI-NGE se contabilizan utilizando el número de colocalizaciones entre los elementos pre y posinápticos a lo largo de toda la cóclea, especificando las regiones más afectadas por el trauma. En los conteos de densidad sináptica en las CCIs de animales WT, se observó una reducción del número de sinapsis en las tres regiones

cocleares, aunque la cuantificación solo arrojó resultados significativos en las regiones apicales y basales (*Figura 22 a-c*). La reducción de sinapsis en la zona apical y basal se correlaciona con la elevación de umbrales de ABR a 8 y 22.65 kHz; frecuencias que son codificadas en las respectivas zonas cocleares mencionadas, respectivamente. Cabe destacar que los umbrales de ABR también se elevaron a frecuencias medias como 16 kHz, pero no alcanzamos a ver una reducción significativa de sinapsis en el número de células estudiadas en la región medial de la cóclea.

En el caso de los animales KO α 9, carentes de actividad MOC, los mismos mostraron una elevación de los umbrales de ABR (*Figura 15*) y DPOAE (*Figura 19*) una semana luego del trauma, efecto que también se observó en los experimentos realizados en el KO α 9 a P21. Sin embargo, a diferencia de lo que observamos en el WT, los umbrales de ABR de los KO α 9 volvieron a los valores pre-trauma a los dos meses luego de la exposición al ruido (*Figura 15*). Por el contrario, los umbrales de DPOAEs siguieron elevados luego de dos meses en las frecuencias 16 y 22.65 kHz (*Figura 19 d-f*). Si bien no fue cuantificado, en nuestras condiciones experimentales no se vio que la exposición a ruido diera lugar a la pérdida de CCEs, lo que demuestra que la elevación permanente en los umbrales de DPOAE no fue debida a ese fenómeno. En lugar de ello, este resultado sugiere que, en ausencia de una inhibición eferente funcional, la sobreestimulación acústica podría afectar la integridad del mecanismo electromotil de las CCEs mediante alteraciones en la mecanotransducción y/o las propiedades funcionales de la prestina. En cuanto a la recuperación de los umbrales de ABR en el KO α 9 puede ser explicada por: 1) mecanismos compensatorios que estén regulando el desarrollo en ausencia de la modulación eferente y/o 2) por el leve retraso en el establecimiento de los umbrales auditivos que observamos durante el desarrollo en los ratones que carecen de un receptor α 9 α 10 funcional (ver *Figura 14*). Si bien los umbrales recuperan los valores previos a la exposición, se ha observado una disminución de la onda I (*Figura 16 d-f*) acompañado por una reducción en el número de sinapsis por CCI (*Figura 22 d-f*) que fue significativa en todas las regiones de la cóclea estudiadas. En este punto es importante recordar que la medición de la amplitud I es obtenida del registro realizado para cada frecuencia con una estimulación a 80 dB SPL (supraumbral). Un trabajo previo en cobayos ha propuesto que los déficits registrados post exposición a ruido en la codificación de estímulos supraumbrales probablemente se deban al hecho de que la exposición a ruido afecta preferencialmente a las NGE de alto umbral y baja tasa de disparo espontánea (Furman et al., 2013). Por lo tanto, podemos hipotetizar que la exposición a ruido haya actuado en detrimento de una

población de fibras específica y, entonces, a pesar de cierto grado de pérdida de sinapsis no vemos cambios en los umbrales.

A diferencia de los resultados obtenidos tanto en los ratones WT como en los KO α 9, en los ratones KI α 9, con una potenciación del sistema eferente, no se observó ninguna elevación de umbrales posterior a la exposición. Este fenómeno ya había sido descrito en ratones adultos (P21) sometidos a trauma acústico (Boero et al., 2018). Este resultado indica que incluso durante esta etapa del desarrollo (P15), cuando se está estableciendo la electromotilidad de las CCEs y desarrollando la inervación MOC hacia estas células, la actividad potenciada del sistema MOC sobre las CCEs ejerce un efecto protector contra los daños funcionales y estructurales asociados al trauma acústico.

Si bien los audiogramas son la principal herramienta clínica para estudiar la pérdida auditiva, las patologías relativas a las neuronas aferentes pueden ocurrir sin cambios medibles en los umbrales de frecuencias puras. La pérdida de conexiones sinápticas puede generar un deterioro de la percepción de la señal auditiva. Esto parte de la hipótesis, elaborada por Lopez-Poveda & Barrios (2013), que considera que luego de la llegada de un estímulo sonoro cada neurona aferente dispara un tren de espigas que se asemeja a una versión digitalizada de manera estocástica de la forma de onda del estímulo y que la calidad de la representación de la forma de onda en todo el nervio depende del número de fibras aferentes. Si las espigas ocurren estocásticamente en el tiempo con una probabilidad más alta para sonidos de alta intensidad que para sonidos de baja intensidad, se requerirían más aferentes para que el nervio codifique fielmente características de forma de onda de alta frecuencia o baja intensidad, que características de baja frecuencia o alta intensidad. Por lo tanto, la pérdida de sinapsis aferentes degradaría la codificación de estas características, en otras palabras, no afectaría la detección de tonos puros, pero si la decodificación de información compleja como el habla (Lopez-Poveda & Barrios, 2013). Esto puede resultar particularmente problemático en ambientes ruidosos donde se necesita una mayor resolución de la codificación neuronal para procesar la información dentro de la señal acústica. Como tal, la pérdida o deterioro de las NGE puede producir déficits funcionales que afecten negativamente la percepción del habla en ambiente ruidosos (Hickox & Liberman, 2014; Plack et al., 2014; Schaette & McAlpine, 2011). La aparición de sinaptopatías luego del trauma acústico han sido ampliamente estudiadas y se propone que la degeneración de los terminales aferentes se debe a un efecto excitotóxico de la descarga masiva de glutamato durante la sobreestimulación acústica (Spoendlin, 1971; Robertson, 1983; Ruel et al., 2007). Cabe destacar que el trabajo de Kujawa y Liberman (2009) fue pionero en la caracterización del nivel de de-aferentación inducido por la exposición a ruido en ratones adultos. En aquel estudio, la pérdida de sinapsis fue de

un 40%, mientras que en un estudio posterior en cobayos se observó una sinaptopatía cercana al 30% (Furman et al., 2013). Resultados similares se encontraron en un estudio más reciente en ratones de 6 semanas de edad (Jensen et al., 2015). Esto, por un lado, reafirma la idea de que el desarrollo de una sinaptopatía coclear luego de la exposición a ruido es un fenómeno generalizado en diferentes especies, a la vez que convalida el uso de modelos murinos para el estudio de esta patología. Si bien se cuenta con numerosas evidencias de estos efectos post exposición, los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno tanto a nivel presináptico como postsináptico no han sido completamente caracterizados. En este marco, el presente trabajo constituye la primera evidencia de que la exposición a ruido en animales durante el periodo de desarrollo, cuyo sistema auditivo está aún completando su proceso de maduración, es capaz de alterar la codificación de los estímulos auditivos como resultado de la pérdida de sinapsis CCI-NGE.

Como se ha mencionado en la introducción del presente capítulo, dentro de cada CCI existe un gradiente volumétrico opuesto respecto a las sinapsis en cinta y a los respectivos botones post sinápticos. Se ha descrito que en la región modiolar de la célula encontramos sinapsis en cinta de mayor volumen con post sinapsis más pequeñas y viceversa en el lado pilar (Liberman & Liberman, 2015). A su vez, esta diferenciación morfológica y espacial tiene un correlato con la actividad espontánea y la activación por estímulos sonoros de las neuronas aferentes del nervio auditivo. Así, las neuronas aferentes que contactan la región pilar tienen una alta tasa de disparo espontáneo y un bajo umbral de activación por sonido. En cambio, las fibras aferentes de la región modiolar se caracterizan por tener una baja tasa de disparo espontáneo y un alto umbral de activación (Shrestha et al., 2018; Merchan-Perez & Liberman, 1996; Liberman et al., 2011). Estas últimas, son las más sensibles al trauma y las más lábiles a perderse como consecuencia de la exposición (Furman et al., 2013). Según los resultados de nuestros análisis, el tamaño de los elementos presinápticos (volumen de Ribeye/CtBP2) de los animales WT se ve aumentado luego de la exposición a ruidos intensos. Resultados similares han sido reportados en ratones adultos donde luego del trauma se vio un incremento en el volumen de los elementos presinápticos lo cual sugiere que, aún cuando el sistema se encuentra maduro, existen mecanismos compensatorios (Lu et al., 2024). De todos modos, la presente tesis constituye el primer antecedente en edades muy tempranas del desarrollo. Una de las posibles explicaciones ante este incremento en el volumen de las presinapsis se basa en la evidencia que la masiva entrada de calcio a la célula durante el trauma genera un aumento de la concentración intracelular de dicho ion y eso desencadena una cascada de señalización que produce la fusión de los elementos presinápticos (Lu et al., 2024; Boero et al., 2021). En otros trabajos se ha observado que la

exposición de animales de 6 semanas de edad a un ruido intenso de 98 dB SPL por dos horas en el mismo rango de frecuencia que el utilizado en esta tesis causa una reducción en el número de presinapsis en las CCEs, y un aumento en el volumen y la movilidad de las remanentes. Junto con esa observación, se vio que las sinapsis en cinta de la zona basal de la cóclea tienden a moverse hacia el núcleo inmediatamente después del trauma y luego regresan a la zona basal de la célula re-areglándose espacialmente (Wood et al., 2021). Se puede hipotetizar que el aumento del volumen de las sinapsis remanentes puede ser un mecanismo compensatorio ante la pérdida de sinapsis, de manera que se mantenga la integridad de la sensibilidad auditiva.

Al contrario del aumento de volumen registrado en los WT, los animales KO α 9 mostraron una disminución en el volumen de las presinapsis en la región basal de la cóclea. Una posible interpretación que se desprende del resultado es que post exposición hay una disminución en el número de presinapsis modiolares (caracterizadas por un mayor volumen) y las remanentes exhiben un tamaño menor, lo que conduce a que el volumen medio disminuya. Experimentos realizados en ratones de la cepa CBA han demostrado que las sinapsis en cinta modiolares son las primeras en perderse luego del trauma, perdiéndose así el gradiente modiolar-pilar (Furman et al., 2013; Liberman et al., 2015). Si bien la causa de este deterioro diferencial no está del todo esclarecida, se cree que comienza con la excitotoxicidad postsináptica. La elevada liberación de glutamato, resultado de la estimulación continua, provoca una entrada masiva de calcio en las neuronas postsinápticas. En el caso de las neuronas que conectan con la zona modiolar, al tener un diámetro más reducido, la concentración de calcio aumenta rápidamente, desencadenando un proceso de excitotoxicidad que con frecuencia resulta en la degeneración neuronal y posiblemente conduce a la pérdida de la presinapsis correspondiente (Hu et al., 2020; Hakuba et al., 2000). La disminución de las sinapsis modiolares no se reflejaría en un aumento de los umbrales de ABR, dado que en su mayoría estas neuronas tienen un alto umbral de activación (es decir, responden a sonidos de alta intensidad), mientras que la sensibilidad auditiva está principalmente determinada por neuronas de umbral de activación bajo. La pérdida de sinapsis modiolares con alto umbral de activación puede observarse mediante una reducción de la onda I de ABR a intensidades supraumbrales y justamente eso es lo que observamos en los ratones KO α 9 a los dos meses post exposición, una disminución en las amplitudes de la onda I a 80 dB SPL sin una elevación de los umbrales.

En la misma región coclear donde se observó la reducción del volumen de las presinapsis en los ratones KO α 9, también se detectó una disminución en el tamaño de los terminales postsinápticos. Se ha postulado la existencia de un mecanismo de control bidireccional del tamaño de los parches

postsinápticos en el cual el glutamato tiende a reducir el tamaño de los parches de receptores de AMPA a través de la internalización de los mismos (Chen et al., 2009), mientras que otros factores secretados favorecen la puesta en membrana de un mayor número de receptores de AMPA. Esta hipótesis, permitiría explicar la reducción del tamaño de los parches de GluA2 luego de la exposición al ruido. En la misma línea, otros experimentos han demostrado que luego de la exposición a sonidos intensos cae el número de mitocondrias presentes en los terminales, en consecuencia, se reduce el tamaño de los mismos (Lu et al., 2024).

Es importante remarcar que durante el período embrionario y durante los primeros días postnatales, las CCI_s muestran acumulación de pequeñas sinapsis en cinta redondas que exhiben múltiples puntos de contacto con la membrana plasmática como se muestra en el diagrama de la *Figura 7b*. Sin embargo, luego del comienzo de la audición los elementos presinápticos son más grandes y poseen un solo punto de anclaje con la membrana plasmática. Este proceso, se acompaña por un aumento del número de vesículas cargadas con neurotransmisor por cada sinapsis (Korn & Vol, 2020). Así mismo, se ha reportado que la heterogeneidad espacial observada entre las zonas pilar y modiolar de las sinapsis en cinta de las CCI_s se establece durante las primeras dos semanas postnatales (Lieberman et al., 2011). Esto significa, que la temporalidad de estos procesos coincide con nuestro protocolo experimental de exposición a ruido. Por lo tanto, el trauma acústico podría estar interrumpiendo o distorsionando el desarrollo y maduración de los elementos presinápticos de la sinapsis en cinta provocando una alteración en los volúmenes de estas. En resumen, la sinaptopatía y las alteraciones morfológicas observadas de las sinapsis aferentes pueden ser explicados por una mezcla de procesos relacionados al desarrollo y al daño generado por el trauma acústico.

Si bien la microscopía confocal constituye una herramienta muy útil para la evaluación coclear, las limitaciones del microscopio no nos permitieron realizar la correcta división del eje modiolar-pilar que hubiera sido de gran ayuda a la hora de hacer inferencias sobre las sinapsis remantes y su posición en la célula. Lejos de tomarlo como un impedimento, consideramos que los análisis pudieron realizarse exitosamente y a futuro se puede avanzar con un estudio más detallado de la innervación aferente y su posición en el eje de la CCI.

Independientemente de las consecuencias del trauma acústico a nivel sináptico, una de las observaciones más relevantes presentadas en esta tesis involucra el número y distribución diferencial de sinapsis a lo largo de la cóclea entre los tres genotipos en condiciones control, como se observa en la *Figura 20*. Allí, se revela que la actividad diferencial del sistema MOC durante el desarrollo tiene sus consecuencias en el establecimiento y distribución de las sinapsis a lo largo de la cóclea. En primer

lugar, se estableció que el número de elementos pre y postsinápticos junto con el número de sinapsis propiamente dichas era menor en los animales $KI\alpha9$ y $KO\alpha9$ con respecto a los WT en las zonas apical y medial, mientras que en la zona basal la diferencia se daba entre los animales $KI\alpha9$ y $KO\alpha9$. El hecho de que se hayan contabilizado significativamente menos sinapsis aferentes en los ratones $KI\alpha9$ y $KO\alpha9$ en algunas regiones cocleares contrasta con la ausencia de diferencias en los umbrales y la amplitud de la onda I de ABR en animales no expuestos a ruido. Como se ha enunciado anteriormente, se han encontrado evidencias que sostienen que la pérdida de sinapsis en cinta acarrea una reducción en el tamaño de la población de NGEs capaces de responder a la estimulación sonora, lo que puede manifestarse como una alteración de la amplitud de la onda I de la señal de ABR (Kiang et al., 1976; Kujawa & Liberman, 2009). De este modo, sería esperable que un menor número de terminales aferentes por CCI coincidiera con el registro de menores amplitudes de la onda I. Una posibilidad es que con la metodología utilizada en nuestro trabajo no estemos logrando revelar dichas diferencias, aunque la técnica de ABR utilizada es ampliamente utilizada por su practicidad y eficacia no deja de ser en cierta medida ruidosa y tal vez no permita detectar pequeñas diferencias en la onda I. Una posible alternativa sería el uso de una segunda prueba fisiológica para detectar sensibilidad auditiva, conocida como CAP (por sus siglas en inglés, compound action potential). La misma refleja la función del nervio coclear y en comparación con los ABR es más relevante para probar la integridad funcional de la cóclea (Ding et al., 2020). Los registros con esta técnica involucran un electrodo situado en el canal externo auditivo, sobre la membrana timpánica o a través de la ventana redonda (Kaf et al., 2017; Zhang, 2012). No obstante, la ausencia de diferencias en las amplitudes de la onda I entre los genotipos en condiciones control a pesar de la diferencia en el número de contactos sinápticos puede ser explicada por otros motivos. En primer lugar, se desconoce si existen diferencias entre los genotipos en términos de la eficiencia de liberación sináptica o bien en la excitabilidad de las NGE postsinápticas que pudieran compensar funcionalmente las diferencias en el número de terminales. En segundo lugar, se encontraron divergencias en la distribución topográfica de la inervación aferente a las CCIs. En animales WT se halló un mayor número de sinapsis aferentes por CCI en la región medial de la cóclea y menores números en las regiones apicales y basales. Esto coincide con lo observado en un reporte previo en gerbos y también en ratones C57 jóvenes en el que, además, se propone que la mayor inervación en la región medial es causante de la mayor sensibilidad auditiva a frecuencias medias (Meyer et al., 2009). En este contexto, si bien en el $KO\alpha9$ la reducción en el número de sinapsis se dio mayormente en las regiones apical y medial de la cóclea, el patrón de inervación aferente fue igualmente capaz de recapitular la distribución topográfica observada en WT. En cambio, en el ratón

KI α 9 a P75, tal patrón de innervación se mostró ausente y el número de sinapsis por CCI fue el mismo en las tres regiones de la cóclea. La ausencia de una distribución topográfica en el patrón de innervación aferente a las CCIs es coincidente con un reporte previo, en este mismo genotipo, en el cual se halló una distribución homogénea de las propiedades biofísicas de las neuronas del MNTB (un núcleo de la vía auditiva ascendente), en lugar del mapa asimétrico descrito en ratones WT (Leao et al., 2006; Di Guilmi et al., 2019). Cabe recordar que uno de los ejes centrales abarcados en este trabajo es la existencia durante el periodo crítico de desarrollo de contactos inhibitorios transitorios entre las neuronas MOC y las CCIs, los cuales también están mediados por el acople entre α 9 α 10 y SK2 (Glowatzki & Fuchs, 2000; Katz et al., 2004; Gómez-Casati et al., 2005). Tal innervación eferente transitoria ha demostrado tener efectos moduladores sobre la estructura temporal de la actividad espontánea desarrollada por las CCIs previo al inicio de la audición, la cual es fundamental para la maduración de la maquinaria sináptica de estas células y el refinamiento de las conexiones neuronales a lo largo de toda la vía auditiva (Glowatzki & Fuchs, 2002; Johnson et al., 2013b; Clause et al., 2014). En resumen, las diferencias fisiológicas e histológicas observadas en los genotipos a P21 podrían ser el resultado de los distintos niveles de inhibición de la amplificación coclear luego del inicio de la audición. Aun así, no puede descartarse que los diferentes niveles de actividad en la sinapsis transitoria entre los terminales MOC y las CCIs tengan una contribución en las diferencias observadas, teniendo en cuenta su rol modulador del desarrollo de la vía auditiva.

