



**Cambios en la expresión de genes relacionados
con modificaciones morfofuncionales del órgano
de Corti en el modelo de epilepsia audiógena
GASH/Sal**

M^a Dalia Álvarez-Morujo de Sande

Salamanca, 2021

Los abajo firmantes, Dra. Dña. M^a Dolores E. López García y Dr. D. Antonio J. Álvarez-Morujó Suárez, miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**Cambios en la expresión de genes relacionados con modificaciones morfofuncionales del órgano de Corti en el modelo de epilepsia audiógena GASH/Sa**”, ha sido realizado bajo su dirección por Dña. M^a Dalia Álvarez-Morujó de Sande, y reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, 29 de Junio de 2021

Fdo:

Dra. M^a Dolores E. López

Fdo:

Dr. Antonio J. Álvarez-Morujó

I INDICE	Página
AGRADECIMIENTOS	06
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	07
ABREVIATURAS	10
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Epilepsia.....	16
1.2 Modelos de epilepsia: El hámster GASH/Sal.....	18
1.3 Receptor auditivo: órgano de Corti.....	19
1.4 Estructura de las células ciliadas mecanosensoras.....	24
1.5 Bases genéticas de las epilepsias hereditarias.....	25
1.6 Proteínas implicadas en la mecanotransducción auditiva y en el mantenimiento de la estructura coclear.....	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1 Animales de experimentación.....	36
4.2 Grupos experimentales.....	36
4.3 Obtención de muestras biológicas.....	37
4.3.1. Obtención de muestras de tejido fresco.....	37
4.3.2. Obtención de muestras histológicas.....	37
4.3.2.1 Perfusión.....	37
4.3.2.2 Extracción del encéfalo.....	38
4.3.2.3 Extracción de Cócleas.....	38
4.3.2.4 Obtención de muestras para MEB.....	38
4.3.2.5 Obtención de espiras.....	39
4.4 Técnicas empleadas.....	39
4.4.1 Inclusión en parafina.....	39
4.4.2 Inmunohistoquímica de cortes de cóclea en parafina.....	40
4.4.3 Inmunohistoquímica de espiras cocleares.....	41
4.4.4 Tinción de Nissl.....	42
4.4.5 Diseño de cebadores (<i>primers</i>)	42

4.4.6 RT-qPCR.....	44
4.4.7 Validación de variantes génicas.....	45
4.5 Adquisición de imágenes y análisis del tejido.....	46
4.6 Análisis estadístico.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Estructura del órgano de Corti del GASH/Sal.....	49
5.1.1 Histología coclear.....	49
5.1.2 Inmunohistoquímica.....	52
5.1.3 Análisis de las espiras cocleares	55
5.2 Microscopía electrónica de barrido.....	63
5.3 Estudio de la expresión génica en el órgano de Corti	73
5.4 Validación de la mutación en el gen <i>Otoa</i>	80
6. DISCUSIÓN	81
6.1 Análisis morfológicos.....	82
6.2 Estudios de expresión génica	86
7. CONCLUSIONES	93
8. BIBLIOGRAFÍA	95
9. ANEXOS	111

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi profunda gratitud a la Dr^a Dolores E. López y al Dr. Álvarez-Morujó, mis supervisores de investigación, por su paciente orientación.

También me gustaría agradecer al Dr. David Sánchez-Benito y al Dr. Ricardo Gómez Nieto porque gracias a sus trabajos previos y ayuda ha sido posible este estudio. Un agradecimiento especial a Samara Damasceno, quien me orientó y guio en las complejidades de la PCR, y a todos los compañeros del laboratorio de trastornos audiomotores, quienes siempre han estado disponibles para resolver cualquier duda y arropado con su camaradería. Han contribuido también las tertulias del café, las reuniones gastronómicas de fin de trimestre y los viajes para asistir a los congresos, vivencias indispensables en esta etapa.

Mi agradecimiento también se extienden a Luis López por su gran apoyo y colaboración para llevar a cabo los trabajos de inmunofluorescencia, y muy especialmente a Rosa Aparicio, por su inestimable asistencia en la realización del trabajo técnico de microscopía óptica y electrónica.

Finalmente, a todas las personas que forman parte del Instituto de Neurociencias de Castilla y León por su agradable y amable acogimiento durante este tiempo.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras:

- **Figura 1:** Esquema del caracol.
- **Figura 2:** Representación de los diferentes tipos de enlaces estereociliares.
- **Figura 3:** Esquema del diseño experimental.
- **Figura 4:** Esquema ilustrativo de la obtención de espiras cocleares sobre una cóclea disecada y fijada.
- **Figura 5:** Sección paramodiolar de la parte media de la cóclea del hámster control y GASH teñida con Nissl.
- **Figura 6:** Detalle de la figura 5 a mayor aumento.
- **Figura 7:** Microfotografía panorámica de cóclea incluida en parafina contrastado con Nissl e inmunoteñido para SLITRK6.
- **Figura 8:** Secciones de cóclea incluida en parafina con diferentes inmunotinciones.
- **Figura 9:** Imagen a gran aumento del órgano de Corti contrastado con Nissl e inmunoteñido para CDH25.
- **Figura 10:** Detalles de la espira media del órgano de Corti enmarcados en la figura.
- **Figura 11:** Estructura de la cóclea del GASH/Sal desde diferentes ángulos de visión.
- **Figura 12:** Disección de las cócleas del GASH/Sal.
- **Figura 13:** Distribución de las células ciliadas y de soporte en la cóclea del GASH/Sal.
- **Figura 14:** Gráfico de barras de la media del número de células ciliadas internas (CCI), células ciliadas externas (CCE1, CCE2 y CCE3) y de Deiters.
- **Figura 15:** Distribución de las CCI inmunopositivas para Parvalbúmina.
- **Figura 16:** Inmunorreactividad para sinaptofisina y proteína VLGR1 en la cóclea del GASH/Sal.
- **Figura 17:** Inmunorreactividad para CDH23 en la cóclea del GASH/Sal.
- **Figura 18:** Panorámica de las cócleas de hámster procesadas para su visualización al microscopio electrónico de barrido.

- **Figura 19:** Fractura sagital de la cóclea de hámster, mostrando la espira basal del órgano de Corti en visto con microscopía electrónica de barrido en controles y en GASH/sal.
- **Figura 20:** Fractura sagital de la cóclea de hámster en controles y en GASH/sal, detalle reenmarcado en la figura 16.
- **Figura 21:** Visión de la superficie apical a mayores aumentos de las tres filas del borde apical de las células ciliadas externas entre las de las células falángicas de Deiters (CD) en Controles y GASH/Sal.
- **Figura 22:** Detalle de los estereocilios en las células ciliadas internas y externas del órgano de Corti.
- **Figura 23:** Imagen del túnel espira (Corti) en una sección sagital del órgano de Corti de un control y en un GASH/Sal.
- **Figura 24:** Imagen de las células ciliadas internas de GASH/Sal.
- **Figura 25:** Gráfica indicativa de las cantidades relativas de los transcritos en la cóclea de *Kcnq1*, *Kcnq4* y *Cacna1d*.
- **Figura 26:** Gráfica indicativa de las cantidades relativas de los transcritos en la cóclea de *Pou4f3* y *Gjb2*.
- **Figura 27:** Gráfica indicativa de las cantidades relativas de los transcritos en la cóclea de *Otoa* y *Tecta*.
- **Figura 28:** Gráfica indicativa de las cantidades relativas de los transcritos en la cóclea de *Cdh23*, *Pcdh15* y *Vlgr1*.
- **Figura 29:** Gráfica indicativa de las cantidades relativas de los transcritos en la cóclea de *Whrn*, *Myo7a*, *Tmc2* y *Ptprq*.
- **Figura 30:** Gráfica indicativa de las cantidades relativas de los transcritos en la cóclea de *Prestin*, *Slitrk6* y *Gip3*.
- **Figura 31:** Característica de la variante del gen *Otoa* en el GASH/Sal.
- **Figura 32:** Validación del polimorfismo del gen *Otoa* en el GASH/Sal.
- **Figura 33:** Representación del Ciclo del Potasio para la formación del potencial endococlear.

Tablas:

- **Tabla 1:** Tabla representativa de las proteínas estudiadas, los genes responsables de su expresión, sus diferentes nomenclaturas, su clasificación y las funciones en el sistema auditivo.
- **Tabla 2:** Número de animales controles y GASH/Sal utilizados en las diferentes técnicas realizadas.
- **Tabla 3:** Reactivos utilizados en las inmunotinciones de cócleas.
- **Tabla 4:** Secuencias de los primers diseñados para los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real. Se utiliza el gen de actina* como control endógeno.
- **Tabla 5:** Estadística descriptiva completa del número de células por cada 100 micras de longitud colear.

ABREVIATURAS:

- **Ab:** ©Abcam, Cambridge, UK
- **AC:** anticuerpo
- **Actb:** beta-actina
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AGS:** Crisis convulsivas audiogénicas (*Audiogenic Seizures*)
- **ANOVA:** análisis de la varianza (*ANalysis Of VAriance*)
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- **BA-:** ©Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
- **bH:** banda de Hensen
- **BLSW :** ratón blanco suizo (*Black Swiss mouse*)
- **C°:** grados centígrados.
- **CACNA1D :** subunidad alfa-1-c del canal voltaje dependiente de calcio (*calcium voltage-gated channel subunit alpha-1-c*)
- **CCI:** células ciliadas internas
- **CCE:** células ciliadas externas
- **CD:** células de Deiters
- **CDH23:** cadherina- 23
- **cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementario
- **CC:** células de Claudius
- **CH:** células de Hensen
- **CNS:** sistema nervioso central
- **coc:** conducto coclear
- **CP:** células pilares.
- **cPe:** células de los pilares externas
- **cPi:** células de los pilares internas
- **D1:** receptor dopaminérgico 1
- **D2:** receptor dopaminérgico 2
- **DAB:** 3,3' diaminobenzidina
- **DAPI:** 4 ',6-diamidino-2-fenilindol

- **DFNB12**: sordera autosómica no-sindrómica recesiva 12
- **DK**: ©DyLight Kit (Vector Laboratories, CA, USA)
- **dNTPs**: deoxinucleósido trifosfato.
- **DPOAE**: emisiones otoacústicas por productos de distorsión (*Distortion Product Otoacoustic Emissions*)
- **dT**: deoxy-timidina
- **EDTA**: etilen-diaminatetraacético
- **el**: endolinfa
- **e**: estereocilios
- **EV**: la estría vascular
- **F**: prolongaciones falángicas
- **Fn**: fibras nerviosas
- **GABA**: ácido gamma-aminobutírico
- **GAERS**: ratas de Estrasburgo con Epilepsia de ausencia genética
- **GAIP**: proteína que interacciona con la subunidad G alfa (*alpha interacting protein*)
- **GASH/Sal**: Hámsteres con crisis epilépticas audiógenas de la Universidad de Salamanca (*Genetic audiogenic seizures hamsters From the University of Salamanca*)
- **GEPR**: ratas genéticamente propensas a epilepsia (*Genetically Epilepsy-Prone Rats*)
- **GJB2**: conexina 26
- **GIPC**: terminal-C de GAIP
- **Gipc3**: dominio GIPC PDZ que contiene el miembro 3 de la familia (*GIPC PDZ domain containing family member 3*)
- **GPG/Vall**: Hámster con crisis epilépticas de origen genético de la Universidad de Valladolid (*Genetically Epilepsy-prone Hamster from Valladolid University*)
- **GS**: ganglio espiral
- **H₂O**: agua
- **H₂O₂**: Peróxido de oxígeno
- **Ig**: inmunoglobulina

- **ILAE:** liga internacional contra le epilepsia (*International League Against Epilepsy*)
- **INCYL:** Instituto de Neurociencias de Castilla y León.
- **IR:** ©Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. PA; USA
- **KCI :** Cloruro Potásico
- **KCNQ1:** miembro 4 de la subfamilia kqn de canales voltaje dependientes de potasio (*potassium voltage-gated channel subfamily q member 1*)
- **KCNQ4:** miembro 4 de la subfamilia kqn de canales voltaje dependientes de potasio (*potassium voltage-gated channel subfamily q member 4*)
- **Ls:** lámina espiral
- **LHFPL5:** proteína de membrana tetraspanina de los estereocilios de las células ciliadas
- **LR:** Lámina Reticular
- **MEB:** Microscopía Electrónica de Barrido
- **MB:** membrana basilar
- **µg:** microgramos
- **mm:** milímetros
- **mM:** milimolar
- **M:** molar
- **Mo:** modioló.
- **MERGE:** súper-posición
- **MET:** microscopía electrónica de transmisión
- **min:** minutos
- **MR:** membrana de Reisner
- **MT:** membrana tectoria
- **MV:** membrana vestibular
- **MYO7A:** Miosina no convencional clase VIIa
- **NaCl:** Cloruro Sódico
- **NaHCO₃:** Bicarbonato Sódico
- **NB:** ©Novus Biogicals, Centennial, CO, USA
- **NCBI:** National Center for Biotechnology Information

- **ng:** Nanogramos
- **nm:** nanómetros
- **NMRI:** ratón del Instituto Naval de Investigación médica (*Naval Medical Research Institute mouse*)
- **OC:** órgano espiral o de Corti
- **OTOA:** otoancorina
- **p:** valor p (probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula)
- **PARV:** parvalbúmina
- **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **PCDH15:** protocadherina 15
- **PDZ:** proteína de densidad postsináptica (PSD95), proteína supresora de tumores en *Drosophila* (DlgA) y proteína zonula occludens-1 (zo-1)
- **pl:** perilinfa
- **Prestin:** Prestina
- **POU3F4:** factor de transcripción 4 clase 3 con dominio POU.
- **POU:** factor de transcripción PAGpropio-específico Pit-1, Ofactor de transcripción ctamer proteínas Oct-1 y 2 de octubre, neural Ufactor de transcripción nc-86 de *Caenorhabditis elegans*.
- **PTPRQ:** receptor de tirosina fosfatasa tipo Q
- **qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa inversa
- **RM:** Rampa Media
- **RT:** Rampa Timpánica
- **RT-qPCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa inversa en tiempo Real.
- **RV:** rampa vestibular
- **Sc:** © Santa Cruz biotechnology, Inc. Dallas, Texas, U.S.A.
- **SEM:** error estándar de la media
- **SE:** surco espiral
- **SLITRK6:** miembro 6 de la familia SLIT y similar a NTRK (*slit and ntrk like family member 6*)
- **SW:** ©Swant Inc. Switzerland ; SA: ©Sigma-Aldrich, MO, USA
- **SYP:** sinaptofisina

- **T:** valor t (número de unidades estándares que están separando las medias de los dos grupos; control y GASH/Sal)
- **TAE:** tris acetato EDTA
- **TBS:** tributilsililo
- **TB-Tx:** tampón Tris con triton
- **TC:** túnel de Corti
- **TECTA:** tectorina alfa
- **TMC2:** proteína 2 similar a un canal transmembrana (*transmembrane channel-like protein 2*)
- **Tris-HCL:** hidrocloreuro de Tris
- **Tris-:** tris(hidroximetil)aminometano
- **U.A.:** unidades arbitrarias
- **µL:** microlitros
- **V:** voltios.
- **VLGR1:** receptor acoplado a proteína g (*G protein G – coupled receptor*)
- **WAG/Rij:** ratas Wistar Albino Glaxo/Rij
- **WHRLNA:** whirlina
- **WHO:** Organización Mundial de la Salud (*World health organization*)

1 – INTRODUCCIÓN

1.1 Epilepsia

El concepto de epilepsia aparece ya en los textos más antiguos que se conocen puesto que su autoría corresponde a civilizaciones asirias y babilónicas, es decir; hace más de 4000 años. Entonces, y según estos textos, la epilepsia fue considerada un mal de origen divino o demoníaco hasta que el padre de la medicina, Hipócrates, desvinculara su origen a las voluntades omniscientes. Los galenos no hicieron grandes contribuciones acerca del mecanismo de las convulsiones epilépticas en la era post-hipocrática y no fue hasta finales de los 1800 y principios de los 1900 y coincidiendo con la consolidación del método científico, cuando el “padre de la epilepsia” John Hughlings Jackson (1835-1911), postuló los principios fisiológicos que causan las crisis convulsivas.