Conjuntamente con la reducción de la primera onda de los registros de ABR, se observaron reducciones en las amplitudes de las ondas II y III, que se corresponde con los potenciales generados en el núcleo coclear y complejo olivococlear superior, respectivamente. Los animales WT han mostrado una reducción en las amplitudes de la segunda y tercera onda de ABR una semana luego del trauma acústico, pero las mismas se reestablecen a los dos meses de la exposición. En el caso de los animales KO α 9, para la segunda onda de ABR se encontró una disminución a los 2 meses de la exposición para la frecuencia de 22 kHz, y para la tercera onda la disminución se encontró a los siete días del trauma y en al menos una de las frecuencias estudiadas dicha reducción permaneció hasta los dos meses. Previamente hemos demostrado que para ambos genotipos la exposición a ruido intenso causa la pérdida de sinapsis aferentes, lo que significa una menor señal entrante al núcleo coclear que provocaría una disminución en la actividad. Sin embargo, nuestros datos revelan que las amplitudes se recuperan y se reestablece la actividad de dichos relevos. Una de las posibles explicaciones para este suceso consiste en la remarcada evidencia que tanto el núcleo coclear como el complejo olivococlear superior exhiben una hiperexcitabilidad luego de la exposición a trauma (Vogler et al., 2011). Existen

evidencias que muestran que la actividad espontánea se encuentra aumentada luego del trauma acústico en el núcleo coclear ventral y dorsal (Vogler et al., 2011; Kaltenbach & Afman, 2000). Se considera que este aumento de la actividad constituye un mecanismo compensatorio ante la disminución de la señal proveniente de la periferia post trauma. Este aumento de la actividad espontánea también ha sido registrado en núcleos del cerebro medio como el CI (Mulders et al., 2009), ya que luego del trauma las neuronas de dicho núcleo presentan respuestas mayores aún cuando la actividad en la periferia sea normal. Incluso, se ha reportado una fuerte correlación entre la pérdida de sensibilidad auditiva (aumento de umbrales) y el aumento en la actividad espontánea (Mulders et al., 2011). Este aumento de actividad espontánea ha sido ampliamente estudiado porque podría estar involucrado en el desarrollo de acúfenos luego del trauma acústico. Otro posible proceso que dé como resultado una recuperación de la actividad de los núcleos superiores es la plasticidad propia de la etapa del desarrollo. Sabemos que la maduración del sistema auditivo se da desde la periferia hacia el sistema nervioso central, por lo cual tanto el núcleo coclear como el complejo de la oliva superior son altamente plásticos en estas etapas dando lugar a re-arreglos y compensaciones luego del trauma. En los animales $Kl\alpha 9$, con una potenciada actividad MOC, no se encontraron diferencias en las amplitudes de las ondas II y III de los ABR entre el grupo control y el grupo expuestos. Esto indica que el trauma no causa mayores consecuencias en los relevos superiores en los animales con un sistema eferente aumentado. Esto no quita que la actividad tanto del núcleo coclear como del sistema olivococlear superior se encuentren alterados en estos animales por consecuencias exclusivas del proceso de desarrollo. De hecho, durante el periodo de desarrollo y establecimiento de los umbrales auditivos (P16-P21), se ha observado una menor amplitud de la onda II y onda III en los animales $Kl\alpha 9$ con respecto a los WT (Di Guilmi et al., 2019). En el mismo trabajo, se ha demostrado que animales con una potenciación del sistema MOC exhiben una menor actividad eléctrica global en las neuronas principales del núcleo del cuerpo trapezoidal medial que reciben inervación de las neuronas del núcleo coclear y una ausencia de la distribución topográfica en dicho núcleo.

En resumen, podemos concluir que el trauma acústico en edades tempranas causa daños en el desarrollo del sistema auditivo que pueden permanecer hasta la adultez. Dichas consecuencias no se encuentran en animales con un sistema eferente potenciado, lo que refuerza la idea que el sistema eferente cumple un rol protector frente a la sobreestimulación y, que sugiere que la modulación farmacológica de la actividad de $\alpha 9\alpha 10$ podría ser una buena estrategia en la prevención de los daños

asociados al trauma acústico. Finalmente, esta tesis demostró que el rol del sistema eferente durante el desarrollo es vital para el correcto establecimiento de umbrales y formación de sinapsis aferentes.

Capítulo II. Impacto de los fitoesteroles en la pérdida de audición inducida por medicamentos antirretrovirales y su posible relevancia en la presbiacusia.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el contenido de colesterol en el órgano de Corti durante el envejecimiento y luego de la administración de antirretrovirales.
- Estudiar la pérdida de audición por la administración de antirretrovirales.
- Evaluar el impacto de la suplementación con fitoesteroles sobre la sensibilidad auditiva.

INTRODUCCIÓN

El colesterol es un componente importante de las membranas celulares, es vital para el normal funcionamiento de las células y de las proteínas asociadas a membrana. Se ha demostrado que el colesterol es abundante en membranas sinápticas y modula el número de complejos proteicos, vía directa uniéndose a dichos complejos o condicionando su conformación, dinámica o propiedades (Dietschy, 2009). Dentro del sistema nervioso central el colesterol juega un papel central en la formación de sinapsis, interacciones célula-célula y la señalización intracelular (Egawa et al., 2016).

Se ha descrito que todo el colesterol presente en el SNC es sintetizado *in situ* debido a que el colesterol circulante por el sistema circulatorio periférico no tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Björkhem, 2006). Por lo tanto, los niveles de colesterol están estrictamente regulados en el cerebro, de hecho, el desarrollo de numerosas enfermedades neurodegenerativas y disfunciones cognitivas son producto de una desregulación de dicha homeostasis (Björkhem, 2006; Martín et al., 2014; Martín et al., 2014; Petrov et al., 2016; Pfrieger & Ungerer, 2011).

Numerosos estudios han demostrado que se produce una reducción en los niveles de colesterol en el hipocampo durante el envejecimiento (Söderberg et al., 1990; Sodero et al., 2011). Esta reducción, lleva a un profundo efecto en la estructura de las membranas plasmáticas y en la función celular (Egawa et al., 2016; Fabelo et al., 2012; Ledesma et al., 2012; Martín et al., 2014; Martin et al., 2008; Sodero et al., 2011). La reducción del contenido de colesterol en el cerebro durante el envejecimiento es un proceso que también se ha observado en muestras de cerebros humanos (Mason et al., 1992; Roher et

al., 2002) (Molander-Melin et al., 2005; Mulder et al., 1998; Söderberg et al., 1990; Svennerholm et al., 1991, 1994, 1997; Thelen et al., 2006). Entre las múltiples causas propuestas para la pérdida de colesterol asociada al envejecimiento se encuentra el incremento en los niveles de la enzima citocromo P450 46A1 (CYP46A1) (Martin et al., 2008; Sodero et al., 2011). Esta enzima perteneciente a la familia de las 24-colesterol-hidroxilasa es específica de cerebro y se halla presente en células piramidales y en interneuronas de corteza e hipocampo, así como también en células de Purkinje en el cerebelo (Lund et al., 1999; Moutinho et al., 2016; Ramirez et al., 2008). De hecho, ha sido demostrado por nuestro grupo colaborador, liderado por el Dr. Mauricio Martin, que la disminución del colesterol sináptico en hipocampo es debido principalmente a una regulación positiva de la enzima CYP46A1. Esta baja en el nivel de colesterol interfiere con la movilidad de los receptores sinápticos, con los procesos de endocitosis y lleva a disfunciones en la memoria (Martín et al., 2014). Mas aún, recientemente fue demostrado que si se restauran los niveles de colesterol en el cerebro se logran rescatar los déficits bioquímicos, sinápticos y cognitivos de animales envejecidos (Martín et al., 2014; Palomer et al., 2016) y en un modelo animal de enfermedad de Huntington (Valenza et al., 2015). Experimentos realizados en modelos animales de senescencia prematura demostraron que la administración de una dieta rica en fitoesteroles prevenía exitosamente los deterioros en la memoria (Pérez- Camañás et al., 2016). Los fitoesteroles son compuestos de origen vegetal que comparten estructura y función similar al colesterol (Trautwein et al., 2007). A diferencia del colesterol, estos compuestos tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en las células del SNC (Vanmierlo et al., 2012). Estos antecedentes indican que la regulación de los niveles de colesterol es de suma importancia para el correcto funcionamiento de los circuitos nerviosos, por su parte el órgano de Corti no es una excepción ante estos procesos regulatorios. El rol del colesterol en las bicapas lipídicas consiste en reducir la flexibilidad y la fluidez aportando mayor estabilidad (Forges et al., 1978). En el oído interno, se ha descrito que las CCEs poseen un estricto mecanismo de mantenimiento de los niveles de colesterol en su pared lateral (Forge, 1991; Nguyen & Brownell, 1998; Rajagopalan et al., 2007). En particular la pared lateral tiene menor contenido de colesterol en comparación con la membrana basal y apical, o en comparación con las paredes de las células de soporte, dando lugar a que la rigidez de dicha pared sea menor (Nguyen & Brownell, 1998). Se ha postulado que las alteraciones en los niveles de colesterol en la pared lateral de las CCEs pueden modular la función o distribución de la prestina, proteína responsable de la electromotilidad de estas células (proceso que ha sido explicado en la sección de Introducción) (Rajagopalan et al., 2007; Sfondouris et al., 2008). Experimentos realizados en ratones C57B6/J de cuatro semanas de edad demuestran que la depleción de colesterol, vía la aplicación de ciclodextrina, o

la sobre carga de colesterol en membrana causa la reducción de la amplitud de los DPOAEs reflejando que los niveles de colesterol son importantes para el correcto funcionamiento de estas células. A su vez en CCEs aisladas, la depleción o sobrecarga de colesterol causa una alteración en la capacitancia no lineal, demostrando que la funcionalidad de las células se encuentra alterada (Rajagopalan et al., 2007). En el mismo trabajo se evidencia que las alteraciones mencionadas en los niveles de colesterol generan una agregación de prestina en la pared lateral en el caso de la sobre carga o una desagregación en el caso de la depleción, causando en cualquiera de los dos casos la alteración de su función.

Adicionalmente a la pérdida de colesterol debido al proceso de envejecimiento, existen ciertas drogas que incrementan la actividad de la enzima CYP46A1 y por lo tanto producen una disminución en los niveles de colesterol de la membrana de las células. Una de ellas es la droga efavirenz, un fármaco antirretroviral utilizado para tratar a los pacientes con VIH-SIDA. Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con efavirenz tanto *in vitro* como *in vivo* aumenta la actividad enzimática de CYP46A1 (Mast et al., 2014) llevando a una reducción en el contenido de colesterol de las membranas de las células.

La posible implicancia de la homeostasis del colesterol en las afecciones cocleares relacionadas con el envejecimiento sigue siendo un área poco caracterizada. Por lo tanto, el objetivo de esta sección es investigar inicialmente si la enzima CYP46A1 desempeña un papel crucial en mantener la homeostasis del colesterol en el oído interno, similar a su función en el SNC. Para ello, se analizarán los niveles de la enzima CYP46A1 en el tejido coclear de ratones jóvenes y envejecidos. Posteriormente, se evaluarán las consecuencias de la alteración farmacológica de los niveles de colesterol mediante la administración de la droga efavirenz (aprobada por la FDA para el tratamiento del VIH) y se examinará el efecto de la suplementación con fitoesteroles junto con la administración de dicho fármaco.

RESULTADOS

Homeostasis del colesterol en el oído interno durante el envejecimiento

La conversión de colesterol a 24(S)-hidroxycolesterol es llevada a cabo por la enzima CYP46A1 y constituye el principal mecanismo de eliminación de colesterol del cerebro (Lund et al., 2003). Trabajos previos realizados en ratas habían demostrado que durante el envejecimiento se incrementaban los niveles de esta enzima en el hipocampo a los dos años de edad, derivando en una

pérdida de colesterol de la membrana de neuronas hipocampales dando lugar a déficits cognitivos (Martin et al., 2014).

Para testear si los cambios en el contenido de colesterol de las células del oído interno podían estar involucrados en la presbiacusia, analizamos los niveles de CYP46A1 en el órgano de Corti de ratones de la cepa C57BL/6J de dos meses y dos años de edad. Esto fue realizado mediante experimentos de inmunohistoquímica en secciones agudas de órgano de Corti de ambos grupos de animales, usando anticuerpos antiCYP46A1 y anti-calretinina, para la marcación de las células ciliadas (*Figura 24*). Como se puede ver en las imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal de la *Figura 24a*, la marca de CYP46A1 está presente tanto en células sensoriales (CCIs y CCEs) como en células de soporte en ambos grupos etarios. Una vez obtenidas las imágenes, se procedió a realizar la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las distintas regiones de la cóclea: apical, medial y basal (*Figura 24b*). Los resultados mostraron que hay un incremento significativo de la fluorescencia de CYP46A1 en el epitelio sensorial de animales envejecidos. En las CCIs, el incremento de CYP46A1 se dio en las tres regiones estudiadas (t-test, $p < 0.0001$ en la región apical y medial y $p < 0.01$ en la región basal). En las CCEs remanentes de oídos de animales envejecidos, se encontró el mismo fenómeno de incremento (t-test, $p < 0.001$ en la región apical y $p < 0.0001$ en la región medial y basal). Asimismo, se encontró un incremento de la fluorescencia en las células de soporte en las regiones mediales y basales, pero no así en la zona apical (t-test, $p < 0.001$ en la zona basal y $p < 0.0001$ en la zona medial).

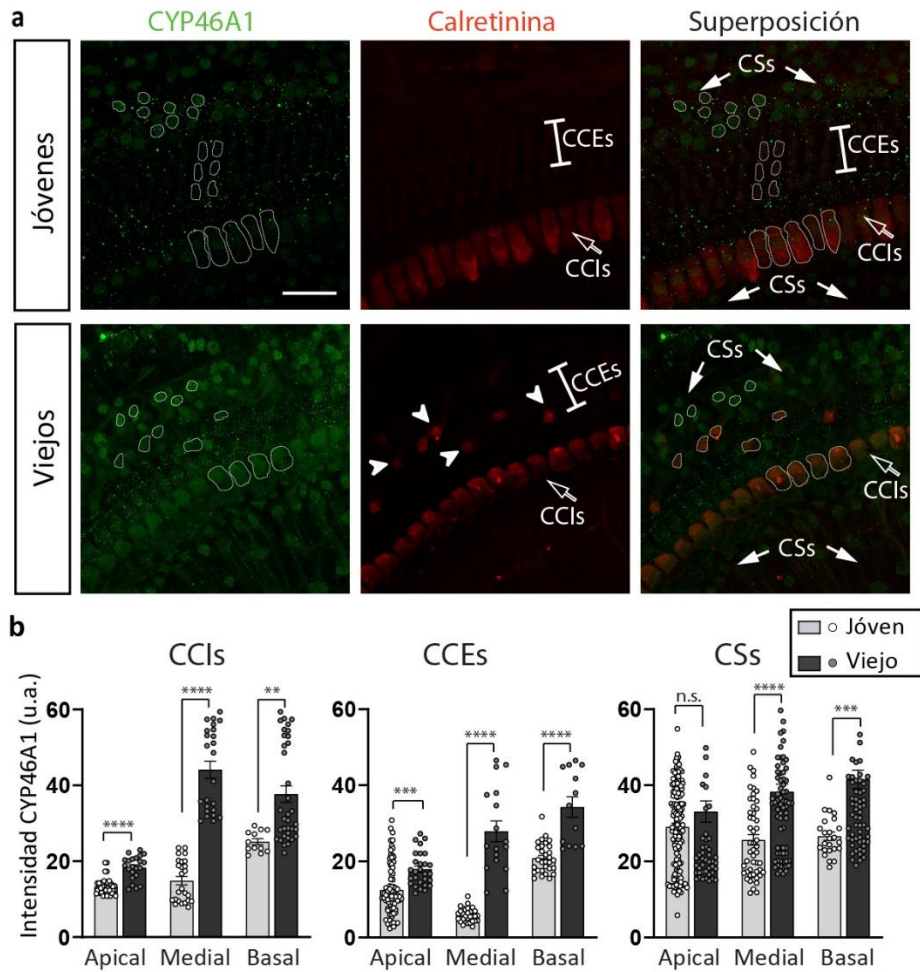


Figura 24| Expresión de CYP46A1 en tejido coclear. (a). Máximas proyecciones provenientes de z-stacks representativos de microscopia confocal de secciones mediales del órgano de Corti inmunomarcadas con un anticuerpo anti-CYP46A1 (verde) y anti-calretinina (rojo) de animales jóvenes (panel superior) y viejos (panel inferior). Barra de escala= 30μm. Las flechas blancas rellenas indican células de soporte (CSs), las cabezas de flecha indican las células ciliadas externas (CCEs) sobrevivientes y las flechas sin relleno indican las células ciliadas internas (CCIs). A su vez se dibujaron ROIs en células ejemplo de cada subtipo. **(b)** Datos cuantitativos obtenidos de 5 animales jóvenes (n=5) y 6 animales viejos (n=6). La cuantificación de la intensidad de CYP46A1 (u.a.= unidades arbitrarias) fue realizada a partir de los ROIs de células individuales en CCIs (izquierda), CCEs (medio) y CSs (derecha) a los dos meses y dos años de edad en las tres regiones de la cóclea: apical, medial y basal (Jóvenes: n=43 CCIs, 78 CCEs y 144 CSs en la porción apical; 25 CCIs, 29 CCEs y 51 CSs en la medial; y 12 CCIs, 31 CCEs y 24 CSs en la basal. Viejos: n= 22 CCIs, 28 CCEs y 55 CSs en la porción apical; 24 CCIs, 17 CCEs y 79 CSs en la medial; y 28 CCIs, 13 CCEs y 69 CSs en la basal). Las comparaciones estadísticas fueron hechas mediante prueba de T (**p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

En vista del aumento en la expresión de CYP46A1 en CCEs, CCIs y CSs de animales envejecidos, nos preguntamos si ese aumento se correlacionaba con una disminución en los niveles de colesterol de la membrana. Para lograr esto, se tomaron otras secciones del órgano de Corti y se empleó el

antibiótico filipina unido a un fluoróforo, el cual, como se ha explicado en la sección de materiales y métodos, se une a los colesteroles no esterificados. Como se evidencia en la *Figura 25*, en las células sensoriales, identificadas por su marcación con faloidina, se observó una disminución en los niveles de filipina en los animales de dos años en comparación con los de dos meses. Esta reducción en la intensidad de la filipina se atribuye a la disminución en los niveles de colesterol en dichos animales.