La epilepsia es un trastorno del sistema nervioso central, es decir; un trastorno neurológico en el que la actividad cerebral se vuelve anormal, lo que provoca convulsiones (actividad motora sustancial que puede ser tónica, clónica o tónico-clónica) o períodos de comportamientos o sensaciones inusuales y, a veces, pérdida de consciencia.

Las convulsiones se manifiestan en una serie de eventos clínicos intermitentes denominados crisis epilépticas. Una crisis epiléptica o crisis comicial es una manifestación clínica paroxística (brusca e inesperada) secundaria a una disfunción cerebral en la que se produce una descarga simultánea, excesiva (paroxística) e hipsincrónica de muchas neuronas y finaliza habitualmente de forma rápida, debida a una actividad anormal, súbita, breve y transitoria, de las células más importantes que componen el cerebro, las neuronas.

Con esta aparición brusca e inesperada de las descargas neuronales excitatorias, se pueden producir muchos otros trastornos que deben diferenciarse de las crisis epilépticas. Algunos ejemplos son los síncope, los terrores nocturnos, las pseudocrisis o crisis psicógenas, las distonías, los espasmos del sollozo en niños. Ni la mordedura de lengua, ni la pérdida de consciencia, ni la micción durante un episodio paroxístico, implican

necesariamente su origen epiléptico, aunque en algunos casos puedan sugerirlo (Scharfman et al., 1984).

También, debemos tener en cuenta que puede existir un periodo de estado mental alterado y confusión tras haber presentado una crisis o bien puede haber irritabilidad y agitación como síntomas prodrómicos.

Por otro lado, el estatus epiléptico no convulsivo se manifiesta por alteración del nivel de consciencia que puede expresarse desde una reducción del nivel de vigilancia hasta un estado de confusión o delirio.

Esta enfermedad afecta a unos 50 millones de personas en el mundo (Fisher, 2014; WHO, 2017) y se caracteriza por la predisposición a padecer las crisis epilépticas o comiciales recurrentes, es decir, para que un paciente se diagnosticado con enfermedad epiléptica, tiene que haber sufrido al menos dos crisis.

Se conocen habitualmente dos grandes tipos de crisis epilépticas, las crisis parciales o focales. En las parciales, donde las manifestaciones de descarga comienzan en una región encefálica que puede extenderse al resto de las estructuras neuronales, mientras que en las generalizadas, la manifestación inicial aparece en todo el cerebro, y provocan la pérdida de conocimiento.

En cuanto a la clasificación de los tipos de epilepsia, la liga internacional contra le epilepsia, ILAE (International League Against Epilepsy), ha clasificado diferentes tipos de epilepsia en humanos, llegando a definir más de cuarenta antes del 2014, fecha de la última revisión (Fisher et al., 2014). Esta última versión está basada en los complejos constructos clínicos que sustentan el diagnóstico de la epilepsia y, por tanto, en la opinión de epileptólogos y especialistas relacionados de todo el mundo. Aunque no cabe duda de que el punto final deseado sería una clasificación con base científica, la comprensión de esta patología no está lo suficientemente avanzada como para elaborar una clasificación sobre una base científicamente rigurosa. De hecho, los mecanismos subyacentes a cada tipo son poco conocidos y su identificación resulta imprescindible para el desarrollo de nuevos tratamientos (Tejada et al., 2013).

1.2 Modelos de epilepsia: El hámster GASH/Sal

La complejidad de este trastorno neurológico requiere modelos para explorar diferentes aspectos de la epilepsia (Kandratavicius et al., 2014). Entre los modelos genéticos *in vivo* de epilepsia más utilizados y bien caracterizados se encuentran aquellas especies animales genéticamente predisuestas a padecer crisis convulsivas. En estos, se producen convulsiones en respuesta a la estimulación acústica de alta intensidad, denominándose modelos de epilepsia audiógena (Ross and Coleman, 2000; Komsuoglu Celikyurt et al., 2016).

Nuestro modelo animal se origina a partir de un primer hámster epiléptico que apareció de manera espontánea en la Universidad de Valladolid (la línea GPG/Vall). Esta línea fue transferida a la Universidad de Salamanca, donde finalmente se desarrolló la línea GASH/Sal (Genetic audiogenic seizure hamster, Salamanca).

El hámster sirio o hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), ha sido uno de los modelos animales más habituales para el estudio, no sólo de epilepsia sino de otras muchas patologías en investigación biomédica, incluyendo inducción experimental de tumores o enfermedades infecciosas.

La línea de hámsteres GASH/Sal presenta susceptibilidad a sufrir convulsiones audiógenas, con un patrón hereditario autosómico recesivo. Estas crisis se caracterizan por desarrollar un corto periodo de latencia después de una estimulación auditiva seguido de carrera salvaje, una fase convulsiva y estupor, con origen troncoencefálico, siendo el colículo inferior el núcleo epileptógeno (Muñoz et al., 2017). Desde una perspectiva filogenética, esta línea de hámsteres presentan diferencias de aproximadamente un 17% comparado con los hámsteres sirios o dorados (*Mesocricetus auratus*) (Muñoz et al., 2017).

Además, ha sido validada como un modelo de epilepsia desde el punto de vista comportamental (Muñoz et al., 2017), electroencefalográfico (Carballosa-Gonzalez et al., 2013) y farmacológico (Barrera-Bailón, 2013, 2017).

Por otra parte, los hámsteres GASH/Sal muestran un umbral auditivo elevado y por tanto, presentan una pérdida auditiva (Sánchez-Benito et al., 2020). El perfil convulsivo es similar a otros modelos con susceptibilidad a crisis audiógenas y aunque las crisis disminuyen a los seis meses de edad, la predisposición se mantiene de generación en generación (Muñoz et al., 2017).

1.3 Receptor auditivo: órgano de Corti

El oído interno está formado por una estructura laberíntica denominada **cóclea**, que facilita la percepción de los estímulos mecánicos procedentes de las ondas de presión auditivas del aire. Posee tres rampas o escalas: **la rampa vestibular**, **la rampa timpánica** y entre éstas, **la rampa media** (Figura 1B). Los sonidos inducen ondas en un fluido denominado perilinfa y se propagan desde la base coclear hacia el ápice dentro de la escala vestibular transmitiendo vibraciones en la escala media en función de la frecuencia del sonido. La escala media se encuentra acotada por la **membrana de Reissner** en la parte superior, creando una barrera con la escala vestibular adyacente. Externamente, está delimitada por la **estría vascular**, la cual desempeña un papel clave en la generación y el mantenimiento del entorno electroquímico único dentro de la escala media, necesario para la función auditiva (Driver y Kelley, 2020).

El órgano de Corti o cóclea

En la parte inferior del oído interno, sobre la membrana basilar, se encuentra el **órgano de Corti**, un epitelio sensorial y principal estructura sensorial de la recepción de estímulos sonoros (Mathur y Yang, 2015). En él se encuentran las células ciliadas mecanosensoras, cuyas redes de proteínas son esenciales para la correcta diferenciación celular, así como para la transducción mecanoeléctrica (Wolfrum et al., 2018).

En la zona central del órgano se sitúan dos hileras de células en forma de bastón, las **células pilares** (bastones internos y externos de Corti). Las bases (pies) o extremos inferiores ensanchados apoyados en la membrana basilar están separados, y en su ascenso hacia las porciones superiores se acercan unas sobre las otras, contactando en el extremo, de tal manera que con la

membrana basilar delimitan un conducto prismático triangular, **el túnel de Corti** (Smith y Dempsey 1957, Engström y Wersäll 1958, Babel et al., 1970, Ades y Engström 1974).

Por dentro de los bastones internos, se presenta una fila única de células con esterocilios, **las células ciliadas internas (CCI)**, y la cara externa de los bastones externos un conjunto de 3 a 4 filas, **las células ciliadas externas (CCE)**. A estas filas se añaden unos elementos de sostén, las **células falángicas de Deiters** y de **Hensen**, las células limitantes externas y las células limitantes internas, internamente a las CCI (Figura 1 C). Las células de Deiters se describen como un cuerpo celular alargado y con un citoesqueleto en forma de cuerda, que se disponen desde la membrana basilar hasta la lámina reticular y sostiene las células ciliadas externas. Cada cuerpo celular de las células de Deiters encierra el extremo basal de la CCE y su inervación. Las células pilares, situadas entre las células de Deiters, CCE y CCI, forman el túnel de Corti, un arco creado a partir de las células pilares externas e internas y que también delimitan el espacio de Nuel entre estas células y las CCE. (Parsa et al., 2012; Taylor et al., 2012)

El órgano está completamente cubierto por la membrana tectoria, una fina capa de tejido acelular semejante a un gel, con una capa superficial fibrosa y otra profunda de consistencia gelatinosa, en un 97% constituida por agua y el resto por fibras de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Esta membrana está separada de la lámina reticular del órgano por una angosta hendidura, alcanzada, sin embargo; por los esterocilios de las ciliadas externas (Figura 1).

La estría vascular

Está situada sobre la pared externa del conducto coclear, inmediatamente por encima de la prominencia espiral. Tiene la peculiaridad de poseer un epitelio estratificado especializado con un rico plexo de capilares intraepiteliales y formado por tres tipos de células:

- a) células cromófilas oscuras o marginales situadas superficialmente
- b) células cromófobas, claras o intermedias

c) células basales

La superficie endolinfática está formada exclusivamente por células oscuras. Las células intermedias y basales son similares desde el punto de vista citológico, difiriendo únicamente en su posición. Su citoplasma pálido contiene mitocondrias dispersas, numerosas vesículas pinocitósicas y algunos gránulos de melanina. Estas células envían prolongaciones citoplásmicas hacia la superficie donde se insinúan entre y en torno a las partes más profundas de las células marginales.

Las células marginales oscuras están muy especializadas, y tienen un citoplasma granular denso que contiene numerosas mitocondrias y vesículas pinocitósicas. La región profunda de la célula está formada por abundantes prolongaciones citoplásmicas largas separadas por grandes invaginaciones del plasmalema, cada una de las cuales contiene algunas mitocondrias. Los capilares intraepiteliales están rodeados por las prolongaciones descendentes de las células oscuras y las ascendentes de las células intermedias y basales.

La estría vascular se considera como un mecanismo de transporte iónico que mantiene la composición iónica singular de la endolinfa. Sin embargo, como ya se indicó, otras regiones del laberinto membranoso pueden ejercer también esta actividad. Mediante la exploración de la estría con microelectrodos se ha podido establecer que es el origen del gran potencial eléctrico endococlear positivo. El mantenimiento de este potencial depende directa e inmediatamente del nivel adecuado de oxigenación de las células epiteliales, facilitado por la circulación sanguínea a través de sus capilares intraepiteliales.

Lámina espiral ósea

Está formada por dos estratos óseos entre los que se encuentran los conductos excavados por donde discurren las fibras de las neuronas del ganglio espiral (ganglio de Corti). En el estrato óseo superior, el periostio se encuentra engrosado y forma el borde de la lámina espiral (Figura 1.) que termina por la parte externa en un extremo cóncavo denominado surco espiral interno, la parte superior de la concavidad se denomina labio vestibular,

mientras que la inferior afilada, recibe el nombre de labio timpánico y se encuentra perforada por los orificios por donde pasan las fibras nerviosas.

Membrana basilar

Ocupa el área entre el labio timpánico de la lámina espiral ósea hasta la cresta basilar. Compuesto por una delgada parte arqueada que va desde su inserción interna en el limbo espiral hasta la base de los pilares externos y sustenta el órgano de Corti, y otra parte externa más gruesa, la zona pectínea, que se inicia por debajo de los bastones externos y alcanza la cresta basilar. La zona arqueada es un conjunto de haces similares al colágeno con una disposición principalmente radial. La zona pectínea presenta tres capas: una superior compuesta por una red homogénea de fibras transversales, una inferior formada por haces de fibras longitudinales y una tercera intermedia, carente de estructura, en cuyo interior se encuentran algunas células.

A nivel de su inserción en la cresta basilar, las capas superior e inferior se funden, convirtiéndose en una sola capa. La longitud de la membrana basilar es de unos 35 mm; el grosor va aumentando gradualmente a lo largo del caracol desde su espira basal hasta la apical, aumento que va acompañado del adelgazamiento parejo de la lámina espiral ósea y una disminución del espesor de la cresta basilar. La cara inferior de la membrana está revestida por una capa conjuntiva vascular con células perilinfáticas alargadas.

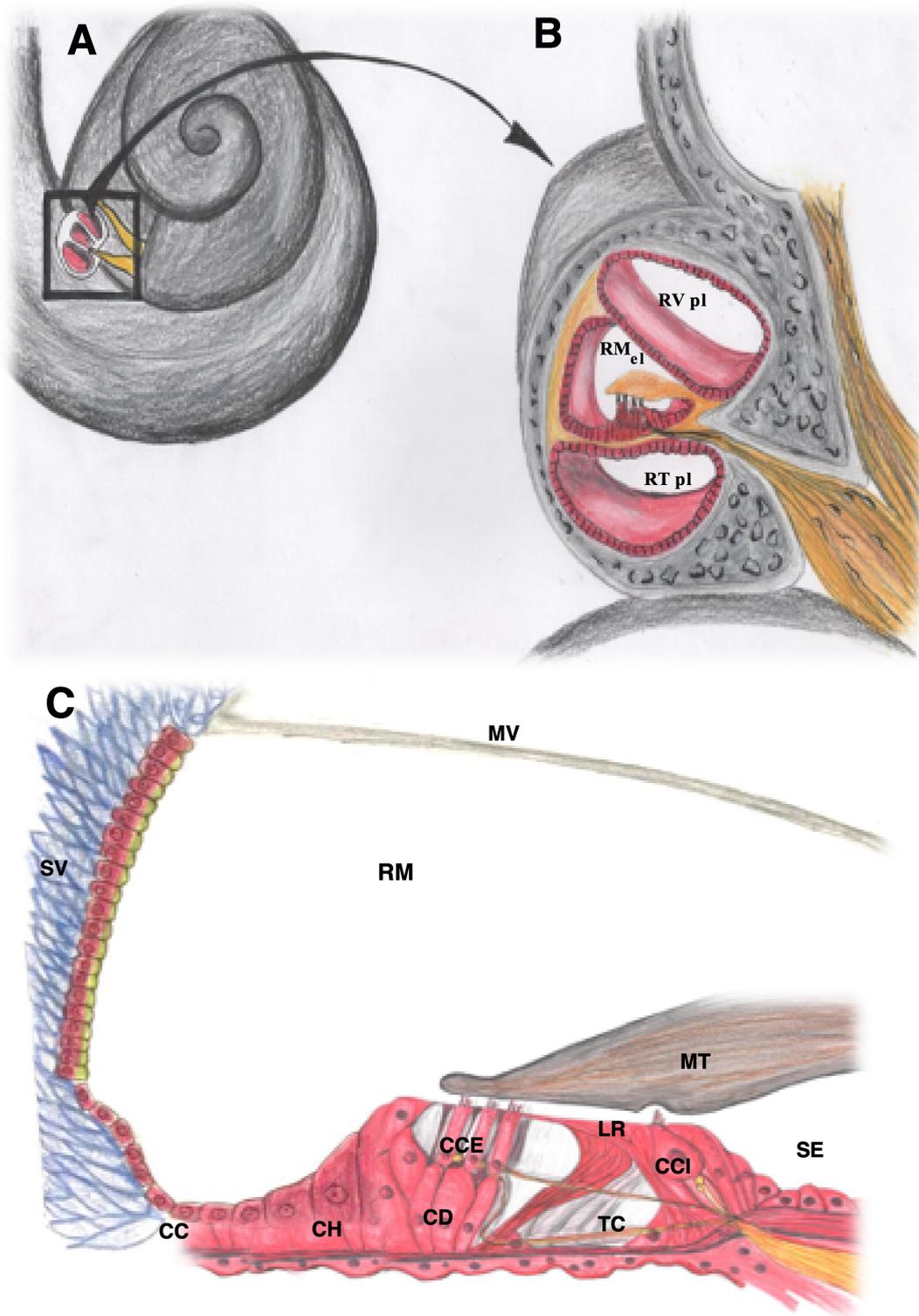


Figura 1. Esquemas de la cóclea y del órgano de Corti. **A:** Cóclea. **B:** Corte transversal de la cóclea, donde se aprecia la compartimentalización en diferentes rampas. **C:** Sección transversal del Órgano de Corti. Abreviaturas: CC: Células de Claudius; CD: Células de Deiters; CCE: Células ciliadas externas; CH: Células de Hensen; CCI: Células Ciliadas Internas; el: endolinfa; EV: Estría Vascular; LR: Lámina Reticular; MT: Membrana Tectoria; MV: Membrana Vestibular; pl: perilinfa; RM: Rampa Media; RT: Rampa Timpánica; RV: rampa vestibular; SE: Surco espiral (compuesto por células interdentes o células t); TC: Túnel de Corti.