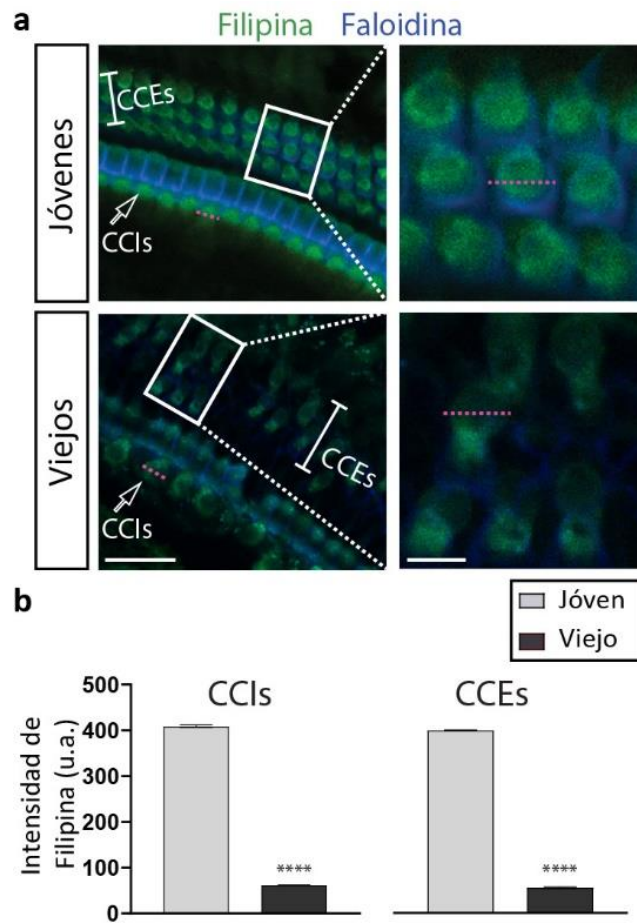


Figura 25| Contenido de colesterol en células sensoriales. (a) Imágenes de microscopia confocal representativas de secciones mediales de órgano de Corti marcadas con filipina (verde) para visualizar nivel de colesterol y faloidina (azul) para visualizar actina en los esterocilios (barra de escala 30µm). Las imágenes del panel superior corresponden a animales jóvenes, y las del panel inferior a animales envejecidos. En el panel de la derecha, se muestra una imagen magnificada (se utilizó un objetivo de inmersión de 63x) de la región indicada con rectángulos blancos. Las líneas punteadas rosa indican el diámetro de una CCI o CCE (barra de escala 8 µm). **(b)** Cuantificación de la intensidad de filipina, mostrada como la media ± SEM (u.a. unidades arbitrarias), para CCIs y CCEs, obtenidas a partir de la intensidad de cada píxel a lo largo de una línea que atraviesa la célula (mostrada en el panel (a) como una línea rosada). En ratones envejecidos (n=6) hubo una reducción significativa en el contenido de colesterol respecto de animales jóvenes (n=3) tanto en CCIs (Jóvenes: CCIs=104; Viejos: CCIs=52) como en CCEs (jóvenes: CCEs=200; Viejos: CCEs=22). Las comparaciones estadísticas fueron hechas mediante prueba de T (****p<0.0001).

Efecto de la activación farmacológica de CYP46A1 sobre la sensibilidad auditiva

Hasta aquí los resultados indicaban que el aumento en la marcación de la enzima CYP46A1 correlacionaba con la disminución en el contenido de colesterol en el oído interno durante el proceso de envejecimiento. Por lo tanto, el paso siguiente fue estudiar si la activación farmacológica de dicha enzima en animales jóvenes generaba los mismos efectos en los niveles de colesterol y desencadenaba algún tipo de déficit auditivo. Para inducir la activación de CYP46A1, utilizamos el fármaco efavirenz, reconocido por su aplicación en el tratamiento del VIH, el cual es conocido por tener un efecto en la activación de la enzima que degrada colesterol (Mast et al., 2014). Contábamos con el antecedente de que el efavirenz podía atravesar la barrera hematoencefálica y lograba estimular la enzima CYP46A1 con una dosis 300 veces menor que la utilizada en los tratamientos contra el VIH (Mast et al., 2014). La droga fue administrada con una dosis de 0.09 mg/kg/día durante cuatro semanas en el agua de bebida a ratones C57BL/6J de dos meses de edad. Estos animales a partir de ahora constituirán el grupo experimental que denominaremos “efavirenz”. La edad de los ratones fue elegida en base a estudios previos que demostraban la buena sensibilidad auditiva de la cepa C57BL/6J a los 2 meses de edad (Someya et al., 2009). De todas maneras, para corroborar que eso era así se evaluó vía ABR y DPOAE la sensibilidad auditiva de los animales previo al tratamiento (*Figura 26*). Luego de la administración de la droga por 4 semanas, se registraron los umbrales auditivos de los animales mediante las técnicas antes mencionadas. Los resultados mostraron que el tratamiento con efavirenz provocó un ligero aumento, aunque no significativo, de los umbrales de ABR comparados con el control ya sea a las 8 o 12 semanas (edad de inicio y finalización del tratamiento respectivamente) (*Figura 26 a, b*). Tampoco se advirtieron diferencias en las amplitudes de la primera onda del registro de ABR, lo cual significa que la administración de efavirenz no estaba modificando la función neural de la cóclea (*Figura 26 c*). Por otro lado, encontramos que los umbrales de productos de distorsión (DPOAE) eran significativamente mayores en los animales tratados en comparación a los controles para las frecuencias medias (Test de Kruskal-Wallis seguido de test de Dunn, $p < 0.05$ para 11.33, 16 y 22.65 kHz), indicando que la función de las CCEs estaba siendo afectada por el tratamiento con efavirenz (*Figura 26 d*). Como puede observarse en la *Figura 26e*, la amplitud media de la emisión a 16 kHz en función de la intensidad de estimulación se vio disminuida luego del tratamiento. Otra manera de mostrar dicha disminución graficando las transformadas de Fourier de los DPOAEs. En la *Figura 26f*, se observa que el producto de distorsión cúbico, 2f₁-f₂ (siendo f₁: 11.33 kHz y f₂: 16 kHz, respectivamente), con una intensidad de estimulación de 80 dB SPL, se ve disminuido en el grupo tratado con efavirenz respecto al control.

La pérdida de función de las células ciliadas externas puede ser rescatada por fitoesteroles

Como se ha descrito en la introducción, los fitoesteroles son compuestos naturales presentes en las plantas, con estructura y función similar a la que tiene el colesterol en células animales (Trautwein et al., 2007). Se ha visto que dietas ricas en estos compuestos previene los deterioros en la memoria en modelos murinos de senescencia acelerada (SAMP8) (Pérez-Cañamás et al., 2016). Basándonos en esa evidencia, propusimos que una dieta suplementada con fitoesteroles podía rescatar la funcionalidad de las CCEs que estaba siendo afectada por la pérdida de colesterol debido a la administración de efavirenz. Bajo esa premisa, se implementó un tratamiento de co-administración de efavirenz y fitoesteroles. El efavirenz, nuevamente, fue dado en la bebida durante cuatro semanas a ratones macho de la cepa C57BL/6J de dos meses, y durante las tres últimas semanas del tratamiento se los alimentó con una comida que contenía fitoesteroles (marca Vitatech) en una concentración 2% m/m. Los animales sometidos a ese tratamiento son los que a partir de ahora llamaremos “efavirenz+ fito”. Al igual que con el grupo “efavirenz”, al terminar el tratamiento se evaluó la sensibilidad auditiva de los animales vía ABR y DPOAE. Como se puede observar en la *Figura 26a-c*, los animales tratados con efavirenz y fitoesteroles no presentaron cambios en los umbrales de ABR ni en las amplitudes de la onda I comparados con los controles ni con los tratados únicamente con efavirenz. Sin embargo, hubo una disminución, aunque no significativa, en los umbrales de DPOAE de los animales que recibieron los fitoesteroles junto con efavirenz en comparación de los que solo recibieron efavirenz. Es importante remarcar que los umbrales de DPOAE entre los tratados con efavirenz+ fitoesteroles no muestran diferencias comparados con los controles (*Figura 26 d*).

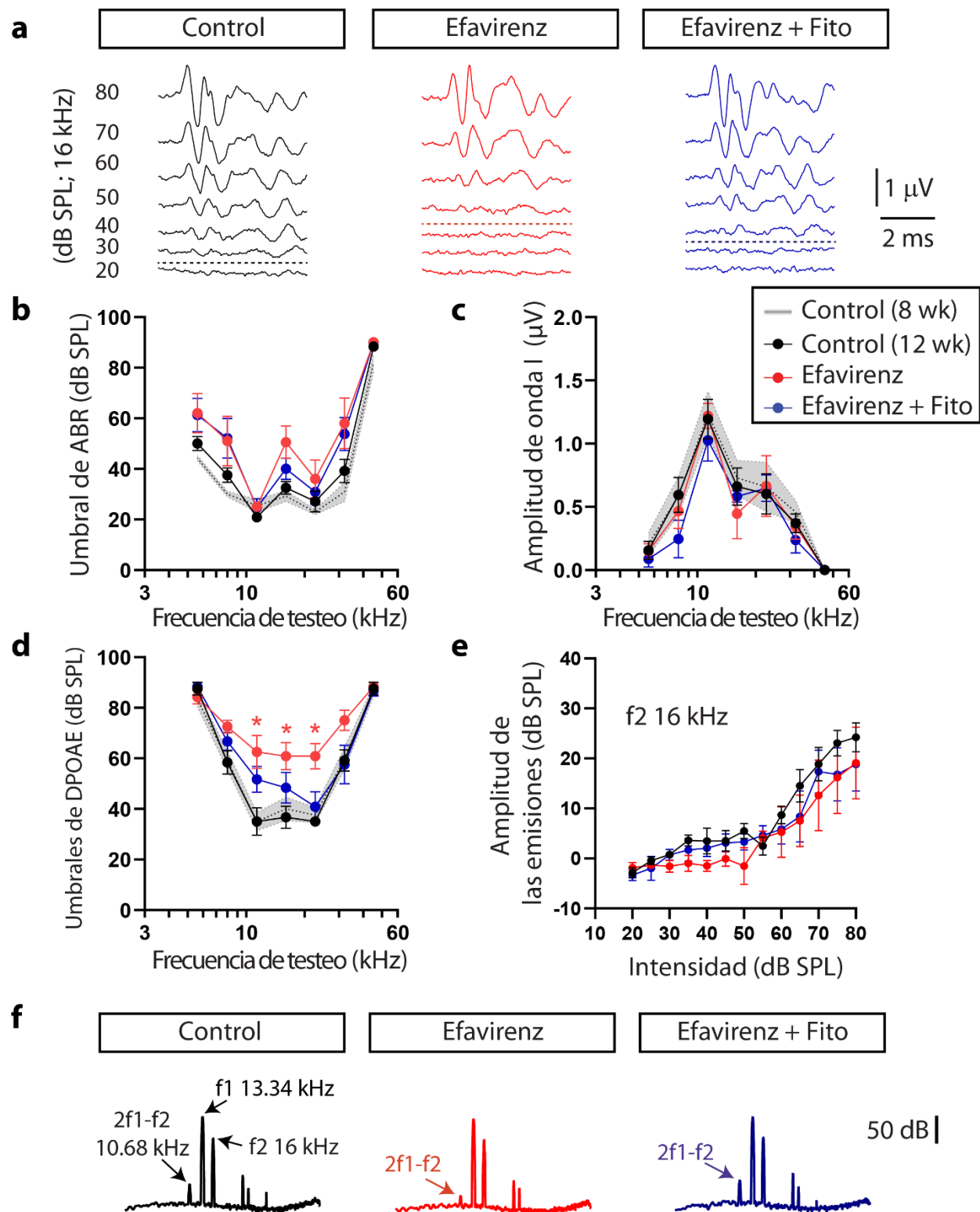


Figura 26| Funcionalidad auditiva en el grupo control, efavirenz y efavirenz + fitoesteroles. (a) Registros representativos de ABR de animales control (negro, n=6), efavirenz (rojo, n=6) y efavirenz+ fitoesteroles (azul, n=6) para un tono puro de 16 kHz a intensidades crecientes de estimulación (dB SPL). Los umbrales fueron detectados por la presencia de la onda 1 y están indicados con líneas punteadas para cada registro. Las barras de escala aplican para los tres registros. (b) Umbrales de ABR para los tres grupos experimentales a diferentes frecuencias de testeo. (c) Amplitudes de la primera onda de los registros de ABR, obtenidos a 80 dB SPL, para los tres grupos. (d) Umbrales de DPOAE a diferentes frecuencias de testeo. (e) Amplitudes de las emisiones en función del nivel de estimulación de la $f_2 = 16$ kHz en los tres grupos experimentales. Los datos mostrados representan las medias $\pm$ SEM. (f) Ejemplos de trazos, luego de una transformada de Fourier, mostrando la amplitud de la emisión cubica de DPOAE ($2f_1-f_2$), siendo $f_1=13.34$ kHz y $f_2=16$ kHz con una estimulación de f_2 igual a 80 dB SPL. Las comparaciones estadísticas fueron hechas mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba Dunn a posteriori de (* $p<0.05$).

Contenido de colesterol en las células ciliadas externas

Luego de realizar los testeos de sensibilidad auditiva, las cócleas de todos los animales fueron extraídas. Dado que los resultados hasta el momento mostraban una disfunción en las CCEs en los animales tratados con efavirenz, mientras que los co-tratados con fitoesteroles mostraban una recuperación en la función de estas decidimos medir el nivel de colesterol en estas células. Para ello realizamos nuevamente una tinción con filipina, para visualizar colesterol, y faloidina para identificar los esterocilios de las células sensoriales. Al analizar las imágenes obtenidas, encontramos una reducción significativa del nivel de colesterol en las CCEs del grupo efavirenz comparado con los otros dos grupos (*Figura 27*). El patrón de tinción de filipina se puede observar en la *Figura 27b*, donde se grafica la intensidad de filipina por píxel a lo largo de una línea que atravesaba por el centro dos CCEs. A lo largo de esta línea distinguimos que para el grupo control la intensidad es menor en la zona correspondiente a la membrana lateral de las células y aumenta en la región que se corresponde con el citoplasma. Este patrón de distribución particular se encuentra reducido en el grupo efavirenz y se recupera parcialmente con el suplemento de fitoestreroles. La intensidad de filipina fue medida para todas las CCEs de todos los grupos en las tres regiones del órgano de Corti. La reducción de colesterol en las CCEs luego del tratamiento con efavirenz fue significativa en las tres regiones (*Figura 27c*) (ANOVA de una vía, seguido de test de Tukey, $p<0.0001$ para todas las comparaciones). Por otro lado, en el grupo efavirenz + fitoesteroles se encontró un incremento en los niveles de colesterol de las CCEs comparado con el grupo tratado solo con efavirenz. Este aumento fue significativo en las tres regiones de la cóclea (ANOVA de una vía, seguido de test de Tukey, $p<0.0001$). Aunque los niveles de colesterol no alcanzaron los niveles presentes en el grupo control (ANOVA de una vía, seguido de test de Tukey, $p<0.0001$), el incremento en la tinción con filipina demuestra que los fitoesteroles pueden, al menos parcialmente, restaurar el contenido de esteroides en las membranas de las CCEs. En conjunto, todos los

resultados mostrados hasta aquí sugieren que la suplementación de fitoesteroles en la dieta logra recuperar parcialmente la función de las CCEs en animales tratados con efavirenz.