1.4 Estructura de las células ciliadas mecanosensoras

Las células ciliadas internas, son las encargadas de transducir los estímulos sonoros para transformarlos en estímulos nerviosos gracias a la apertura de los canales iónicos de K^+ y Ca^{2+} por la tensión creada en las uniones entre ellas, con la consecuente liberación de neurotransmisores. Las células ciliadas externas, sin embargo; tienen una función mecánica. Sirven de modulador del sonido, al recibir y amplificar las ondas sonoras (Bonnet y El-Amraoui, 2012; Gillespie y Müller, 2009; Hackney y Furness, 2013; Mathur y Yang, 2015). Poseen unas microvellosidades modificadas, denominadas estereocilios, formados por filamentos de actina y unidos entre sí mediante diferentes proteínas de unión que permiten el control mecánico de canales de transducción (Zhao y Müller, 2015) (Figura 2).

La distribución precisa de las uniones varía entre las diferentes células ciliadas, existiendo diferentes tipos de enlaces entre los que destacan los enlaces apicales o *tip links*, que conectan el extremo de un estereocilio con el estereocilio contiguo situado detrás de él a lo largo del eje del haz estereociliar (Hackney y Furness, 2013). Se cree que las uniones apicales están formadas por homodímeros de protocadherina 15 (PCDH15) que interaccionan con homodímeros de cadherina-23 (CDH23) (Choudhary et al., 2020). Asimismo, existen otros conectores como son los localizados en la base (*ankle links*), aunque se ha visto que no se encuentran en todos los cilios de las células ciliadas maduras (Hackney y Furness, 2013). En estas uniones destaca fundamentalmente la presencia de la proteína VLGR1 (de las siglas en inglés *G protein G – coupled receptor*, y también denominada GPR98 o MASS1), formando un complejo de filamentos en la zona más cercana a la base del estereocilio. De este modo, se ha observado cómo mutaciones de dicha proteína conllevan alteraciones en la organización estereociliar (McGee et al., 2006) (Figura 2).

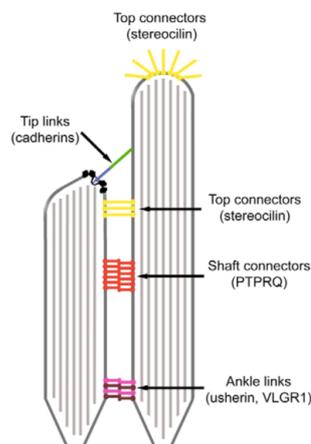


Figura 2. Representación de los diferentes tipos de enlaces estereociliares. Extraído de Hackney y Furness, (2013).

1.5 Bases genéticas de las epilepsias hereditarias

La epilepsia es una enfermedad que origina convulsiones repetitivas que se producen después de una gran variedad de alteraciones en el sistema nervioso. Se han descrito algunas epilepsias de origen genético, relacionándose con mutaciones en genes con funciones muy heterogéneas. Por ejemplo, se ha asociado la incidencia de espasmos infantiles con mutaciones del gen *Cdk15*, gen que codifica una proteína kinasa, situada en el cerebro y que interviene en la maduración neuronal y en la sinaptogénesis (Moseley et al., 2012). También se han descrito otros genes mutados implicados en epilepsias humanas hereditarias que codifican canales iónicos (*Ano3*, *Hcn1*, *Kcnc1*), proteínas de unión a GTP relacionadas con endocitosis (*Dnm1*), con el tráfico entre membranas (*Stx1b*, *Tbc1d24*), proteínas de membrana implicadas en el reconocimiento y adhesión celular (*Pcdh7*), en el desarrollo cerebral (*Qars*) y subunidades del receptor GABA (*Gabra1*) (Helbig 2014, 2015; ILAE 2014; Johannesen et al., 2016).

Los modelos animales de epilepsia de origen genético constituyen también otra herramienta, no sólo para investigación con fármacos, sino también para contribuir al conocimiento de la etiología de la epilepsia. Entre los modelos de ratones que existen en la naturaleza (no transgénicos), se incluye el DBA/2J, ratón tambaleante, letárgico o “stargazer” (denominado así por los movimientos característicos de su cabeza) (Felix, 2002), y suelen estar asociados a alteraciones monogénicas de genes codificantes de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Burgess et al., 1997; Noebels et al., 1990), mientras que fenotipos similares en el humano suelen estar asociados a alteraciones de varios genes (Hughes, 2009). En ratas, los principales modelos genéticos son las GAERS (Epilepsia de ausencia genética en ratas de Estrasburgo), y las WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo/Rij-rat). Ambos modelos presentan mutaciones poligénicas que afectan a los canales de Ca^{2+} tipo T y a los genes que codifican los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Jones et al., 2011), asemejándose más que los modelos de ratón a las epilepsias idiopáticas humanas (Avoli M, 2012; van Luijtelaaar et al., 2002).

1.6. Proteínas implicadas en la mecanotransducción auditiva y en el mantenimiento de la estructura coclear

Estudios de biología molecular han permitido identificar componentes moleculares asociados a hipoacusias hereditarias, entre los que nos encontramos las proteínas ilustradas en la tabla 1, como por ejemplo; el síndrome de Usher y el síndrome de Jervell/Lange Nielsen. Los diferentes genes codifican diferentes tipos de proteínas como las proteínas del citoesqueleto, proteínas localizadas en matriz extracelular; componentes de canales iónicos dependientes de Calcio o Potasio, así como proteínas del canal mecanotransductor; proteínas que forman uniones intercelulares (*gap junctions*), factores de transcripción, proteínas que forman parte de las uniones entre estereocilios y por último; proteínas que participan en el desarrollo post y pre-natal del sistema auditivo.

Algunas de éstas, se postulan como necesarias para el reciclaje del potasio, como la conexina 26 y las proteínas pertenecientes a la familia KCNQ; KCNQ4 y KCNQ1. El gen *Gjb2* codifica la conexina 26 y anomalías en su expresión constituyen la causa más frecuente de hipoacusia monogénica (Kumar et al., 1996). La superfamilia de genes que codifican para canales de K^+ , incluyen los genes *Kcnq1* y *Kcnq4*; responsables de la expresión de proteínas que se postulan fundamentales para el transporte iónico que permite la correcta homeostasis endolinfática (Van Laer et al., 2003), mediando la repolarización y el restablecimiento del potencial eléctrico de las células sensoriales del oído (Chang et al., 2003; Tekin et al., 2001). Mutaciones en *Kcnq4* generan una forma dominante de hipoacusia progresiva (Kubish et al., 1999) y producen el síndrome de Jervell/Lange-Nielsen, (Neyroud et al., 1999; Schulze-bahr et al., 1997).

Otro tipo de hipoacusias relacionadas con canales iónicos son las asociadas al gen *Cacna1d* y al gen *Tmc2*. *Cacna1d* codifica la Subunidad Alfa D del canal de Calcio dependiente de voltaje. Estos canales, denominados CaV1.3, se encuentran en el cuerpo celular de las células ciliadas y se activan con la apertura de los canales mecanotransductores provocada por el sonido (Brandt et al., 2003). La entrada de calcio desencadena la exocitosis de las vesículas

sinápticas glutamatérgicas hacia la zona activa al interactuar el Calcio con la otoferlina (Roux et al., 2006; Pangrsic et al., 2010).

La proteína TMC2 se han localizado en los lugares que se postulan como los canales donde tiene lugar la transducción mecanoeléctrica en ratones, aunque no está claro todavía si son los responsables directos de la trasducción. Se piensa que el mecanismo de entrada de iones para la mecanotransducción depende de la PCDH15 (Corey et al., 2019) al interactuar con una de las subunidades del complejo proteico que forma el canal (Kurima et al., 2015; Liu et al., 2019; Corey et al., 2019; Jia et al., 2020).

Mutaciones en las proteínas del citoesqueleto y en las proteínas que contribuyen a la organización en penacho y a la unión entre los estereocilios, también se relacionan con hipoacusias sensorineurales no sindrómicas. Estas proteínas son componentes de los puentes o uniones entre estereocilios contiguos (Hackney et al., 2013). Entre las proteínas formadoras de estos puentes, encontramos las glicoproteínas de adhesión intercelular CDH23 y PCDH15, que forman los puentes apicales (*Tip links*); el receptor acoplado a proteína G; VLGR1, que forma los puentes basales (*unlike links*), que desaparecen durante el desarrollo post-natal (Hackney C.M. et al., 2013); y el receptor de la Tirosina Fosfatasa, PTPRQ; que forma los puentes laterales (*Shaft links*) (Hackney et al., 2013; Sakuma et al., 2015). La proteína WHRLN y la miosina no convencional, MYO7A, parecen también ser fundamentales para el anclaje de estos puentes y el mantenimiento de la estructura citoesquelética (Hackney et al., 2013).

Otro de los componentes del citoesqueleto de las células ciliadas, en este caso, sólo de las externas, es la Prestina. Ésta, sería la responsable de la función de amplificación de la señal auditiva gracias a cambios en la longitud de estas células ciliadas (Liberman et al., 2002).

En hipoacusias sensorineurales no sindrómicas se ha identificado diversos genes que codifican para factores de transcripción: *Pou3f4* (De kok et al., 1995). La proteína de codifica, POU3F4 pertenece a la familia POU de factores de transcripción. Esta proteína participa en etapas tardías del desarrollo,

controlando la sobrevivencia y la diferenciación final de subtipos particulares de neuronas.

Mutaciones en *Pou3f4* son responsables de hipoacusias mixtas ligadas al cromosoma X, donde el componente de transmisión aparece como resultado de la fijación del estribo. Este gen se expresa en el mesénquima del oído medio e interno, participando en la maduración ósea (Rosenfeld, 1991; Erkman et al., 1996).

Otras proteínas que parecen fundamentales para el proceso mecano-sensorial de transducción son aquéllas que componen la membrana tectoria. Esta estructura genera presión sobre los estereocilios favoreciendo su doblamiento y la apertura del canal mecanotransductor. Entre ellas, encontramos la tectorina alfa, una de las glicoproteínas no colágenas más abundantes en esta estructura y la otoancorina, proteína anclada a membrana con una función estructural entre las células sensoriales y la membrana tectoria. Mutaciones en estas proteínas se asocian con hipoacusias tanto dominantes como recesivas (Legan et al., 2000; McGuirt et al., 1999).

Otras proteínas de interés, son aquéllas que están involucradas en desarrollo normal de la audición, como SLITRK6 y GIPC3. La proteína SLITRK6 se ha detectado durante el desarrollo prenatal del oído interno (Tekin et al., 2013; Salime et al., 2018; Aruga, 2003) y parece fundamental para la normal evolución de las células sensoriales (Aruga, 2003). GIPC3 parece crucial para la maduración postnatal de las células del oído y su supervivencia a largo plazo, así como la del ganglio espiral (Charizopoulou et al., 2011). La tabla 1 muestra un resumen de las principales proteínas implicadas en la mecanotransducción auditiva y en el mantenimiento de la estructura coclear, así como los genes que las codifican y su función principal.

Proteína	Abreviatura	Gen	Codificación del Gen	Función de la proteína
CADHERINA-23	CDH23	<i>Cdh23</i>	Glicoproteína de adhesión intercelular	-Organización y formación de los haces estericiliares en los enlaces de punta (<i>tip links</i>).
PROTOCOLADHERINA-15	PCDH15	<i>Pcdh15</i>	Glicoproteína de adhesión intercelular	-Organización y formación de los haces estericiliares en los enlaces de punta (<i>tip links</i>).
RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G (VERY LARGE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-1)	VLGR1	<i>Vlgr1, Adgrv1, gpr98, Mass1</i>	Receptor asociado a la proteína G	-Organización y formación de haces estericiliares en los enlaces mediolaterales. -Uniones entre estericilios a nivel basolateral durante el desarrollo post-natal (<i>ankle links</i>).
WHIRLINA	WHRNA	<i>Whrna, Dfn31</i>	Proteína de adamio con dominio PDZ	-Organización y formación de haces estericiliares en los enlaces mediolaterales. -Precursor de la formación del citoesqueleto actínico.
RECEPTOR DE TIROSINA FOSFATASA TIPO Q	PTPRQ	<i>Ptpqr, Dfn73, Dfnb84, Dfnb84a, Ptpgmc1, R-ptp-q</i>	Receptor de Tirosina Fosfatasa tipo Q	-Organización y formación de haces estericiliares en los enlaces mediolaterales.
MYOSINA-7	MYO7	<i>Myo7, MyoVIIa, Dfn11, Dfnb2, Nsr2, Ush1d</i>	Proteína miosina no convencional	-Formación de haces estericiliares en los enlaces apicales. -Anclaje para proteínas que conforman el citoesqueleto y los puentes apicales.
PRESTINA	PRESTIN	<i>Prestin, Slc26a5</i>	Proteína transportadora de aniones Cl-	-Mantenimiento de la estructura del citoesqueleto de actina. -Motor que permite cambios longitudinales de las células ciliadas externas.
PROTEÍNA 2 SIMILAR A UN CANAL TRANSMEMBRANA (TRANSMEMBRANE CHANNEL-LIKE PROTEIN 2)	TMC2	<i>C20orf145, Dj686c3.3, Tmc2</i>	Proteína similar a canal de Potencial transitorio	-Componente del canal de mecanotransducción responsable de la despolarización de las células ciliadas tras el estímulo auditivo
ALFA-TECTORINA	TECTA	<i>Tecta, Dfn12, Dfnb21, Dfna8</i>	Glicoproteína no colagénica	-Formación de la matriz a la que se unen las fibras de colágeno de la membrana tectoria.
OTOANCORINA	OTOA	<i>Otoa, Ct108, Dfnb22</i>	Glicoproteína de membrana con función estructural	-Función estructural en la interfase entre el epitelio sensorial y la membrana tectoria. -Desarrollo de la membrana tectoria.
CONEXINA-26	GJB2	<i>Gjb2</i>	Proteína transmembrana que permite la unión intercelular de la estría vascular	- Función estructural de la estría vascular. - Mantenimiento de la homeostasis de la rampa media (ciclo del potasio para el mantenimiento iónico endolinfático).
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CON DOMINIO POU DE CLASE 3 (POU DOMAIN, CLASS 3, TRANSCRIPTION FACTOR 4)	Pou3f4	<i>Pou3f4</i>	Factor de transcripción con dominio Pou	-Desarrollo de la inervación nerviosa de las células ciliadas. -Desarrollo del ganglio espiral.
MIEMBRO 6 DE LA FAMILIA SLIT Y SIMILAR A NTRK (SLIT AND NTRK LIKE FAMILY MEMBER 6)	SLITRK6	<i>Slitrk6, FLJ2274, Dfnmpyp</i>	Proteína integral de membrana	-Mantenimiento y supervivencia de la inervación de las neuronas sensitivas del oído interno.
DOMINIO GPC PDZ QUE CONTIENE LA FAMILIA MIEMBRO 3 (GIPC PDZ DOMAIN CONTAINING FAMILY MEMBER 3)	GIPC3	<i>Gipc3, Dfnb95, Dfnb15, Dfnb72</i>	Proteína Gipc3 (GAIP-interacting protein C terminus)	-Maduración post-natal de las células ciliadas. -Propagación y adquisición de las señales acústicas en las células ciliadas.
MIEMBRO 4 DE LA SUBFAMILIA KQT DE CANALES VOLTAJE DEPENDIENTES DE POTASIO (POTASSIUM VOLTAGE-GATED CHANNEL SUBFAMILY Q MEMBER 4)	KCNQ4	<i>Kcnq4, Dfna2, kv7.4, Dfna2a.</i>	Subunidad de canales K+ Kcnq	-Transporte de iones k+ desde la estría vascular hasta la rampa media.
MIEMBRO 1 DE LA SUBFAMILIA KQT DE CANALES VOLTAJE DEPENDIENTES DE POTASIO (POTASSIUM VOLTAGE-GATED CHANNEL SUBFAMILY Q MEMBER 1)	KCNQ1	<i>Kcnq1, Kvltq1, jIns1, Kcna8, Kv7.1, Kvltq1, Lqt1.</i>	Subunidad de canales K+ Kcnq	-Liberación de k+ desde la estría vascular a la rampa media.
SUBUNIDAD ALFA-1-C DEL CANAL VOLTAJE DEPENDIENTE DE CALCIO (CALCIUM VOLTAGE-GATED CHANNEL SUBUNIT ALPHA-1-C)	CACNAD1	<i>Cacnad, Cach3, Cacna4.</i>	Subunidad de canales Ca+	- Liberación de glutamato actuando sobre la ortofelina.