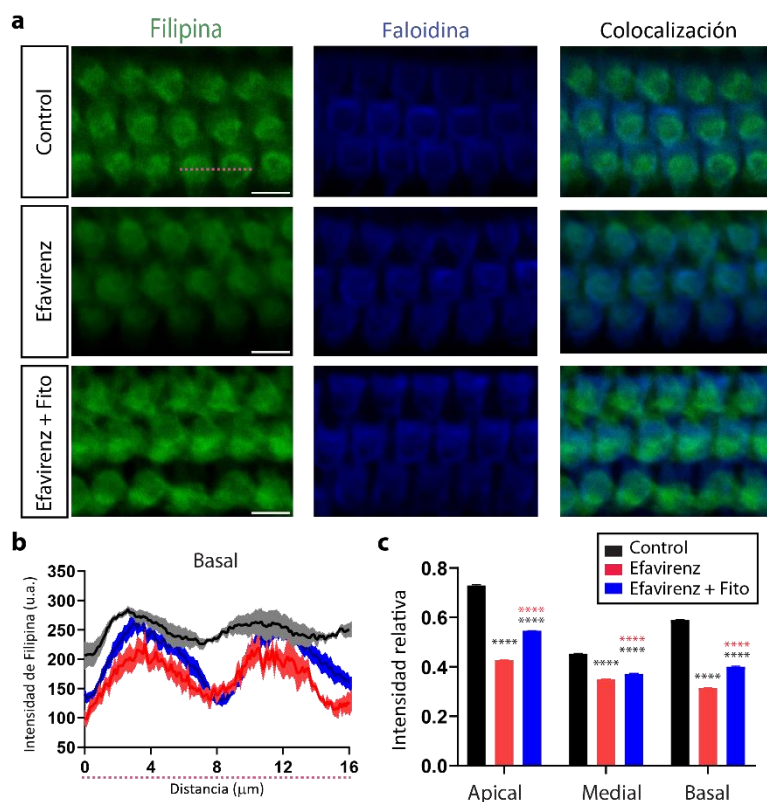


Figura 27 | Tinción con filipina en las CCEs en los grupos “control”, “efavirenz” y “efavirenz + fitoesteroles”. **(a)** Imágenes representativas provenientes de microscopia confocal de CCEs de secciones basales del órgano de Corti para los tres grupos experimentales. En el panel izquierdo mostramos el canal verde que corresponde a la marcación con filipina, para visualizar colesterol. En el panel central se encuentra el canal azul que corresponde a la marcación con faloidina para visualizar los esterocilios y en el panel de la derecha la superposición de ambos canales. La línea punteada rosada representa 16 μm aproximadamente, y es un ejemplo de las líneas que se trazaron a lo largo de dos CCEs para cuantificar la intensidad de filipina. Barra de escala = 8 μm. **(b)** Intensidad de fluorescencia de filipina (unidades arbitrarias) en función de la distancia (μm) a lo largo de una línea recta que atraviesa dos CCEs consecutivas. El trazado de color negro representa la media de 14 CCEs del grupo control, el rojo la media de 12 CCEs del grupo efavirenz y el azul 28 CCEs del grupo efavirenz + fitoesteroles. El sombreado que acompaña cada trazado representa el error estándar. La línea punteada rosa por debajo del eje x representa el largo de dos CCEs consecutivas. **(c)** Intensidad relativa (relativizada a la máxima intensidad hallada para cada grupo) de filipina para los tres grupos experimentales en las tres regiones cocleares estudiadas, apical, medial y basal. Las barras representan la media ± SEM. Las comparaciones estadísticas fueron hechas mediante ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, ****= $p < 0.0001$. (Grupo control: n= 80 CCEs en la región apical; 140 en la medial y 70 en la basal provenientes de 6 animales; Grupo efavirenz: n= 200 CCEs en la región apical; 70 en la medial y 65 en la basal provenientes de 6 animales y Grupo efavirenz + fitoesteroles: n=92 CCEs en la región apical, 115 en la medial y 77 en la basal provenientes de 6 animales)

Distribución de la prestina en las células ciliadas externas

Tomando en consideración que la prestina es un componente crítico de la membrana lateral de las CCEs y es esencial para la electromotilidad de las mismas, nos preguntamos si el incremento que observamos en los umbrales de DPOAEs en el grupo tratado con efavirenz podía ser explicado por alteraciones en la distribución de prestina dentro de la membrana plasmática. Los niveles de prestina en las CCEs de los distintos grupos fue evaluada por inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo anti-prestina y anti-calretinina (para visualizar células ciliadas). La medición fue realizada trazando una línea a través de cada una de las CCEs y midiendo la intensidad de fluorescencia de cada pixel a lo largo de esa línea. Como se puede observar en la *Figura 28a*, hubo una reducción en los niveles de prestina en las secciones correspondientes a ratones tratados con efavirenz en comparación con los controles. En el gráfico de perfiles de intensidad de la (*Figura 28a-c28b*) se visualiza que la prestina se ve más distribuida a lo largo del cuerpo celular y no tan concentrada la pared lateral, como si se ve en el grupo control. Notablemente, la suplementación con fitoesteroles en la dieta incrementó los niveles de prestina en la pared lateral de las CCEs en comparación a los tratados solo con efavirenz (*Figura 28 a-c*), llevando a una restauración parcial de la distribución normal de prestina *Figura 28 b-c*. En el panel inferior, *Figura 28b*, se muestra un gráfico representativo de la intensidad de prestina a lo largo de la zona media de una CCE en la región medial de la cóclea y en el panel superior se muestra una magnificación de una CCE proveniente del área señalada con un rectángulo blanco en la *Figura 28a*. En dicha magnificación, se señala una línea a modo de ejemplificar como fue la metodología de medición de intensidad para cada célula. La mencionada línea representa 8µm aproximadamente (diámetro aproximado de una CCE), los extremos rosados (0 a 2 µm y 6 a 8 µm) representan el espacio donde se sitúa la pared lateral de cada célula, mientras que la parte naranja (2 a 6 µm) representa el citoplasma de la célula. La intensidad de prestina en las áreas correspondientes a la pared lateral mostró una reducción en el grupo efavirenz comparado con el control y un leve pero significativo incremento en el grupo efavirenz + fitoesteroles. Para cuantificar el cambio en la distribución de prestina dentro de cada CCE en la región medial de la cóclea, unificamos por un lado todas las mediciones que correspondían a la pared lateral y por otro las que correspondían al citoplasma y calculamos la relación entre la intensidad de fluorescencia de esas regiones. Como se muestra en la *Figura 28c*, en la condición control, el valor de la relación fue mayor a 1, indicando una mayor presencia de prestina en la membrana de la célula comparado con el citoplasma. En el grupo de animales tratados con efavirenz, la relación cayó significativamente y fue menor a 1 (ANOVA de una vía, $p < 0.0001$ en todas las regiones)

mostrando una presencia mayor de prestina en el citoplasma comparado con la membrana lateral. Este efecto fue revertido en los animales del grupo efavirenz + fitoesteros en el cual la relación fue de 1.09 ± 0.03 . Este cociente no fue significativamente distinto en comparación con el control (ANOVA de una vía, $p > 0.05$). Finalmente, analizamos la intensidad media de prestina en cada región de la cóclea (apical, medial, basal) en los tres grupos. La reducción de la marca de prestina con efavirenz fue evidente en todas las regiones comparado contra el grupo Control (ANOVA de una vía, $p < 0.0001$ en todas las regiones). Notoriamente, la adición de fitoesteros en la dieta produce un aumento significativo en la intensidad de prestina por pixel en las tres regiones comparado con el grupo que solo fue tratado con efavirenz (ANOVA de una vía, $p < 0.0001$ en todas las regiones), aunque este incremento en la marcación de prestina no alcanzó los niveles del grupo control en la región medial y basal.

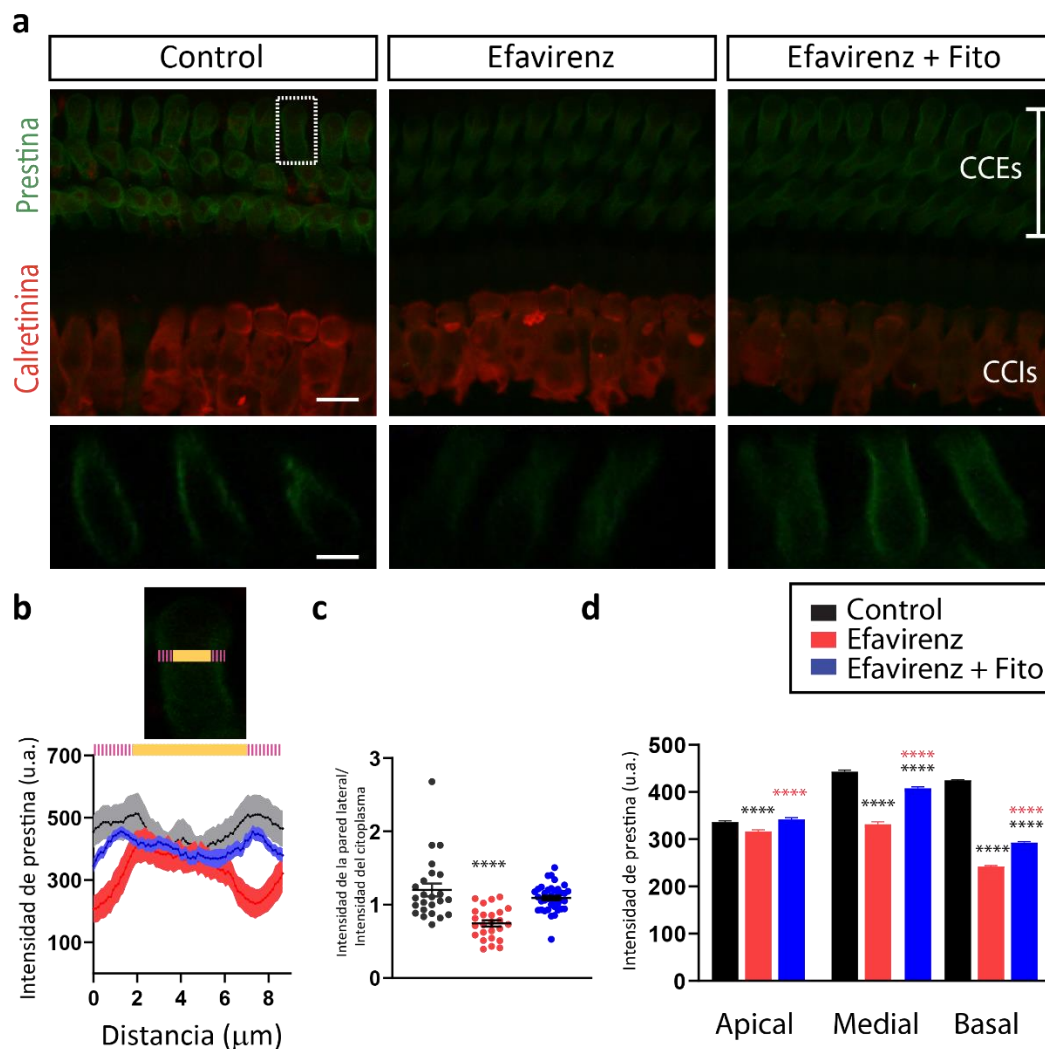


Figura 28| Expresión de prestina en las CCEs en el grupo control, efavirenz y efavirenz + fitoesteros. (a) Panel superior: Imágenes representativas de confocal de secciones mediales del órgano de Corti inmunomarcadas contra calretinina (rojo) y prestina (verde) en los tres grupos experimentales. Se indican las tres hileras de CCEs y la única

hilera de CCI. **Panel inferior:** Proyección en el eje yz de 3 CCEs. Barra de escala = 8mm. **(b) Panel superior:** Magnificación de una CCE, identificada en (a) con un rectángulo blanco. La línea rosada y amarilla representa aproximadamente el ancho de una CCE, 8mm. Los extremos rosados indican la región que corresponde a la membrana lateral de la célula, mientras que la parte amarilla representa el citoplasma de la misma. **Panel inferior:** Intensidad media de la fluorescencia de prestina a lo largo de una línea (como la mostrada en el panel superior) que atraviesa cada CCE de la región medial en función de la distancia para los tres grupos experimentales. **(c)** Relación entre el promedio de la intensidad de fluorescencia en la pared lateral y la intensidad en el citoplasma para los tres grupos experimentales. Control: 1.20 ± 0.09 , efavirenz: 0.74 ± 0.04 y efavirenz + fitoesteros: 1.09 ± 0.03 **(d)** Gráfico de barras que muestra la media en la intensidad de fluorescencia de prestina en la región apical, medial y basal. La intensidad fue medida trazando una línea a lo largo de tres CCEs consecutivas. En (c) y (d) se muestran las medias $\pm$ SEM. ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, ****= $p < 0.0001$. (Grupo control: n= 110 CCEs en la región apical, 60 en la medial y 76 en la basa; Grupo efavirenz: n= 75 CCEs en la región apical, 90 en la medial y 60 en la basal y para el Grupo Efavirenz+ Fitoesteros: n= 110 CCEs en la región apical, 105 en la medial y 80 en la basal).

En resumen, estos resultados indican que el contenido de colesterol en las CCEs decrece con la activación de CYP46A1 debido al tratamiento con efavirenz, llevando a una reducción de la proteína prestina en la membrana plasmática y produciendo una elevación de los umbrales de DPOAEs. Por último, estos resultados demostraron por primera vez que dicha pérdida de función puede ser parcialmente restaurada por la suplementación de fitoesteros en la dieta.

DISCUSIÓN

La sensibilidad auditiva de los mamíferos depende de la actividad electromótil de las CCEs para amplificar el movimiento de la membrana basilar (Brownell et al., 1985; Dallos 2008; Nguyen et al., 1998). Las CCEs son células altamente compartimentalizadas y pueden ser divididas en tres dominios: el dominio apical donde encontramos la placa cuticular y los estereocilios, el basal que contiene al núcleo y las sinapsis (aférentes y eférentes) y el dominio de la pared lateral. Ha sido demostrado que la propiedad electromótil de las CCEs reside en la pared lateral de las mismas (Dallos et al., 1991; Kalinec et al., 1992; Hallworth et al., 1993; Gale et al., 1997). Por esa razón, la composición lipídica de la membrana lateral de la célula es crítica para la mecánica coclear. En concordancia con esa idea, estudios realizados en CCEs aisladas han demostrado que la depleción de colesterol en sus membranas altera la actividad mecánica de estas células ante un cambio en el voltaje (Brownell et al., 2011), y se ha demostrado que existe una relación reversible entre los niveles de colesterol en membrana lateral y la dependencia de voltaje asociada al movimiento de la CCE mediado por prestina (Rajagopalan et al., 2007).

Trabajos previos han mostrado que el proceso de envejecimiento está asociado con alteraciones en el metabolismo del colesterol en el SNC, principalmente en el cerebro, y que el mismo

varía según la región estudiada. Por ejemplo, en neuronas del hipocampo se observa una pérdida de colesterol debido al aumento de la actividad de la enzima CYP46A1, esta enzima cataliza la conversión de colesterol a 24s-hidroxicolesterol (Martin et al., 2008). Esa pérdida de colesterol en las membranas de las neuronas hipocámpales genera que el desplazamiento lateral de los receptores de AMPA postsinápticos se vea alterado. Además, impide la endocitosis del receptor y afecta los mecanismos de transducción de señales activados por la estimulación neuronal. Todos estos eventos resultan en un deterioro cognitivo en animales envejecidos. Un punto interesante para destacar es que estos déficits cognitivos pueden ser rescatados ya sea por la perfusión de colesterol en el ventrículo lateral en ratones viejos o por la inhibición farmacológica *in vivo* de la CYP46A1 (Palomer et al., 2016). Esta evidencia nos llevó a investigar si el metabolismo alterado del colesterol en el oído interno podría ser un evento asociado y/o causante de la pérdida auditiva por envejecimiento (Malgrange et al., 2015).

Al comenzar nuestro estudio, uno de los primeros resultados de inmunofluorescencia nos permitió demostrar por primera vez la expresión de la enzima CYP46A1 en el oído interno en tres poblaciones celulares distintas (CCIs, CSs y CCEs) en animales jóvenes de la cepa C57BL7/6J (*Figura 24*). Llamativamente, los niveles de CYP46A1 incrementaron significativamente a la edad de 24 meses en esas mismas poblaciones celulares (*Figura 24b*). Paralelamente al incremento de CYP46A1, encontramos una reducción significativa en los niveles de colesterol en las células sensoriales a través de experimentos de marcación fluorescente con el antibiótico filipina (*Figura 25*). Al observar estos resultados, instantáneamente la pregunta que surgió fue si existía una relación causa-efecto directa entre esos eventos y para responderla decidimos realizar un protocolo en el cual a animales jóvenes de dos meses de edad se los trataba con la droga efavirenz, la cual específicamente activa a la CYP46A1. Decidimos empezar el tratamiento a los dos meses de edad para evitar la elevación de umbrales que se da en la cepa C57BL/6J entre los 8 y 10 meses de edad debido al envejecimiento (Someya et al., 2009). Apoyando nuestra hipótesis, encontramos que el tratamiento con efavirenz generó una reducción en los niveles de colesterol en las CCEs que fue acompañado por una función anormal de las mismas (*Figura 26c* y *Figura 27*). En efecto, las emisiones otacústicas fueron registradas para tener una medida objetiva de la funcionalidad de las CCEs como amplificadores cocleares a través de su propiedad electromótil (Avan et al., 2013; Brownell, 1990). En esos registros de emisiones otacústicas, observamos una elevación de entre 20 y 30 dB SPL en los umbrales de detección de la señal en las regiones medias y basales de la cóclea luego del tratamiento con efavirenz, indicando que la función de las CCEs se ve degrada cuando los niveles de colesterol están reducidos en esas células (*Figura 26d*). En el mismo grupo experimental, también se observó un leve incremento de los

umbrales de ABR (*Figura 26b*), aunque no fue significativo. Este aumento puede ser explicado por la funcionalidad alterada de las CCEs luego del tratamiento con efavirenz. Notoriamente, las amplitudes de la primera onda de los ABRs a 80 dB SPL no se vio alterada (*Figura 26c*) indicando que la función neural coclear estaba intacta y no había sido alterada por el tratamiento.

Otra de las preguntas que nos hicimos al ver estos resultados era si existía la posibilidad de rescatar la funcionalidad de las CCEs por una suplementación de fitoesteroles en la dieta de los animales tratados con efavirenz. Analizamos el efecto de los fitoesteroles luego de tres semanas de administración (co-administrados con efavirenz) y encontramos un incremento en la tinción de filipina en las CCEs, lo cual significa que los esteroides lograron llegar a la membrana de las células del órgano de Corti (*Figura 27*). Asimismo, encontramos una reducción en los umbrales de DPOAEs en los animales tratados con efavirenz + fitoesteroides (*Figura 26d*). Las medias para cada frecuencia de testeo fueron indistinguibles respecto a las medias de los controles, lo cual sugiere que la suplementación dietaria de fitoesteroides puede restaurar parcialmente la función de las CCEs.

Buscando la posible causa por la cual la reducción de colesterol en el grupo tratado con efavirenz genera una disfunción en las CCEs, evaluamos los niveles de prestina en dichas células para los tres grupos experimentales vía inmunomarcación (*Figura 28*). Estudios previos han demostrado que la depleción de colesterol disminuye la amplitud de las emisiones otacústicas *in vivo*, modifica la relación capacitancia vs potencial de membrana en células ciliadas externas y además altera la distribución de prestina en microdominios (Rajagopalan et al., 2007). La proteína prestina se encontró uniformemente distribuida a lo largo de la pared lateral de las CCEs en el grupo de células control y una reducción de su expresión conjuntamente con una alterada distribución fue observada en las células del grupo tratado con efavirenz. Notablemente, los fitoesteroides aportados en la dieta incrementaron los niveles de prestina en las CCEs con una aparente distribución normal a lo largo de la pared lateral (*Figura 28*). Las alteraciones en la distribución de prestina observadas probablemente no sean consecuencia únicamente de la reducción de colesterol, ya que se sabe que la composición lipídica de las membranas afecta considerablemente las propiedades mecánicas y biofísicas de estas como la fluidez y la rigidez (Nguyen et al., 1998). Reforzando esta idea, se sabe que la presencia del colesterol en las membranas de fibras aferentes maduras en pollos influencia la actividad de los canales de calcio voltaje dependientes y de los canales de potasio de tipo BK (Purcell et al., 2011). Adicionalmente, el colesterol puede ejercer su rol directamente uniéndose a otras proteínas de membrana afectando su conformación y dinámica (Jones et al., 1988; Radhakrishnan et al., 2004). Por lo tanto, la posible influencia del colesterol sobre la biofísica de los canales, así como también sobre la

localización de proteínas en membrana indica que el colesterol es un factor clave en el correcto funcionamiento del sistema auditivo. De todos modos, nuestros resultados claramente demuestran que la reducción de colesterol en las CCEs debido a la activación de CYP46A1 conduce a una reducción y a una alterada distribución de la proteína motora prestina, en paralelo a una elevación de los umbrales de DPOAEs. En base a lo observado, proponemos que este fenómeno puede estar ocurriendo en las primeras etapas del envejecimiento, antes de la degeneración de las CCEs, siendo al menos una de las múltiples causas de la pérdida de audición por envejecimiento (presbiacusia).

La presbiacusia es un proceso degenerativo progresivo y multicausal (Ren et al., 2013). El daño de los elementos que componen el sistema auditivo periférico y neural, junto con los cambios que ocurren a nivel central dentro de la vía auditiva contribuyen a la pérdida de agudeza auditiva (Hughes et al., 2010; Parthasarathy et al., 2018; Caspary et al., 2008). La degeneración periférica incluye la degeneración de la *stria vascularis*, de las células ciliadas, de las neuronas aferentes y fibrocitos. La acumulación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente por sus siglas en inglés), así como la homeostasis intracelular de calcio han sido propuestas como factores que contribuyen a la vulnerabilidad de las CCEs (especialmente en la región basal de la cóclea que codifica para las altas frecuencias) (Cruickshanks et al., 1998; Fettiplace et al., 2019). Con relación al calcio intracelular, estudios recientes de transcriptómica de células específicas han mostrado que las CCEs de ratones envejecidos (26 meses de edad) presentan mayor expresión del gen *Calb2*, el cual codifica para la proteína calretinina (Liu et al., 2022). La mencionada proteína se une a calcio y juega un rol crítico en mantener la homeostasis de calcio en las células cocleares durante el estrés celular (Lohmann et al., 1996). Llamativamente en nuestros experimentos de inmunohistoquímica, hemos visto un incremento en la expresión de calretinina en las CCEs remanentes en las cócleas de los animales a los dos años (*Figura 24a*). En varias regiones cerebrales, como el núcleo coclear postventral (PVCN, por sus siglas en inglés) y el núcleo coclear dorsal (DCN, por sus siglas en inglés) se reportaron incrementos en la expresión de calretinina en ratones envejecidos en comparación con los controles (Elliott et al., 2022) y ese incremento se correlacionó con la muerte de CCEs (Idrizbegovic et al., 2023; Caspary et al., 2018). Otro factor contribuyente a la pérdida auditiva durante el envejecimiento puede ser el aumento de actividad de CYP46A1. En neuronas de hipocampo cultivadas *in vitro*, la expresión de la enzima CYP46A1 es desencadenada por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Sodero et al., 2011; Ohyama et al., 2006). El hecho de que nuestros resultados demuestren que el tratamiento con fitoesteroides restaura parcialmente la función de las CCEs, abre la posibilidad de explorar una estrategia innovadora para prevenir o demorar el proceso de pérdida de agudeza auditiva por

envejecimiento. Tomando en consideración que la cepa de animales con la cual trabajamos, C57BL/6, tienen una pérdida de la capacidad auditiva en estadios tempranos de la adultez (8 a 10 meses), consideramos que en el futuro sería interesante repetir los experimentos en otras cepas como CBA/CaJ, la cual mantiene su agudeza auditiva hasta estadios más avanzados de la adultez. De esta manera, podremos explorar la progresión de la disminución de los niveles de colesterol y de la capacidad auditiva exclusivamente por el proceso de envejecimiento. En conjunto, nuestros resultados arrojan evidencias por primera vez que la activación de CYP46A1 produce déficits auditivos debido a la remoción de colesterol de las CCEs, con la consecuente alteración en la distribución de la proteína prestina. Más aún, hemos demostrado que el efecto de la pérdida de colesterol en las CCEs puede ser rescatado con la suplementación de fitoesteroles en la dieta.

Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento con efavirenz lleva a una reducción de los niveles de colesterol en las CCEs que se ve reflejada por la elevación de los umbrales de DPOAEs. Varios estudios han reportado un aumento en la incidencia de disfunciones auditivas, como efectos secundarios, entre los pacientes con VIH/SIDA que son tratados con terapias antirretrovirales (Thein et al., 2014; Khoza-Shangase, 2011). Hoy en día, las combinaciones de medicamentos utilizados frecuentemente para tratar a estos pacientes incluyen efavirenz, sugiriendo que el tratamiento prolongado puede causar déficits auditivos. De todas maneras, los mecanismos subyacentes a la pérdida auditiva entre estos pacientes no están del todo comprendidos. Trabajos realizados en ratones indican que existe una relación sinérgica entre las drogas anti-VIH y el ruido, con un incremento en los umbrales de DPOAE consistente con el daño inducido por estas drogas sobre las CCEs (Bektas et al., 2008). Efavirenz fue además reportado como una droga que decrece la viabilidad de células HEI-OC1 (células auditivas inmortalizadas) en cultivo en una relación dosis dependiente (Thein et al., 2014).

Los experimentos realizados en esta tesis revelan por primera vez un posible mecanismo por el cual el tratamiento con efavirenz puede provocar el daño auditivo. Mas aún, sienta las bases del uso de fitoesteroles como potencial estrategia terapéutica para tratar o dilatar el proceso de pérdida auditiva en los pacientes con VIH/SIDA que reciben terapias con anti retrovirales.

ANEXO

Tabla 1. Latencias de la onda I de ABR para los seis grupos experimentales. Los valores expresados corresponden a la media $\pm$ error estándar. La unidad de la medición es *mseg*.

Grupo experimental	Frecuencia (kHz)		
	8	16	22.65
WT P15	1,69 $\pm$ 0,11	1,59 $\pm$ 0,10	1,37 $\pm$ 0,08
WT P16 Control	1,71 $\pm$ 0,06	1,60 $\pm$ 0,06	1,59 $\pm$ 0,05
WT P16 1 día post TA	1,62 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,1	1,48 $\pm$ 0,08
WT P22 Control	1,57 $\pm$ 0,03	1,57 $\pm$ 0,07	1,36 $\pm$ 0,03
WT P22 7 días post TA	1,73 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,10	1,44 $\pm$ 0,04
WT P75 Control	1,68 $\pm$ 0,05	1,52 $\pm$ 0,07	1,49 $\pm$ 0,06
WT P75 2 meses post TA	1,62 $\pm$ 0,04	1,58 $\pm$ 0,06	1,51 $\pm$ 0,07
Kl α 9 P15	1,62 $\pm$ 0,08	1,44 $\pm$ 0,10	1,34 $\pm$ 0,05
Kl α 9 P16 Control	1,75 $\pm$ 0,04	1,61 $\pm$ 0,06	1,58 $\pm$ 0,03
Kl α 9 P16 1 día post TA	1,75 $\pm$ 0,06	1,55 $\pm$ 0,06	1,51 $\pm$ 0,05
Kl α 9 P22 Control	1,65 $\pm$ 0,07	1,65 $\pm$ 0,06	1,5 $\pm$ 0,07
Kl α 9 P22 7 días post TA	1,71 $\pm$ 0,04	1,64 $\pm$ 0,05	1,45 $\pm$ 0,05
Kl α 9 P75 Control	1,6 $\pm$ 0,04	1,59 $\pm$ 0,05	1,44 $\pm$ 0,06
Kl α 9 P75 2 meses post TA	1,62 $\pm$ 0,03	1,57 $\pm$ 0,04	1,36 $\pm$ 0,04
KO α 9 P15	1,7 $\pm$ 0,1	1,55 $\pm$ 0,1	1,44 $\pm$ 0,1
KO α 9 P16 Control	1,61 $\pm$ 0,13	1,52 $\pm$ 0,08	1,42 $\pm$ 0,06
KO α 9 P16 1 día post TA	1,64 $\pm$ 0,08	1,60 $\pm$ 0,10	1,42 $\pm$ 0,08
KO α 9 P22 Control	1,74 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,08	1,59 $\pm$ 0,03
KO α 9 P22 7 días post TA	1,80 $\pm$ 0,02	1,67 $\pm$ 0,03	1,53 $\pm$ 0,06
KO α 9 P75 Control	1,60 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,08	1,42 $\pm$ 0,06
KO α 9 P75 2 meses post TA	1,59 $\pm$ 0,09	1, 51 $\pm$ 0,02	1,44 $\pm$ 0,06

Tabla 2. Latencias de la onda II de ABR para los seis grupos experimentales. Los valores expresados corresponden a la media $\pm$ error estándar. La unidad de la medición es *mseg*.

Grupo experimental	Frecuencia (kHz)		
	8	16	22.65
WT P15	2,46 $\pm$ 0,13	2,24 $\pm$ 0,12	2,28 $\pm$ 0,11
WT P16 Control	2,29 $\pm$ 0,15	2,20 $\pm$ 0,22	2,27 $\pm$ 0,14
WT P16 1 día post TA	2,29 $\pm$ 0,13	2,29 $\pm$ 0,10	2,34 $\pm$ 0,10
WT P22 Control	2,34 $\pm$ 0,07	2,34 $\pm$ 0,08	2,16 $\pm$ 0,07
WT P22 7 días post TA	2,31 $\pm$ 0,15	2,3 $\pm$ 0,18	2,2 $\pm$ 0,16
WT P75 Control	2,33 $\pm$ 0,07	2,22 $\pm$ 0,08	2,26 $\pm$ 0,08
WT P75 2 meses post TA	2,35 $\pm$ 0,11	2,38 $\pm$ 0,06	2,27 $\pm$ 0,07
Kl α 9 P15	2,48 $\pm$ 0,16	1,98 $\pm$ 0,18	2,52 $\pm$ 0,06
Kl α 9 P16 Control	2,29 $\pm$ 0,08	2,09 $\pm$ 0,11	1,96 $\pm$ 0,14
Kl α 9 P16 1 día post TA	2,05 $\pm$ 0,09	1,80 $\pm$ 0,07	1,95 $\pm$ 0,83
Kl α 9 P22 Control	2,04 $\pm$ 0,13	1,93 $\pm$ 0,18	2,01 $\pm$ 0,07

Klα9 P22 7 días post TA	2,12 ± 0,05	2,07 ± 0,08	1,97 ± 0,06
Klα9 P75 Control	2,6 ± 0,09	2,46 ± 0,05	2,39 ± 0,1
Klα9 P75 2 meses post TA	2,47 ± 0,07	2,48 ± 0,07	2,31 ± 0,1
KOα9 P15	2,44 ± 0,12	2,03 ± 0,14	2,01 ± 0,08
KOα9 P16 Control	2,34 ± 0,22	2,33 ± 0,16	2,28 ± 0,11
KOα9 P16 1 día post TA	2,26 ± 0,08	2,2 ± 0,14	2,02 ± 0,14
KOα9 P22 Control	2,43 ± 0,12	2,21 ± 0,14	2,20 ± 0,17
KOα9 P22 7 días post TA	2,39 ± 0,17	2,16 ± 0,13	2,04 ± 0,16
KOα9 P75 Control	2,5 ± 0,09	2,23 ± 0,12	2,44 ± 0,09
KOα9 P75 2 meses post TA	2,34 ± 0,16	2,39 ± 0,12	2,32 ± 0,06

Tabla 3. Latencias de la onda III de ABR para los seis grupos experimentales. Los valores expresados corresponden a la media ± error estándar. La unidad de la medición es *mseg*.

Grupo experimental	Frecuencia (kHz)		
	8	16	22.65
WT P15	3,7 ± 0,28	3,45 ± 0,26	3,42 ± 0,2
WT P16 Control	4,04 ± 0,3	4,08 ± 0,3	3,84 ± 0,28
WT P16 1 día post TA	3,28 ± 0,22	3,44 ± 0,23	3,63 ± 0,24
WT P22 Control	3,76 ± 0,14	3,88 ± 0,21	3,36 ± 0,4
WT P22 7 días post TA	3,86 ± 0,14	3,84 ± 0,3	3,7 ± 0,21
WT P75 Control	3,54 ± 0,10	3,28 ± 0,11	3,15 ± 0,07
WT P75 2 meses post TA	3,71 ± 0,12	3,43 ± 0,12	3,46 ± 0,10
Klα9 P15	3,6 ± 0,11	3,41 ± 0,23	3,82 ± 0,31
Klα9 P16 Control	4,4 ± 0,18	4,1 ± 0,24	3,75 ± 0,23
Klα9 P16 1 día post TA	4,3 ± 0,18	3,72 ± 0,24	4,03 ± 0,16
Klα9 P22 Control	3,73 ± 0,20	3,76 ± 0,22	4,03 ± 0,15
Klα9 P22 7 días post TA	3,8 ± 0,13	3,9 ± 0,16	3,47 ± 0,13
Klα9 P75 Control	3,55 ± 0,13	3,82 ± 0,21	3,52 ± 0,18
Klα9 P75 2 meses post TA	3,39 ± 0,13	3,57 ± 0,13	3,4 ± 0,19
KOα9 P15	3,31 ± 0,3	3,25 ± 0,18	3,2 ± 0,09
KOα9 P16 Control	3,26 ± 0,24	3,5 ± 0,21	3,11 ± 0,15
KOα9 P16 1 día post TA	3,6 ± 0,23	3,59 ± 0,18	3,39 ± 0,13
KOα9 P22 Control	3,78 ± 0,11	3,57 ± 0,16	3,8 ± 0,13
KOα9 P22 7 días post TA	4,02 ± 0,15	3,83 ± 0,24	3,74 ± 0,20
KOα9 P75 Control	3,39 ± 0,09	3,28 ± 0,14	3,4 ± 0,15
KOα9 P75 2 meses post TA	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,13	3,44 ± 0,16

Tabla 4. Peso de los animales utilizados en el Capítulo II, terminados los respectivos tratamientos. Valores expresados en gramos.

Tratamiento	Peso (gr)
Control	28.8 ± 0.4
Efavirenz	27.0 ± 0.9
Efavirenz + Fitoesteroles	27.9 ± 0.2

Tabla 5. Peso de los animales utilizados en el Capítulo I. Valores expresados en gramos.

Grupo	Peso (gr)
WT P15	8.13 ± 0.19
WT P16 Control	7.9 ± 0.3
WT P16 1 día post TA	8.3 ± 0.4
WT P22 Control	11.6 ± 0.4
WT P22 7 días post TA	10.1 ± 0.3
WT P75 Control	24.8 ± 0.9
WT P75 2 meses post TA	25.9 ± 1.03
KIα9 P15	8.4 ± 0.3
KIα9 P16 Control	8.6 ± 0.4
KIα9 P16 1 día post TA	8 ± 0.4
KIα9 P22 Control	11.3 ± 0.4
KIα9 P22 7 días post TA	11.2 ± 0.4
KIα9 P75 Control	24.9 ± 0.7
KIα9 P75 2 meses post TA	26 ± 0.9
KOα9 P15	8.12 ± 0.3
KOα9 P16 Control	8.7 ± 0.4
KOα9 P16 1 día post TA	8.5 ± 0.3
KOα9 P22 Control	10.3 ± 0.3
KOα9 P22 7 días post TA	9.8 ± 0.3
KOα9 P75 Control	25.3 ± 1
KOα9 P75 2 meses post TA	25 ± 0.5

BIBLIOGRAFÍA

American Academy of Pediatrics, Committee on Environmental Health. Noise: a hazard for the fetus and newborn. Pediatrics (1997) 100:724–7.

Antoli-Candela FJ, Kiang NYS (1978) Unit activity underlying the N1 potential. In: Evoked electrical activity in the auditory nervous system (Naunton R, Fernandez C, eds), pp 165–191.

Ashmore JF (1987) A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. J Physiol 388:323–347.

Ashmore, J (2008) Cochlear outer hair cell motility. Physiol. Rev 173-210.

Avan P, Büki B, Petit C (2013) Auditory Distortions: Origins and Functions. Physiol Rev 93:1563–1619.

Babola, T. A., Li, S., Gribizis, A., Lee, B. J., Issa, J. B., Wang, H. C., Crair, M. C., & Bergles, D. E. (2018). Homeostatic Control of Spontaneous Activity in the Developing Auditory System. Neuron, 99(3), 511-524.e5.

Barclay, M., Ryan, A.F., y Housley, G.D (2011) Type I vs type II spiral ganglion neuronsexhibit differential survival and neuritogenesis during cochlear development. Neural Dev 6, 33.

Bektas D, Martin GK, Stagner BB, Lonsbury-Martin BL (2008) Noise-Induced Hearing Loss in Mice Treated with Antiretroviral Drugs. *Hear Res* 239:69–78.

Bergeron, A.L., Schrader, A., Yang, D., Osman, A. and Simmons, D.D. (2005). The final stage of cholinergic differentiation occurs below inner hair cells during development of the rodent cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 6, 401-415.

Berglund AM, Ryugo DK (1987) Hair cell innervation by spiral ganglion neurons in the mouse. *J Comp Neurol* 255:560–570.

Beurg M, Evans MG, Hackney CM, Fettiplace R (2006) A large-conductance calcium-selective mechanotransducer channel in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 26:10992–11000.

Beutner D, Moser T (2001) The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing. *J Neurosci* 21:4593–4599.

Björkhem I (2006) Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med* 260:493–508.

Boero LE, Castagna VC, Di Guilmi MN, Goutman JD, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME (2018) Enhancement of the Medial Olivocochlear System prevents Hidden Hearing Loss. *Journal of Neuroscience* 38(34):7440–7451.

Boero LE, Payne S, Gómez-Casati ME, Rutherford MA, Goutman JD (2021) Noise Exposure Potentiates Exocytosis From Cochlear Inner Hair Cells. *Front Synaptic Neurosci.* 13:740368.

Bosher, S.K., y Warren, R.L (1971) A study of the electrochemistry and osmotic relationships of the cochlear fluids in the neonatal rat at the time of the development of the endocochlear potential. *J. Physiol* 212, 739-761.

Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003) CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23:10832–10840.

Brown MC (1987) Morphology of labeled afferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol* 260:591–604.

Brown MC (1989) Morphology and response properties of single olivocochlear fibers in the guinea pig. *Hear Res* 40:93–109.

Brown MC (2014) Single-unit labeling of medial olivocochlear neurons: the cochlear frequency map for efferent axons. *J Neurophysiol* 111:2177–2186.

Brownell W, Bader C, Bertrand D, Ribaupierre Y (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* (80-) 227:194–196.

Brownell WE, Jacob S, Hakizimana P, Ulfendahl M, Fridberger A (2011) Membrane cholesterol modulates cochlear electromechanics. *Pflugers Arch* 461:677–686.

Buchwald JS, Huang C (1975) Far-field acoustic response: origins in the cat. *Science* 189:382–384.