Tabla 1. Tabla representativa de las proteínas estudiadas, los genes responsables de su expresión, sus diferentes nomenclaturas, su clasificación y las funciones en el sistema auditivo.

2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Los hámsteres GASH/Sal presentan una epilepsia audiógena de origen genético, con pocas variaciones a lo largo de las generaciones. Se han descrito cambios en la expresión de algunos genes en el colículo inferior de los hámsteres GASH/Sal que pudieran contribuir a la génesis o al mantenimiento de las crisis observadas.

Esta línea de hámsteres presenta un alto umbral auditivo. La pérdida auditiva neurosensorial es una condición multidimensional y de etiología muy variada, destacando el componente genético. Además, la presencia de epilepsia audiógena en estos animales hace pensar que, si ambas patologías conviven, existan anomalías en el origen de la vía auditiva nerviosa, la cóclea.

Por tanto, resulta de interés saber cómo se encuentran expresadas algunas de dichas proteínas en la cóclea del hámster GASH/Sal y así poder determinar cómo afectan al funcionamiento de la audición ya que, si estas se encuentran infra o sobre-expresadas, entonces se deben materializar en cambios a nivel morfológico, de número y organización de la anatomía coclear, lo que puede constituir una diana de investigación terapéutica en el abordaje de las hipoacusias y sorderas congénitas.

2.2 Objetivos

2.2.1. Objetivo General

El objetivo principal y transversal de este trabajo es estudiar las modificaciones morfofuncionales presentes en el órgano de Corti del modelo de epilepsia audiógena GASH/Sal

2.2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Estudiar los cambios morfológicos presentes en el receptor auditivo de la línea de hámsteres GASH/Sal.

Objetivo 2: Realizar un estudio morfométrico de las células ciliadas internas, externas y de Deiters en la cóclea de hámster GASH/Sal.

Objetivo 3: Estudiar los cambios de expresión génica en el receptor auditivo de la línea de hámsteres GASH/Sal que pudieran estar implicados en las alteraciones morfofuncionales existentes en los GASH/Sal.

Objetivo 4: Estudiar la localización de proteínas importantes en la audición en el órgano de Corti del GASH/Sal.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental llevado a cabo en este estudio consistió en la extracción de cócleas de hámsteres GASH/Sal y control, de entre 3 y 4 meses de vida tras eutanasia gaseosa. A continuación, unas cócleas se utilizaron para estudios morfológicos (de microscopía óptica, electrónica y obtención de espiras en superficie) y otras se destinaron al estudio de expresión génica mediante RT-qPCR. Para esto último, se extrajo el ARN y se cuantificó; se llevó a cabo la reverso-transcripción y cuantificación del cDNA y, para finalizar; se realizaron las PCRs cuantitativas (qPCR) para su posterior análisis. El diseño se esquematiza en la Figura 3.

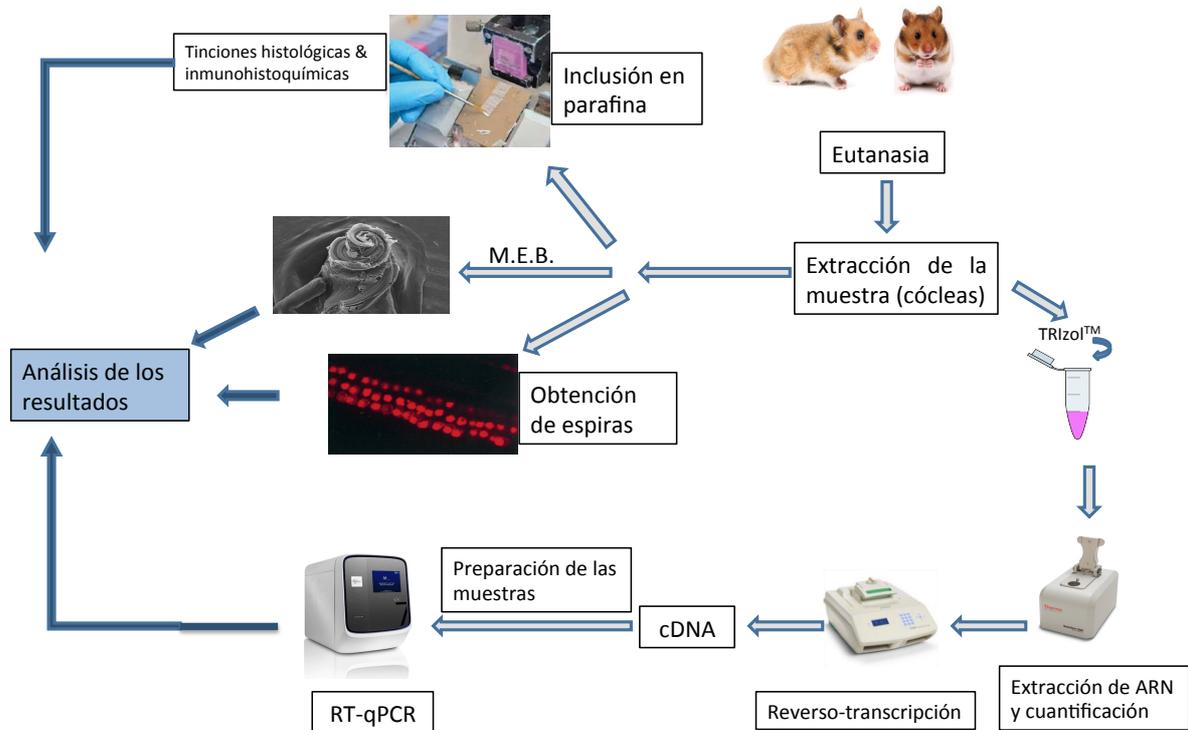


Figura 3. Esquema del diseño experimental. Abreviaturas: M.E.B: Microscopía Electrónica de Barrido; cDNA: DNA complementario; RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo Real.

4 –MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales de experimentación.

Para este estudio se utilizaron hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) de dos líneas: animales propensos a padecer convulsiones audiógenas, GASH/Sal (*Genetic audiogenic seizures*), que fueron obtenidos del bioterio de la Universidad de Salamanca (USAL, España) y hámsteres dorados controles, del laboratorio Le Genest-Saint-Isle. Los animales fueron manejados de acuerdo con las directrices para el uso y cuidado de animales de laboratorio establecidas por el Real Decreto español 53/2013 y por la Directiva Europea 2010/63/EU. El trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca, el cual puede ser consultado en el apartado de Anexos.

4.2 Grupos experimentales

Se han utilizado hámsteres dorados machos GASH/Sal y hámsteres sirios dorados de 9 a 11 semanas de edad.

Los animales se mantuvieron en el animalario del INCYL (Instituto de Neurociencias de Castilla y León) alojados en cajas de policarbonato en habitaciones con la temperatura y humedad controladas y con ciclos de 12 horas de luz y de oscuridad con agua y comida *ad libitum*. Los animales experimentales tras excitación auditiva son más susceptibles a las convulsiones, entre los 2 y los 4 meses (Muñoz et al., 2017). Sin embargo, en nuestro estudio no los hemos sometido a esta estimulación.

Los animales utilizados para cada una de las técnicas se reflejan en la tabla siguiente:

Nº animales		
Controles	GASH/Sal	Técnica
6	6	M.E.B.
6	6	RT-qPCR
4	4	Inclusión parafina
8	4	Preparaciones de superficie
5	5	Validación mutación gen <i>Otoa</i>

Tabla 2. Número de animales controles y GASH/Sal utilizados en las diferentes técnicas realizadas.

Los estudios se realizaron con el objetivo de minimizar el número de sacrificios y evitar el sufrimiento de los animales experimentales.

El sacrificio se realizó bajo anestesia profunda, utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal.