Bulankina AV, Moser T (2012) Neural circuit development in the mammalian cochlea. *Physiology (Bethesda)* 27:100–112.

Buño W (1978) Auditory nerve fiber activity influenced by contralateral ear sound stimulation. *Exp Neurol* 59:62–74.

- Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF (2008) Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol* 211:1781–1791.
- Caspary DM, Llano DA (2018) Aging Processes in the Subcortical Auditory System. *Oxford Handbook Audit Brainstem* 639–679.
- Clause, A., Kim, G., Sonntag, M., Weisz, C.J.C., Vetter, D.E., Rübsamen, R., y Kandler, K. (2014). The Precise Temporal Pattern of Prehearing Spontaneous Activity Is Necessary for Tonotopic Map Refinement. *Neuron* 82, 822-835.
- Clause, A., Lauer, A.M., y Kandler, K. (2017). Mice Lacking the Alpha9 Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Exhibit Deficits in Frequency Difference Limens and Sound Localization. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1-12.
- Chang EF, Merzenich MM (2003) Environmental noise retards auditory cortical development. *Science* 300(5618):498-502.
- Chen Z, Peppi M, Kujawa SG, Sewell WF (2009) Regulated expression of surface AMPA receptors reduces excitotoxicity in auditory neurons. *J Neurophysiol* 102:1152–1159.
- Corey DP, Hudspeth AJ (1979) Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature* 281:675–677.
- Couperus JW, Mangun GR (2010) Signal enhancement and suppression during visual-spatial selective attention. *Brain Res* 1359:155–177.
- Cruickshanks KJ, Wiley TL, Tweed TS, Klein BEK, Klein R, Mares-Perlman JA, et al (1998) Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin. The Epidemiology of Hearing Loss Study. *Am J Epidemiol.* 148:879–886.
- Dai B, Chen C, Long Y, Zheng L, Zhao H, Bai X, Liu W, Zhang Y, Liu L, Guo T, Ding G, Lu C (2018) Neural mechanisms for selectively tuning in to the target speaker in a naturalistic noisy situation. *Nat Commun* 9(1):2405
- Dallos P (1985) Response characteristics of mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 5:1591– 1608.
- Dallos P (1992) The active cochlea. *J Neurosci* 12:4575–4585
- Dallos P (2008) Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr Opin Neurobiol.* 18:370–376.
- Dallos P, Evans BN, Hallworth R. (1991) Nature of the motor element in electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature.* 350:155–157.
- Dallos P, Santos-Sacchi J, Flock Å (1982) Intracellular recordings from cochlear outer hair cells. *Science* (80-) 218:582–584.
- Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WHY, Sengupta S, He DZZ, Zuo J (2008) Prestin-Based Outer Hair Cell Motility Is Necessary for Mammalian Cochlear Amplification. *Neuron* 58:333–339.
- Darrow KN, Maison SF, Liberman MC (2006a) Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity. *Nat Neurosci* 9:1474–1476.
- Darrow KN, Simons EJ, Dodds L, Liberman MC (2006b) Dopaminergic innervation of the mouse inner ear: Evidence for a separate cytochemical group of cochlear efferent fibers. *J Comp Neurol* 498:403–414.

- Davis AC, Wood S (1992) The epidemiology of childhood hearing impairment: factors relevant to planning of services. *Br J Audiol* 26:77–91.
- Deal JA, Goman AM, Albert MS, Arnold ML, Burgard S, Chisolm T, Couper D, Glynn NW, Gmelin T, Hayden KM, Mosley T, Pankow JS, Reed N, Sanchez VA, Richey Sharrett A, Thomas SD, Coresh J, Lin FR (2018) Hearing treatment for reducing cognitive decline: Design and methods of the Aging and Cognitive Health Evaluation in Elders randomized controlled trial. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* 4:499–507.
- Delacroix L, Malgrange B (2015) Cochlear afferent innervation development. *Hear Res* 330:157–169.
- Delano PH, Elgueda D, Hamame CM, Robles L (2007) Selective attention to visual stimuli reduces cochlear sensitivity in chinchillas. *J Neurosci* 27:4146–4153.
- Demanez L, Boniver V, Dony-Closon B, Lhonneux-Ledoux F, Demanez JP (2003) Central Auditory Processing Disorders: Some cohorts studies. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 57:291–299.
- Dietschy JM (2009) Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem* 390:287–293.
- Di Guilmi MN, Boero LE, Castagna VC, Rodríguez-Contreras A, Wedemeyer C, Gómez-Casati ME, Elgoyhen AB (2019) Strengthening of the Efferent Olivocochlear System Leads to Synaptic Dysfunction and Tonotopy Disruption of a Central Auditory Nucleus. *Journal of Neuroscience* 39(36):7037–7048.
- Ding D, Zhang J, Li W, Li D, Yu J, Wu X, Qi W, Liu F, Jiang H, Shi H, Sun H, Li P, Huang W, Salvi R (2020) Can auditory brain stem response accurately reflect the cochlear function? *J Neurophysiol* 124(6):1667–1675.
- Ding N, Simon JZ (2013) Adaptive Temporal Encoding Leads to a Background-Insensitive Cortical Representation of Speech. *J Neurosci* 33:5728–5735.
- Dolan DF, Nuttall AL (1988) Masked cochlear whole-nerve response intensity functions altered by electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle. *J Acoust Soc Am* 83:1081–1086.
- Douek E, Bannister LH, Dodson HC, et al (1976) Effects of incubator noise on the cochlea of the newborn. *Lancet* 2:1110–13.
- Echteler SM (1992) Developmental segregation in the afferent projections to mammalian auditory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6324–6327.
- Edge AS, Chen Z-Y (2008) Hair cell regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 18:377–382.
- Egawa J, Pearn ML, Lemkuil BP, Patel PM, Head BP (2016) Membrane lipid rafts and neurobiology: age related changes in membrane lipids and loss of neuronal function. *J Physiol* 594:4565.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705–715.
- Elgoyhen AB, Katz E (2012) The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris* 106:47–56.
- Elgoyhen AB, Langguth B, De Ridder D, Vanneste S (2015) Tinnitus: perspectives from human neuroimaging. *Nat Rev Neurosci* (10):632–42.

- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin C V, Heinemann SF, Boulter J (2001) Alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501–3506.
- Elliott KL, Fritzsche B, Yamoah EN, Zine A (2022) Age-Related Hearing Loss: Sensory and Neural Etiology and Their Interdependence. *Front Aging Neurosci.* 14:1–16.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309–373.
- Fakler B, Adelman JP (2008) Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59:873–881.
- Fabelo N, Martín V, Martín R, Santpere G, Aso E, Ferrer I, et al (2012) Evidence for premature lipid raft aging in APP/PS1 double-transgenic mice, a model of familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71:868–881.
- Fetoni AR, Pisani A, Rolesi R, Paciello F, Viziano A, Moleti A, Sisto R, Troiani D, Paludetti G, Grassi C (2022) Early Noise-Induced Hearing Loss Accelerates Presbycusis Altering Aging Processes in the Cochlea. *Front Aging Neurosci.* 14:803973.
- Fettiplace R (2017) Hair cell transduction, tuning, and synaptic transmission in the mammalian cochlea. *Compr Physiol* 7:1197–1227.
- Fettiplace R, Nam JH (2019) Tonotopy in calcium homeostasis and vulnerability of cochlear hair cells. *Hear Res.* 376:11–21.
- Fernandez KA, Jeffers PWC, Lall K, Liberman MC, Kujawa SG (2015) Aging after noise exposure: Acceleration of cochlear synaptopathy in “recovered” ears. *J Neurosci* 35:7509–7520.
- Flores ENN, Duggan A, Madathany T, Hogan AKK, Márquez FGG, Kumar G, Seal RPP, Edwards RHH, Liberman MCC, García-Añoveros J (2015) A Non-canonical Pathway from Cochlea to Brain Signals Tissue-Damaging Noise. *Curr Biol* 25:606–612.
- Forge A (1991) Structural features of the lateral walls in mammalian cochlear outer hair cells. *Cell Tissue Res.* 265:473–483.
- Forge A, Knowles PF, Marsh D (1978) Morphology of egg phosphatidylcholine-cholesterol single bilayer vesicles studied by freeze-etch electron microscopy. *J Memb Biol* 41:249–263
- Fridberger A, Flock Å, Ulfendahl M, Flock B (1998) Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca^{2+} concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7127–7132.
- Fritz JB, Elhilali M, David S V, Shamma SA (2007) Auditory attention - focusing the searchlight on sound. *Curr Opin Neurobiol* 17:437–455.
- Fritzsche, B., y Nichols, D.H. (1993). Dil reveals a prenatal arrival of efferents at the differentiating otocyst of mice. *Hear. Res.* 65, 51-60.
- Frolenkov GI, Belyantseva I, Friedman TB, Griffith AJ (2004) Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat Rev Genet.* 5(7):489-98
- Fuchs PA (1996) Synaptic transmission at vertebrate hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 6:514–519.
- Fuchs PA (2005) Time and intensity coding at the hair cell ribbon synapse. *J Physiol* 566:7–12.

- Fuchs PA (2014) A “calcium capacitor” shapes cholinergic inhibition of cochlear hair cells. *J Physiol* 592:3393–3401.
- Fuchs PA, Evans MG, Murrow BW (1990) Calcium currents in hair cells isolated from the cochlea of the chick. *J Physiol* 429:553–568.
- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:452–458.
- Fuchs PA, Lehar M, Hiel H (2014) Ultrastructure of cisternal synapses on outer hair cells of the mouse cochlea. *J Comp Neurol* 522:717–729.
- Furman AC, Kujawa SG, Liberman MC (2013) Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. *J Neurophysiol* 110:577–586.
- Gabriele, M.L., Brunso-Bechtold, J.K. & Henkel, C.K. (2000) Plasticity in the development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat after unilateral cochlear ablation. *J. Neurosci.*, 20, 6939–6949.
- Galambos R (1955) Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 5:424–437.
- Galambos R, Davis H (1943) The response of single auditory-nerve fibers to acoustic stimulation. *J Neurophysiol* 6:39–57.
- Gale JE, Ashmore JF (1997) An intrinsic frequency limit to the cochlear amplifier. *Nature*. 389:63–66.
- Gates GA, Mills JH (2005) Presbycusis. *Lancet* (London, England) 366:1111–1120.
- Geal-Dor, M., Freeman, S., Li, G., & Sohmer, H. (1993) Development of hearing in neonatal rats: Air and bone conducted ABR thresholds. *Hear. Res.* 69, 236-242.
- Gifford, M.L., & Guinan, J.J. (1983). Effects of crossed-olivocochlear-bundle stimulation on cat auditory nerve fiber responses to tones. *J. Acoust. Soc. Am.* 74, 115-123.
- Gifford ML, Guinan JJ (1987) Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hear Res* 29:179–194.
- Gilels F, Paquette ST, Zhang J, Rahman I, White PM (2013) Mutation of foxo3 causes adult onset auditory neuropathy and alters cochlear synapse architecture in mice. *J Neurosci* 33:18409–18424
- Gleich O, Wilson S (1993) The diameters of guinea pig auditory nerve fibers: distribution and correlation with spontaneous rate. *Hear Res.* 71(1-2):69-79.
- Glowatzki E; Fuchs, PA. (2000). Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science* 288, 2366-2368.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147–154.
- Glowatzki E, Grant L, Fuchs PA (2008) Hair cell afferent synapses. *Curr Opin Neurobiol* 18:389–395.
- Gogos JA, Osborne J, Nemes A, Mendelsohn M, Axel R (2000) Genetic Ablation and Restoration of the Olfactory Topographic Map. *Cell* 103:609–620.

- Gómez-Casati, M.E., Fuchs, P., Albert, Elgoyhen, A.B., y Katz, E (2005) Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear innerhair cells. *J. Physiol.* 566, 103-118.
- Goutman JD, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME (2015) Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. *FEBS Lett* 589:3354–3361.
- Goutman, J.D., Fuchs, P.A., y Glowatzki, E. (2005). Facilitating efferent inhibition of inner hair cells in the cochlea of the neonatal rat. *J. Physiol.* 566, 49-59.
- Graydon K, Waterworth C, Miller H, Gunasekera H (2019) Global burden of hearing impairment and ear disease. *J Laryngol Otol* 133:18–25.
- Grécová J, Bures Z, Popelár J, Suta D, Syka J (2009) Brief exposure of juvenile rats to noise impairs the development of the response properties of inferior colliculus neurons. *Eur J Neurosci.* 29(9):1921-30.
- Guinan JJ (1996) Physiology of Olivocochlear Efferents. In: *The Cochlea* (Dallos P, Popper AN, Fay RR, eds), pp 435–502 Springer Handbook of Auditory Research. New York, Springer.
- Guinan JJ (2006) Olivocochlear efferents: Anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hear.* 27(6):589-607
- Guinan, JJ y Gifford, M.L. (1988). Effects of electrical stimulation of efferent olivocochlear neurons on cat auditory-nerve fibers. II. Spontaneous rate. *Hear. Res.* 33, 115-127.
- Guinan JJ, Warr WB, Norris BE (1983) Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 221:358–370.
- Hakuba, N., Koga, K., Gyo, K., Usami, S.I., and Tanaka, K. (2000). Exacerbation of noise induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J. Neurosci.* 20, 8750–8753.
- Hallworth R, Evans BN, Dallos P (1993). The location and mechanism of electromotility in guinea pig outer hair cells. *J Neurophysiol.* 70:549–558.
- Hanson MG, Landmesser LT (2003) Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J Neurosci.* 23:587–600.
- Hashisaki, G.T., y Rubel, E.W. (1989). Effects of unilateral cochlea removal on anteroventral cochlear nucleus neurons in developing gerbils. *J. Comp. Neurol.* 283, 465-473.
- Hecox K, Galambos R (1974) Brain Stem Auditory Evoked Responses in Human Infants and Adults. *Arch Otolaryngol* 99:30–33.
- Heeringa AN, Köppl C (2019) The aging cochlea: Towards unraveling the functional contributions of strial dysfunction and synaptopathy. *Hear Res* 376:111–124.
- Henderson D, Subramaniam M, Boettcher FA (1993) Individual susceptibility to noise-induced hearing loss: an old topic revisited. *Ear Hear* 14:152–168.
- Hickox, A. E., & Liberman, M. C. (2014) Is noise-induced cochlear neuropathy key to the generation of hyperacusis or tinnitus? *Journal of Neurophysiology*, 111(3), 552-564
- Hind SE, Haines-Bazrafshan R, Benton CL, Brassington W, Towle B, Moore DR (2011) Prevalence of clinical referrals having hearing thresholds within normal limits. *Int J Audiol* 50:708–716.

Hirtz, J.J., Boesen, M., Braun, N., Deitmer, J.W., Kramer, F., Lohr, C., Muller, B., Nothwang, H.G., Striessnig, J., Lohrke, S., et al. (2011). Cav1.3 Calcium Channels Are Required for Normal Development of the Auditory Brainstem. *J. Neurosci.* 31, 8280- 8294.

Hoffpauir, B.K., Marrs, G.S., Mathers, P.H., y Spirou, G.A (2009) Does the brain connect before the periphery can direct. A comparison of three sensory systems in mice. *Brain Res.* 1277, 115-129

Hu, N., Rutherford, M.A., and Green, S.H. (2020). Protection of cochlear synapses from noise-induced excitotoxic trauma by blockade of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 3828–3838.

Huang L-C, Barclay M, Lee K, Peter S, Housley GD, Thorne PR, Montgomery JM (2012) Synaptic profiles during neurite extension, refinement and retraction in the developing cochlea. *Neural Dev* 7:38.

Huberman AD, Feller MB, Chapman B (2008) Mechanisms Underlying Development of Visual Maps and Receptive Fields. *Annu Rev Neurosci* 31:479–509.

Hudspeth AJ (1997) How Hearing Happens? *Neuron* 19:947–950.

Hudspeth AJ (2008) Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear. *Neuron* 59:530–545.

Hudspeth AJ (2014) Integrating the active process of hair cells with cochlear function. *Nat Rev Neurosci* 15:600–614.

Hughes L, Turner J, Parrish J, Caspary D (2010) Processing of Broadband Stimuli Across A1 Layers in Young and Aged Rats. *Hear Res.* 264:79–85.

Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Viberg A, Canlon B (2003) Auditory peripheral influences on calcium binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus during aging in the C57BL/6J mouse. *Hear Res.* 179:33–42.

Jensen JB, Lysaght AC, Liberman MC, Qvortrup K, Stankovic KM (2015) Immediate and delayed cochlear neuropathy after noise exposure in pubescent mice. *PLoS One* 10:e0125160.

Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ (2005) Increase in efficiency and reduction in Ca²⁺ dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol* 563:177– 191.

Johnson, S.L., Ceriani, F., Houston, O., Polishchuk, R., Polishchuk, E., Crispino, G., Zorzi, V., Mammano, F., y Marcotti, W. (2016) Connexin-mediated signalling in non-sensory cells is crucial for the development of sensory inner hair cells in the mouse cochlea. *J. Neurosci.* 37, 258-268.

Johnson, S.L., Eckrich, T., Kuhn, S., Zampini, V., Franz, C., Ranatunga, K.M., Roberts, T.P., Masetto, S., Knipper, M., Kros, C. et al., (2011a) Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat. Neurosci.* 14, 711-717.

Johnson, S.L., Forge, A., Knipper, M., Munkner, S., y Marcotti, W (2008) Tonotopic variation in the calcium dependence of neurotransmitter release and vesicle pool replenishment at mammalian auditory ribbon synapses. *J. Neurosci.* 28, 7670-7678.

Johnson, S.L., Franz, C., Kuhn, S., Furness, D.N., Rüttiger, L., Munkner, S., Rivolta, M.N., Seward, E.P., Herschman, H.R., Engel, J. et al., (2010) Synaptotagmin IV determines the linear Ca²⁺ dependence of vesicle fusion at auditory ribbon synapses. *Nat. Neurosci.* 13, 45-52.

- Johnson, S.L., Kennedy, H.J., Holley, M.C., Fettiplace, R., y Marcotti, W (2012) The Resting Transducer Current Drives Spontaneous Activity in Prehearing Mammalian Cochlear Inner Hair Cells. *J. Neurosci.* 32, 10479-10483.
- Johnson, S.L., Kuhn, S., Franz, C., Ingham, N., Furness, D.N., Knipper, M., Steel, K.P., Adelman, J.P., Holley, M.C., y Marcotti, W (2013a) Presynaptic maturation in auditory hair cells requires a critical period of sensory-independent spiking activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8720-8725.
- Johnson, S.L., Wedemeyer, C., Vetter, D.E., Adachi, R., Holley, M.C., Elgoyhen, A.B., y Marcotti, W. (2013b) Cholinergic efferent synaptic transmission regulates the maturation of auditory hair cell ribbon synapses. *Open Biol.* 3, 130163-130163.
- Jones OT, Eubanks JH, Earnest JP, McNamee MG (1988) A minimum number of lipids are required to support the functional properties of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry.* 27:3733–3742.
- Jones, TA., Leake, P.A., Snyder, R.L., Stakhovskaya, O., y Bonham, B (2007) Spontaneous discharge patterns in cochlear spiral ganglion cells before the onset of hearing in cats. *J. Neurophysiol.* 98, 1898-1908.
- Kaf WA, Lewis KM, Yavuz E, Dixon SM, Van Ess M, Jamos AM, Delgado RE (2017) Fast click rate electrocochleography and auditory brainstem response in normal-hearing adults using continuous loop averaging deconvolution. *Ear Hear* 38: 244–254
- Kalinec F, Holley MC, Iwasa KH, Lim DJ, Kachar B (1992) A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:8671–8675.
- Kalluri R, Monges-Hernandez M (2017) Spatial Gradients in the Size of Inner Hair Cell Ribbons Emerge Before the Onset of Hearing in Rats. *J Assoc Res Otolaryngol* 18:399–413.
- Kaltenbach JA, Afman CE (2000) Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear Res.* 140(1-2):165-72
- Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T (2015) Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss. *Biomed Res Int* 2015:617207.
- Kandler, K. (2004) Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14, 96–104.
- Kandler K, Clause A, Noh J (2009) Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits. *Nat Neurosci* 12:711–717.
- Katz E, Elgoyhen AB (2014) Short-term plasticity and modulation of synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear synapses. *Front Syst Neurosci* 8:1–14.
- Katz E, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs P a, Glowatzki E (2004) Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24:7814–7820.
- Kawase T, Delgutte B, Liberman MC (1993) Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J Neurophysiol* 70:2533–2549.
- Kent WD, Tan AK, Clarke MC, Bardell T (2002) Excessive noise levels in the neonatal ICU: potential effects on auditory system development. *J Otolaryngol.* 31(6):355-60.
- Kerlin JR, Shahin AJ, Miller LM (2010) Attentional Gain Control of Ongoing Cortical Speech Representations in a “Cocktail Party.” *J Neurosci* 30:620–628.

Khoza-Shangase K (2011) Highly active antiretroviral therapy: Does it Sound toxic? *J Pharm Bioallied Sci.* 3(1):142–153.

Kiang NYS, Moxon E., Kahn A. (1976) The relationship of gross potentials recorded from the cochlea to single unit activity in the auditory nerve. In: *Electrocochleography* (Ruben R., Eberling C, Solomon G, eds). Baltimore: University Park.

Kim KX, Rutherford MA (2016) Maturation of NaV and KV Channel Topographies in the Auditory Nerve Spike Initiator before and after Developmental Onset of Hearing Function. *J Neurosci* 36:2111–2118.

Kirkby, L.A., Sack, G.S., Firl, A., y Feller, M.B. (2013). A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits. *Neuron* 80, 1129-1144.

Knipper M, Van Dijk P, Nunes I, Rüttiger L, Zimmermann U (2013) Advances in the neurobiology of hearing disorders: recent developments regarding the basis of tinnitus and hyperacusis. *Prog Neurobiol* 111:17–33.

Kotak, V.C., y Sanes, D.H. (1996). Developmental influence of glycinergic transmission: regulation of NMDA receptor-mediated EPSPs. *J. Neurosci.* 16, 1836-1843.

Krey, J. F., Chatterjee, P., Halford, J., Cunningham, C. L., Perrin, B. J., & Barr-Gillespie, P. G. (2023). Control of stereocilia length during development of hair bundles. *PLOS Biology*, 21(4), e3001964.

Kros CJ, Ruppersberg JP, Rüsch A (1998) Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394:281–284.

Kujawa SG, Liberman MC (1997) Conditioning-related protection from acoustic injury: effects of chronic deafferentation and sham surgery. *J Neurophysiol* 78:3095–3106

Kujawa SG, Liberman MC (2006) Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci* 26:2115–2123.

Kujawa SG, Liberman MC (2009) Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 29:14077–14085.

Lauer AM, May BJ (2011) The medial olivocochlear system attenuates the developmental impact of early noise exposure. *J Assoc Res Otolaryngol* 12:329–343.

Lelli A, Asai Y, Forge A, Holt JR, Géléoc GSG (2009) Tonotopic Gradient in the Developmental Acquisition of Sensory Transduction in Outer Hair Cells of the Mouse Cochlea. *J Neurophysiol* 101:2961–2973.

Leao, R.N., Sun, H., Svahn, K., Berntson, A., Youssoufian, M., Paolini, A.G., Fyffe, R.E.W., y Walmsley, B. (2006). Topographic organization in the auditory brainstem of juvenile mice is disrupted in congenital deafness. *J. Physiol.* 571, 563-578.

Ledesma MD, Martin MG, Dotti CG (2012) Lipid changes in the aged brain: effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog Lipid Res.* 51:23–35.

Leighton, A.H., y Lohmann, C. (2016). The Wiring of Developing Sensory Circuits—From Patterned Spontaneous Activity to Synaptic Plasticity Mechanisms. *Front. Neural Circuits* 10, 1-13.

Lendvai B, Halmos GB, Polony G, Kapocsi J, Horváth T, Aller M, Sylvester Vizi E, Zelles T (2011) Chemical neuroprotection in the cochlea: the modulation of dopamine release from lateral olivocochlear efferents. *Neurochem Int* 59:150–158.

Liberman L. D, Liberman M. C. (2019) Cochlear efferent innervation is sparse in humans and decreases with age. *J Neurosci* 39:9560–9569.

Liberman LD, Liberman MC (2015) Dynamics of cochlear synaptopathy after acoustic overexposure. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol* 16:205–219

Liberman LD, Liberman MC (2016) Postnatal maturation of auditory-nerve heterogeneity, as seen in spatial gradients of synapse morphology in the inner hair cell area. *Hear Res* 339:12– 22.

Liberman LD, Wang H, Liberman MC (2011) Opposing gradients of ribbon size and AMPA receptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *J Neurosci* 31:801–808.

Liberman M, Mulroy M (1982) New perspectives on noise-induced hearing loss. In (Hamernik R, Henderson D, Salvi R, eds), pp 105–136. New York, NY.

Liberman M., Chesney C., Kujawa S (1997) Effects of selective inner hair cell loss on DPOAE and CAP in carboplatin-treated chinchillas. *Aud Neurosci* 3:255–268.

Liberman MC (1978) Auditory-nerve response from cats raised in a low-noise chamber. *J Acoust Soc Am* 63:442–455.

Liberman MC (1980) Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: An electron-microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:45–63.

Liberman MC (1982) Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216:1239–1241.

Liberman MC (1988) Physiology of cochlear efferent and afferent neurons: direct comparisons in the same animal. *Hear Res* 34:179–191.

Liberman MC (1989) Rapid assessment of sound-evoked olivocochlear feedback: Suppression of compound action potentials by contralateral sound. *Hear Res* 38:47–56.

Liberman MC (1991) The olivocochlear efferent bundle and susceptibility of the inner ear to acoustic injury. *J Neurophysiol* 65:123–132.

Liberman MC (2017a) Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Research* 6:927.

Liberman MC, Dodds LW (1984) Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. II. Stereocilia damage and alterations of spontaneous discharge rates. *Hear Res* 16:43–53.

Liberman MC, Dodds LW (1987) Acute ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear Res* 26:45–64.

Liberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990) Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301:443–460.

Liberman MC, Gao WY (1995) Chronic cochlear de-efferentation and susceptibility to permanent acoustic injury. *Hear Res* 90:158–168.

Liberman MC, Liberman LD, Maison SF (2014) Efferent feedback slows cochlear aging. *J Neurosci* 34:4599–4607.

Liberman, M.C., y Brown, M.C (1986) Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear. Res.* 24, 17-36.

Lioudyno M, Hiel H, Kong J-H, Katz E, Waldman E, Parameshwaran-Iyer S, Glowatzki E, Fuchs PA (2004) A “synaptoplasmic cistern” mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J Neurosci* 24:11160–11164.

Lippe, W.R (1994) Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J. Neurosci.* 14, 1486-1495.

Liu C, Glowatzki E, Fuchs PA (2015) Unmyelinated type II afferent neurons report cochlear damage. *Proc Natl Acad Sci* 112:1–5.

Liu H, Giffen KP, Chen L, Henderson HJ, Cao TA, Kozeny GA, et al (2022) Molecular and cytological profiling of biological aging of mouse cochlear inner and outer hair cells. *Cell Rep.* 39(2):110665.

Livingston G et al. (2017) Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet* 390:2673–2734.

Lohmann C, Friauf E (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J Comp Neurol.* 367:90–109

Lopez-Poveda, E. A., & Barrios, P. (2013). Perception of stochastically undersampled sound waveforms: A model of auditory deafferentation. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 124.

Loughrey DG, Kelly ME, Kelley GA, Brennan S, Lawlor BA (2018) Association of age-related hearing loss with cognitive function, cognitive impairment, and dementia: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* 144:115–126

Lu Y, Liu J, Li B, Wang H, Wang F, Wang S, Wu H, Han H, Hua Y (2024) Spatial patterns of noise-induced inner hair cell ribbon loss in the mouse mid-cochlea. *iScience.* Jan 8;27(2):108825.

Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW (1999) cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7238–7243

Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW (2003) Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem.* 278:22980–22988.

Lynch ED, Gu R, Pierce C, Kil J (2004) Ebselen-mediated protection from single and repeated noise exposure in rat. *Laryngoscope* 114:333–337.

Maison S, Liberman LD, Charles Liberman M (2016) Type-II cochlear ganglion neurons do not drive the olivocochlear reflex: re-examination of the cochlear phenotype in peripherin knockout mice. *eNeuro* 3:ENEURO.0207-16.2016.

Maison SF, Adams JC, Liberman MC (2003a) Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J Comp Neurol* 455:406–416.

Maison SF, Emeson RB, Adams JC, Luebke AE, Liberman MC (2003b) Loss of alpha CGRP reduces sound-evoked activity in the cochlear nerve. *J Neurophysiol* 90:2941–2949.

Maison SF, Usubuchi H, Liberman MC (2013) Efferent feedback minimizes cochlear neuropathy from moderate noise exposure. *J Neurosci* 33:5542–5552.

Malgrange B, Varela-nieto I, de Medina P, Paillasse MR, Neuroscience A, Malgrange B, et al. 2015 Targeting cholesterol homeostasis to fight hearing loss: A new perspective. *Front Aging Neurosci.* 7:1–7.

Marcotti, W., Johnson, S.L., Holley, M.C., y Kros, C.J. (2003b). Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal, and mature mouse inner hair cells. *J. Physiol.* 548, 383-400.

Marcotti, W., Johnson, S.L., Rüsch, A., y Kros, C.J. (2003a) Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J. Physiol.* 552, 743-761.

Marcotti, W., Johnson, S.L., y Kros, C.J. (2004). A transiently expressed SK current sustains and modulates action potential activity in immature mouse inner hair cells. *J. Physiol.* 560, 691-708.

Martín MG, Ahmed T, Korovaichuk A, Venero C, Menchón SA, Salas I, et al (2014) Constitutive hippocampal cholesterol loss underlies poor cognition in old rodents. *EMBO Mol Med.* 6:902–917.

Martin MG, Perga S, Trovo L, Rasola A, Holm P, Rantamäki T, et al (2008) Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro. *Mol Biol Cell.* 19:2101–2112.

Martín MG, Pfrieger F, Dotti CG (2014) Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep.* 15:1036–1052.

Mason RP, Shoemaker WJ, Shajenko L, Chambers TE, Herbette LG (1992) Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol Aging.* 13:413–419.

Mast N, Li Y, Linger M, Clark M, Wiseman J, Pikuleva IA (2014) Pharmacologic stimulation of cytochrome P450 46A1 and cerebral cholesterol turnover in mice. *J Biol Chem.* 289(6):3529-38.

Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11:812–822.

Maxfield FR, Wüstner D. Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes (2012) *Methods Cell Biol.* 108:367-93.

McGinley MJ, Charles Liberman M, Bal RM, Oertel D (2012) Generating synchrony from the Asynchronous: Compensation for cochlear traveling wave delays by the dendrites of individual brainstem neurons. *J Neurosci* 32:9301–9311.

Meister M, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ (1991) Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science.* 252:939–943.

Melcher JR, Knudson IM, Fullerton BC, Guinan JJ, Norris BE, Kiang NY (1996) Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. I. An experimental approach to their identification. *Hear Res* 93:1–27

Merchan-Perez A, Liberman MC (1996) Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: Correlations with spontaneous discharge rate. *J Comp Neurol* 371:208–221.

Mesgarani N, Chang EF (2012) Selective cortical representation of attended speaker in multi- talker speech perception. *Nature* 485:233–236.

Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* 12:444–453.

Minami SB, Yamashita D, Schacht J, Miller JM (2004) Calcineurin activation contributes to noise-induced hearing loss. *J Neurosci Res* 78:383–392.

Mitroi DN, Pereyra-Gómez G, Soto-Huelin B, Senovilla F, Kobayashi T, Esteban JA, et al (2019) NPC1 enables cholesterol mobilization during long-term potentiation that can be restored in Niemann-Pick disease type C by CYP46A1 activation. *EMBO Rep.*20.

Moglie MJ, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Goutman JD (2018) Compartmentalization of antagonistic Ca²⁺ signals in developing cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E2095–E2104.

Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, Dellheden B, Månsson JE, Fredman P (2005). Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem.* 92:171–182

Mombaerts P (1999) Molecular Biology of Odorant Receptors in Vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 22:487–509.

Morley, B.J., y Simmons, D.D. (2002) Developmental mRNA expression of the alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit in the rat cochlea. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 139, 87-96

Moser T, Karagulyan N, Neef J, Jaime Tobón LM (2023) Diversity matters - extending sound intensity coding by inner hair cells via heterogeneous synapses. *EMBO J.* 42(23):e114587.

Moutinho M, Nunes MJ, Rodrigues E (2016) Cholesterol 24-hydroxylase: Brain cholesterol metabolism and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 1861:1911–1920.

Mulders WH, Ding D, Salvi R, Robertson D (2011) Relationship between auditory thresholds, central spontaneous activity, and hair cell loss after acoustic trauma. *J Comp Neurol.* 519(13):2637-47

Mulder M, Ravid R, De Kloet JER, Haasdijk ED, Jolk J, Van Der Boom J, (1998) Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*12:198–203.

Mulders WH, Robertson D (2009) Hyperactivity in the auditory midbrain after acoustic trauma: dependence on cochlear activity. *Neuroscience.*1;164(2):733-46

Murthy V, Maison SF, Taranda J, Haque N, Bond CT, Elgoyhen AB, Adelman JP, Liberman MC, Vetter DE (2009a) SK2 channels are required for function and long-term survival of efferent synapses on mammalian outer hair cells. *Mol Cell Neurosci* 40:39–49

Murthy V, Taranda J, Elgoyhen AB, Vetter DE (2009b) Activity of nAChRs containing alpha9 subunits modulates synapse stabilization via bidirectional signaling programs. *Dev Neurobiol* 69:931–949.

Nam JH, Fettiplace R (2010) Force transmission in the organ of corti micromachine. *Biophys J* 98:2813–2821.

Nguyen TV, Brownell W (1998) Contribution of membrane cholesterol to outer hair cell lateral wall stiffness. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 119:14–20.

Nordmann AS, Bohne BA, Harding GW (2000) Histopathological differences between temporary and permanent

threshold shift. *Hear Res* 139:13–30.

Oatman LC (1976) Effects of visual attention on the intensity of auditory evoked potentials. *Exp Neurol* 51:41–53.

Ohyama Y, Meaney S, Heverin M, Ekström L, Brafman A, Shafir M, et al (2006) Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem*. 281:3810–3820.

Oliver D, Klöcker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppertsberg JP, Fakler B (2000) Gating of Ca^{2+} -activated K^{+} channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26:595–601.

Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T (2013) TANGO: a generic tool for high throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29:1840–1841.

OMS (2017) Global costs of unaddressed hearing loss and cost-effectiveness of interventions: a WHO report. Ginebra.

Paquette ST, Gilels F, White PM (2016) Noise exposure modulates cochlear inner hair cell ribbon volumes correlating with changes in auditory measures in the FVB / nJ mouse. *Scientific Reports*.

Palomer E, Martín-Segura A, Baliyan S, Ahmed T, Balschun D, Venero C, et al (2016) Aging Triggers a Repressive Chromatin State at *Bdnf* Promoters in Hippocampal Neurons. *Cell Rep*. 13;16(11):2889-2900.

Pan B, Akyuz N, Liu XP, Asai Y, Nist-Lund C, Kurima K, Derfler BH, György B, Limapichat W, Walujkar S, Wimalasena LN, Sotomayor M, Corey DP, Holt JR (2018) TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. *Neuron*. 99(4):736-753.e6.

Park H, Kayser C, Thut G, Gross J (2016) Lip movements entrain the observers' low-frequency brain oscillations to facilitate speech intelligibility. *Elife* 5:e14521.

Parthasarathy A, Kujawa SG (2018) Synaptopathy in the Aging Cochlea: Characterizing Early Neural Deficits in Auditory Temporal Envelope Processing. *J Neurosci*. 38:7108–7119.

Pérez-Cañamás A, Sarroca S, Melero-Jerez C, Porquet D, Sansa J, Knafo S, et al (2016). A diet enriched with plant sterols prevents the memory impairment induced by cholesterol loss in senescence-accelerated mice. *Neurobiol Aging*. 48:1–12

Perkins RE, Morest DK (1975) A study of cochlear innervation patterns in cats and rats with the Golgi method and Nomarski Optics. *J Comp Neurol* 163:129–158.

Petrov AM, Kasimov MR, Zefirov AL (2016) Brain Cholesterol Metabolism and Its Defects: Linkage to Neurodegenerative Diseases and Synaptic Dysfunction. *Acta Naturae*. 8(1):58–73.

Pfriege FW, Ungerer N (2011) Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res*. 50:357–371.

Piatigorsky J (2001) Dual use of the transcriptional repressor (CtBP2)/ribbon synapse (RIBEYE) gene: how prevalent are multifunctional genes? *Trends Neurosci* 24:555–557.

Plack, C. J., Barker, D., & Prendergast, G. (2014). Perceptual consequences of "hidden" hearing loss. *Trends in Hearing*, 18

Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., yStriessnig, J. (2000). Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca^{2+} Channels. *Cell* 102, 89-97.

Plazas P V, De Rosa MJ, Gomez-Casati ME, Verbitsky M, Weisstaub N, Katz E, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005) Key roles of hydrophobic rings of TM2 in gating of the $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic cholinergic receptor. *Br J Pharmacol* 145:963–974.

Pohlert T (2014) The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). *R Package*:27.

Puel, J.L., y Uziel, A. (1987). Correlative development of cochlear action potential sensitivity, latency and frequency selectivity. *Dev. Brain Res.* 37, 179-188.

Puel JL, Ruel J, Gervais d'Aldin C, Pujol R (1998) Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport* 9:2109–2114.

Puel JL, Saffiedine S, Gervais d'Aldin C, Eybalin M, Pujol R (1995) Synaptic regeneration and functional recovery after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *C R Acad Sci III* 318:67–75.

Pujol R, Puel JL (1999) Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci* 884:249–254.

Pujol R, Puel JL, D'aldin CG, Eybalin M, Gervais d'Aldin C, Eybalin M (1993) Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 113:330–334.

Purcell EK, Liu L, Thomas PV, Duncan RK (2011) Cholesterol influences voltage-gated calcium channels and BK-type potassium channels in auditory hair cells. *PLoS ONE*. 6(10):e26289.

Purves, D (2004) *Neuroscience*, 3rd Edition // *Neuroscience*.

Pyott SJ, Glowatzki E, Trimmer JS, Aldrich RW (2004) Extrasynaptic localization of inactivating calcium-activated potassium channels in mouse inner hair cells. *J Neurosci* 24:9469–9474.

Qiu X, Müller U (2022) Sensing sound: Cellular specializations and molecular force sensors. *Neuron*. 110(22):3667-3687.

Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2004) Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell*. 15:259–268.

Rajagopalan L, Greeson JN, Xia A, Liu H, Sturm A, Raphael RM, et al (2007) Tuning of the outer hair cell motor by membrane cholesterol. *J Biol Chem*. 282:36659–36670.

Rajan R (1988) Effect of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on temporary threshold shifts in auditory sensitivity. II. Dependence on the level of temporary threshold shifts. *J Neurophysiol* 60:569–579.

Rajan R (2000) Centrifugal pathways protect hearing sensitivity at the cochlea in noisy environments that exacerbate the damage induced by loud sound. *J Neurosci* 20:6684–6693.

Ramirez DMO, Andersson S, Russell DW (2008) Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 507:1676–1693

Reijntjes DOJ, Pyott SJ (2016) The afferent signaling complex: Regulation of type I spiral ganglion neuron responses in the auditory periphery. *Hear Res* 336:1–16.

Reiter ER, Liberman MC (1995) Efferent-mediated protection from acoustic overexposure: relation to slow effects of olivocochlear stimulation. *J Neurophysiol* 73:506–514.

- Ren HM, Ren J, Liu W (2013) Recognition and control of the progression of age-related hearing loss. *Rejuvenation Res.* 16:475–486.
- Renier N, Dominici C, Erzurumlu RS, Kratochwil CF, Rijli FM, Gaspar P, Chedotal A (2017) A mutant with bilateral whisker to barrel inputs unveils somatosensory mapping rules in the cerebral cortex. *Elife* 6:e23494:1–19.
- Robertson D (1983) Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 9:263–278.
- Robles L, Ruggero MA (2001) Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81:1305–1352.
- Roher AE, Weiss N, Kokjohn TA, Kuo Y-M, Kalback W, Anthony J, et al (2002) Increased A Peptides and Reduced Cholesterol and Myelin Proteins Characterize White Matter Degeneration in Alzheimer's Disease. 41(37):11080–11090.
- Romand R, Romand MR (1985) Qualitative and quantitative observations of spiral ganglion development in the rat. *Hear Res* 18:111–120.
- Roux, I., Wersinger, E., McIntosh, J.M., Fuchs, P., Albert, Y., Glowatzki, E. (2011) Onset of cholinergic efferent synaptic function in sensory hair cells of the rat cochlea. *J. Neurosci.* 31, 15092-15101.
- Rubel EW, Fritzsch B (2002) Auditory System Development: Primary Auditory Neurons and Their Targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51–101.
- Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel J-L (2007) Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hear Res* 227:19–27.
- Ruggles D, Bharadwaj H, Shinn-Cunningham BG (2011) Normal hearing is not enough to guarantee robust encoding of suprathreshold features important in everyday communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15516–15521.
- Ruggles D, Bharadwaj H, Shinn-Cunningham BGG (2012) Why Middle-Aged Listeners Have Trouble Hearing in Everyday Settings. *Curr Biol* 22:1417–1422.
- Russell IJ, Kössl M (1991) The voltage responses of hair cells in the basal turn of the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 435:493–511.
- Russell IJ, Sellick PM (1978) Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J Physiol* 284:261–290.
- Rybak, L.P., Whitworth, C., & Scott, V (1992) Development of endocochlear potential and compound action potential in the rat. *Hear. Res.* 59, 189-194.
- Rybalko N, Chumak T, Bureš Z, Popelář J, Šuta D, Syka J (2015) Development of the acoustic startle response in rats and its change after early acoustic trauma. *Behav Brain Res.* 286:212-21
- Rybalko N, Mitrovic D, Šuta D, Bureš Z, Popelář J, Syka J (2019) Behavioral evaluation of auditory function abnormalities in adult rats with normal hearing thresholds that were exposed to noise during early development. *Physiol Behav.* 210:112620
- Rybalko, N. & Syka, J. (2001) Susceptibility to noise exposure during postnatal development in rats. *Hear. Res.*, 155, 32–40.

Sage D, Donati L, Soulez F, Fortun D, Schmit G, Seitz A, Guiet R, Vonesch C, Unser M (2017) DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* 115:28-41.

Saito K (1980) Fine structure of the sensory epithelium of the guinea pig organ of corti: afferent and efferent synapses of hair cells. *J Ultrastruct Res* 71:222–232.

Sanes, D.H., Markowitz, S., Bernstein, J. & Wardlow, J. (1992) The influence of inhibitory afferents on the development of postsynaptic dendritic arbors. *J. Comp. Neurol.*, 321, 637–644.

Sanes, D.H. & Takács, C. (1993) Activity-dependent refinement of inhibitory connections. *Eur. J. Neurosci.*, 5, 570–574.

Saunders JC, Chen CS (1982) Sensitive periods of susceptibility to auditory trauma in mammals. *Environ Health Perspect* 44:63–5.

Saunders JC, Cohen YE, Szymko YM (1991) The structural and functional consequences of acoustic injury in the cochlea and peripheral auditory system: A five year update. *J Acoust Soc Am* 90:136–146.

Schaette, R., & McAlpine, D. (2011). Tinnitus with a normal audiogram: Physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13452-13457

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682.

Schmidt RS, Fernandez C (1963) Development of mammalian endocochlear potential. *J Exp Zool* 153:227–235.

Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: A protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28:857–872.

Schneider ME, Belyantseva IA, Azevedo RB, Kachar B (2002) Rapid renewal of auditory hair bundles. *Nature* 418:837–838.

Seal, R.P., Akil, O., Yi, E., Weber, C.M., Grant, L., Yoo, J., Clause, A., Kandler, K., Noebels, J.L., Glowatzki, E., et al. (2008). Sensorineural Deafness and Seizures in Mice Lacking Vesicular Glutamate Transporter 3. *Neuron* 57, 263-275.

Sendin, G., Bourien, J., Rassendren, F., Puel, J.-L., y Nouvian, R (2014) Spatiotemporal pattern of action potential firing in developing inner hair cells of the mouse cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(5):1999-2004.

Sfondouris J, Rajagopalan L, Pereira FA, Brownell WE (2008) Membrane composition modulates prestin associated charge movement. *J Biol Chem*. 283:22473–22481.

Shi L, Guo X, Shen P, Liu L, Tao S, Li X, Song Q, Yu Z, Yin S, Wang J (2015) Noise-induced damage to ribbon synapses without permanent threshold shifts in neonatal mice. *Neuroscience*. 304:368-77.

Shnerson A, Devigne C, Pujol R (1981) Age-related changes in the C57BL/6J mouse cochlea. II. Ultrastructural findings. *Brain Res* 254:77–88.

Shrestha BR, Chia C, Wu L, Kujawa SG, Liberman MC, Goodrich LV (2018) Sensory Neuron Diversity in the Inner Ear Is Shaped by Activity. *Cell*. 174(5):1229-1246.e17.

Sierksma, M.C., Tedja, M.S., y Borst, J.G.G (2017) In vivo matching of postsynaptic excitability with spontaneous

synaptic inputs during formation of the rat calyx of Held synapse. *J. Physiol.* 595, 207-231.

Simmons DD (2002) Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* 53:228–250.

Simmons, D.D., Mansdorf, N.B., y Kim, J.H (1996) Olivocochlear innervation of inner and outer hair cells during postnatal maturation: evidence for a waiting period. *J Comp Neurol* 370, 551-562.

Sliwinska-Kowalska M, Davis A (2012) Noise-induced hearing loss. *Noise Health* 14:274–280.

Sliwinska-Kowalska M, Pawelczyk M (2013) Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. *Mutat Res* 752:61–65.

Smith CA, Sjöstrand FS (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J Ultrastructure Res* 5:184–192.

Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G (1990) Lipid Compositions of Different Regions of the Human Brain During Aging. *J Neurochem.* 54:415–423.

Sodero AO, Trovò L, Iannilli F, Van Veldhoven P, Dotti CG, Martín MG (2011) Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. *J Neurochem.* 116:747–755.

Sodero AO, Weissmann C, Ledesma MD, Dotti CG (2011) Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiol Aging.* 32:1043– 1053.

Someya S, Xu J, Kondo K, Ding D, Salvi RJ, Yamasoba T, et al. (2009) Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:19432–19437

Sonntag, M., Englitz, B., Kopp-Scheinflug, C., y Rübsamen, R (2009) Early postnatal development of spontaneous and acoustically evoked discharge activity of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body: an in vivo study in mice. *J. Neurosci.* 29, 9510-9520.

Spoendlin H (1971) Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol* 71:166–176.

Spoendlin H (1972) Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol* 73:235–248

Stamatakis S, Francis HW, Lehar M, May BJ, Ryugo DK (2006) Synaptic alterations at inner hair cells precede spiral ganglion cell loss in aging C57BL/6J mice. *Hear Res* 221:104–118

Stewart Cole, K., y Robertson, D (1992) Early efferent innervation of the developing rat cochlea studied with a carbocyanine dye. *Brain Res.* 575, 223-230.

Surenthiran SS, Wilbraham K, May J, Chant T, Emmerson AJ, Newton VE (2003) Noise levels within the ear and post-nasal space in neonates in intensive care. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 88:F315–318.

Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B, Olsson L (1994) Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J Neurochem.* 63:1802–181

Svennerholm L, Boström K, Helander CG, Jungbjer B (1991) Membrane lipids in the aging human brain. *J Neurochem.* 56:2051–2059.

Svennerholm L, Boström K, Jungbjer B (1997) Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathol.* 94:345–352.

Tao S, Liu L, Shi L, Li X, Shen P, Xun Q, Guo X, Yu Z, Wang J (2015) Spatial learning and memory deficits in young adult mice exposed to a brief intense noise at postnatal age. *J Otol.* 10(1):21-28.

Taranda J, Maison S, Ballesterio J, Katz E, Savino J, Vetter DE, Boulter J, Liberman MC, Fuchs PA, Elgoyhen AB (2009) A point mutation in the hair cell nicotinic cholinergic receptor prolongs cochlear inhibition and enhances noise protection. *PLoS Biol* 7:e18.

Terreros G, Delano PH (2015) Corticofugal modulation of peripheral auditory responses. *Front Syst Neurosci* 9:1–8.

Terreros G, Jorratt P, Aedo C, Elgoyhen AB, Delano PH (2016) Selective Attention to Visual Stimuli Using Auditory Distractors Is Altered in Alpha-9 Nicotinic Receptor Subunit Knock-Out Mice. *J Neurosci* 36:7198–7209.

Thein P, Kalinec GM, Park C, Kalinec F (2014) In Vitro Assessment of Antiretroviral Drugs Demonstrates Potential for Ototoxicity. 310:27–35.

Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lütjohann D (2006). Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci Lett.* 403:15–19.

Trautwein EA, Demonty I (2007) Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits. *OCL.* 2007; 14:259–266.

Tritsch, N.X., y Bergles, D.E (2010) Developmental Regulation of Spontaneous Activity in the Mammalian Cochlea. *J. Neurosci.* 30, 1539-1550.

Tritsch, N.X., Yi, E., Gale, J.E., Glowatzki, E., y Bergles, D.E (2007) The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450, 50-55.

Valenza M, Chen JY, Di Paolo E, Ruozzi B, Belletti D, Ferrari Bardile C, (2015) Cholesterol-loaded nanoparticles ameliorate synaptic and cognitive function in Huntington's disease mice. *EMBO Mol Med.* 7:1547–1564.

Valero MD, Burton JA, Hauser SN, Hackett TA, Ramachandran R, Liberman MC (2017) Noise induced cochlear synaptopathy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Hear Res.*

Vanmierlo T, Weingartner O, Van Der Pol S, Husche C, Kerksiek A, Friedrichs S, et al. (2012) Dietary intake of plant sterols stably increases plant sterol levels in the murine brain. *J Lipid Res.* 2012; 53:726–735.

Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Turcan S, Ballesterio J, Liberman MC, Elgoyhen AB, Boulter J (2007) The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *PNAS* 104:20594–20599.

Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffiote-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (1999) Role of $\alpha 9$ nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* 23:93–103.

Vogler DP, Robertson D, Mulders WH (2011) Hyperactivity in the ventral cochlear nucleus after cochlear trauma. *J Neurosci.* 4;31(18):6639-45.

Vollrath MA, Kwan KY, Corey DP (2007) The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30:339–365.

Voorn RA, Vogl C (2020) Molecular Assembly and Structural Plasticity of Sensory Ribbon Synapses-A Presynaptic Perspective. *Int J Mol Sci*. Nov 19;21(22):8758.

Wachman EM, Lahav A (2010) The effects of noise on preterm infants in the NIC. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*.

Walmsley, B., Berntson, A., Leao, R.N., y Fyffe, R.E.W. (2006). Activity-dependent regulation of synaptic strength and neuronal excitability in central auditory pathways. *J. Physiol*. 572, 313-321.

Walsh, E.J., y McGee, J. (1997). Does activity in the olivocochlear bundle affect development of the auditory periphery? In *International Symposium on Diversity in Auditory Mechanics*, pp. 376-385.

Walsh, E.J., McGee, J., McFadden, S.L., y Liberman, M. (1998). Long-term effects of sectioning the olivocochlear bundle in neonatal cats. *J. Neurosci*. 18, 3859-3869.

Wang, H.C., Lin, C.-C., Cheung, R., Zhang-Hooks, Y.X., Agarwal, A., Ellis-Davies, G., Rock, J., y Bergles, D.E (2015) Spontaneous Activity of Cochlear Hair Cells Triggered by Fluid Secretion Mechanism in Adjacent Support Cells. *Cell* 1-12.

Warr WB, Guinan JJ (1979) Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res* 173:152–155.

Weisz N, Hartmann T, Dohrmann K, Schlee W, Norena A (2006) High-frequency tinnitus without hearing loss does not mean absence of deafferentation. *Hear Res* 222:108–114.

Wiechers, B., Gestwa, G., Mack, A., Carroll, P., Zenner, H.P., y Knipper, M (1999) A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlear development of rats and mice. *J. Neurosci*. 19,3033-3042.

Wiederhold ML, Kiang NY (1970) Effects of electric stimulation of the crossed olivocochlear bundle on single auditory-nerve fibers in the cat. *J Acoust Soc Am* 48:950–965.

Wilson JL, Henson MM, Henson OW (1991) Course and distribution of efferent fibers in the cochlea of the mouse. *Hear Res* 55:98–108.

Winslow RL, Sachs MB (1988) Single-tone intensity discrimination based on auditory-nerve rate responses in backgrounds of quiet, noise, and with stimulation of the crossed olivocochlear bundle. *Hear Res* 35:165–189

Wittekindt a., Kaiser J, Abel C (2014) Attentional Modulation of the Inner Ear: A Combined Otoacoustic Emission and EEG Study. *J Neurosci* 34:9995–10002

Wood MB, Nowak N, Mull K, Goldring A, Lehar M, Fuchs PA (2021) Acoustic Trauma Increases Ribbon Number and Size in Outer Hair Cells of the Mouse Cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*. 22(1):19-31.

Woolf, N.K., y Ryan, A.F (1988) Contributions of the middle ear to the development of function in the cochlea. *Hear Res* 35, 131-142.

Wu JS, Young ED, Glowatzki E (2016) Maturation of Spontaneous Firing Properties after Hearing Onset in Rat Auditory Nerve Fibers: Spontaneous Rates, Refractoriness, and Interfiber Correlations. *J Neurosci* 36:10584–

Wu PZ, Liberman LD, Liberman MC (2024). Noise-induced synaptic loss and its post-exposure recovery in CBA/CaJ vs. C57BL/6J mice. *Hear Res.* 445:108996.

Youssoufian, M. (2005). Development of a Robust Central Auditory Synapse in Congenital Deafness. *J. Neurophysiol.* 94, 3168-3180.

Zahr LK, Balian S (1995) Responses of premature infants to routine nursing interventions and noise in the NICU. *Nurs Res* 44:179–85.

Zhang M (2012) High-frequency hearing impairment assessed with cochlear microphonics. *Acta Otolaryngol* 132: 967–973.

Zhao B, Müller U (2015) The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 34:172–179.

Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405:149–155.

Zheng X-Y, Henderson D, Hu B-H, Ding D-L, McFadden SL (1997a) The influence of the cochlear efferent system on chronic acoustic trauma. *Hear Res* 107:147–159

Zheng XY, Henderson D, Hu BH, McFadden SL (1997b) Recovery of structure and function of inner ear afferent synapses following kainic acid excitotoxicity. *Hear Res* 105:65–76

Zheng XY, Henderson D, McFadden SL, Hu BH (1997c) The role of the cochlear efferent system in acquired resistance to noise-induced hearing loss. *Hear Res* 104:191–203.

Zheng W, Holt JR (2021) The Mechanosensory Transduction Machinery in Inner Ear Hair Cells. *Annu Rev Biophys.* 50:31-51.

Zimmerman E, Lahav A (2013) Ototoxicity in preterm infants: effects of genetics, aminoglycosides, and loud environmental noise. *J Perinatol.* 33(1):3-8