4.3 Obtención de muestras biológicas

4.3.1. Obtención de muestras de tejido fresco

Los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano. Tras comprobar su arreflexia, fueron eutanizados con guillotina. A continuación, se procedió a la extracción y disección de las cócleas, que fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el procedimiento de extracción de ARN.

En el mismo proceso, se extrajeron diferentes órganos y estructura cerebrales que son guardados para posteriores trabajos, incluyendo la extracción de ADN para la validación de los genes mutados.

4.3.2. Obtención de muestras histológicas

4.3.2.1 Perfusión

Anestesiámos al animal por vía intraperitoneal con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso). Después de comprobar la arreflexia del animal, procedimos a la perfusión intracardiaca por vía aórtica. Tras acceder al corazón a través de la cavidad torácica e inyectarle 0,08 ml de heparina (1% Mayne Pharma España S.L), se realizó una incisión en el vértice del ventrículo derecho y se introdujo una pequeña cánula hasta asentarla y clamparla dentro de la aorta, a través de la cual, y tras realizar un pequeño corte en la aurícula derecha (para abrir el circuito), inyectamos las soluciones de perfusión.

El proceso de perfusión constó de dos partes: el lavado del sistema circulatorio con 150 ml de solución Ringer libre de calcio (NaCl 0,85%, KCl 0,025% y NaHCO_3 0,02% en H_2O destilada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 6,9) y la introducción del líquido fijador, utilizando 200 ml de paraformaldehído (4% en tampón fosfato (TF) 0,1

M, pH 7,4, a temperatura ambiente). El flujo de los diferentes líquidos se logró aprovechando la fuerza de la gravedad, colocando el decantador a una altura de 1,10 m. sobre el nivel del animal.

A los tres días de la eutanasia, se realizaron los cortes en congelación.

4.3.2.2 Extracción del encéfalo

Tras la perfusión, se dejó a los animales 2 horas en nevera para mejorar la fijación en la cavidad intracraneal. Posteriormente, se decapitó a los animales y se les retiró el encéfalo. Retiramos las meninges y los crioprotegimos por inmersión en sacarosa al 30% en una solución de tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4, durante 2 ó 3 días a 4°C en agitación constante; a continuación, los congelamos para experimentos posteriores

4.3.2.3 Extracción de Cócleas

Tras la perfusión, se extrajeron las cócleas. Posteriormente, se mantuvieron 2 horas en solución de fijación, pasando el fijador por ventana oval, perforando el ápex para lograr la circulación del líquido. Tras la extracción de las muestras, se procedió al proceso de preparación para su visualización por microscopía electrónica de barrido, obtención de espiras o inclusión en parafina (ver apartados siguientes).

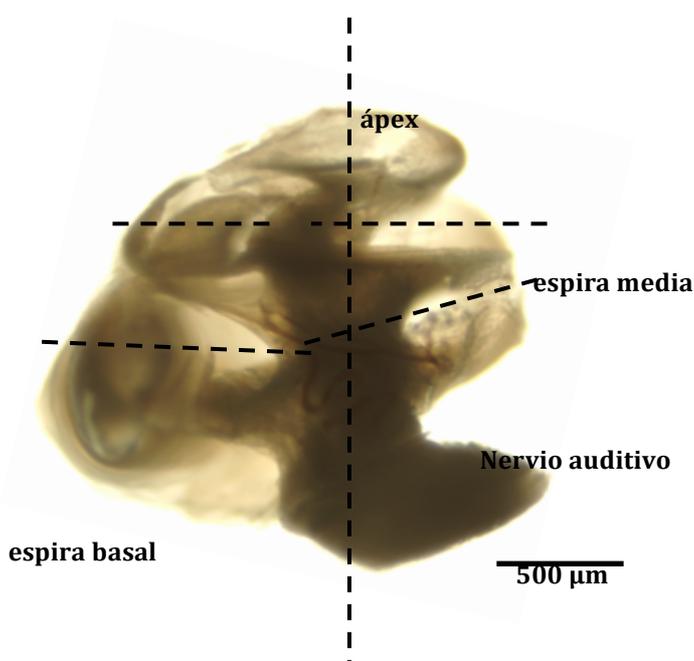
4.3.2.4 Obtención de muestras para MEB

Tras la perfusión, se extrajo la ampolla auditiva y, bajo disección microscópica, se abrió para obtener la cóclea. A través de la ventana redonda, la cóclea se perfundió con una solución de glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,4, durante 4 horas a 4°C, y después se mantuvo en una solución fijadora durante 24 horas. Tras lavar 3 veces durante 5 minutos cada vez con tampón fosfato al 0,1 M, pH = 7,4, se fijaron las cócleas con Tetróxido de Osmio al 1% durante 2 horas a 4°C y se sometieron a deshidratación a temperatura ambiente en una batería con etanol a concentraciones ascendentes (50%, 70%, 90% y 95% - durante 10 minutos en cada concentración) y tres veces con etanol absoluto durante 15 minutos. Tras la deshidratación completa, se realizó el secado con CO₂ con el método del punto

crítico (BAL-TEC CPD 030®, Critical Point Dryers). Cada cóclea se fijó en un soporte metálico, se introdujo en cámara de vacío con vapores de oro y se examinó con un microscopio electrónico de barrido (JEOL SCANNING MICROSCOPE — JSM 5200).

4.3.2.5 Obtención de espiras

Para la obtención de las espiras, una vez extraída la cóclea, se dividió en dos mitades mediante un corte paramodiolar, teniendo como referencia la ventana redonda (figura 4). Con unas pinzas muy afiladas y una cuchilla se cortan las espiras (apical, medial y basal), se elimina la pared las membranas tectoria y



de Reissner. Todo ello realizado en TBS 0,05 M que garantice la preservación de la muestra. Tras la obtención de estas muestras, se realizan los procesos de tinción acorde al protocolo descrito en los apartados siguientes.

Figura 4. Esquema ilustrativo de la obtención de espiras cocleares sobre una cóclea disecada y fijada.

4.4 Técnicas empleadas

4.4.1 Inclusión en parafina

Las cócleas fijadas se decalcificaron en ácido etilen-diaminatetraacético (EDTA) 8% en tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,4 durante 10 días a temperatura ambiente en agitación. Tras un lavado exhaustivo en agua destilada, se deshidrataron con alcoholes crecientes desde 70°, (una noche) hasta el de 100°, según protocolo de rutina (Gómez-Nieto et al., 2020). Terminada la

deshidratación, se pasaron a una inmersión en la mezcla de alcohol/tolueno, seguida de la inmersión tolueno puro, para posteriormente sumergirlas en parafina (Paraplast plus®, #502004, McCormic Scientific, St Louis, MO, USA), una primera inclusión toda la noche y una segunda en nueva parafina un mínimo de 2 horas, desde donde se procede a elaborar los bloques.

4.4.2 Inmunohistoquímica de cortes de cóclea en parafina

Las cócleas incluidas en parafina se cortaron orientadas según el eje paramodiolar en secciones de 6 µm de espesor, colocándose sobre portaobjetos recubiertos de poli-lisina (Superfrost™ Plus, # 22-037-246, Fisher Scientific). Para inmunotemplar las cócleas, las secciones fueron primero pretratadas con H₂O₂ al 3% en agua destilada para reducir la actividad de la peroxidasa endógena. Tras varios lavados en TB-Tx se incubaron durante 1 hora en la solución de preincubación con suero bovino fetal (Vector Laboratorios, Burlingame, CA) para bloquear los sitios de unión no específicos en el tejido.

En el caso de SLITRK6, se tuvo que hacer la recuperación de epítomos con calor, a 95°C durante 20 minutos.

Posteriormente, los portaobjetos con las secciones se incuban a 4°C durante 72h en una solución que contendrá el anticuerpo primario a estudiar. Pasado este tiempo, los portaobjetos se lavaron en buffer de Tris (0,1M, ph 7,4) y se sumergieron durante 2 horas en otra solución con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG del animal del que se ha obtenido el primario. Para la visualización de las uniones entre los anticuerpos y el tejido, los cortes se incubaron con el complejo avidina-biotina (kit EnVision FLEX Mini Kit, #K8023, Agilent, Santa Clara, CA, US) durante 2 horas.

Trascurrido ese tiempo, se trataron con el componente de revelado de DAB del kit (Substrate Buffer (SM803) + DAB+Chromogen (DM827), y se produjo un precipitado de color marrón. Una vez finalizado el proceso, se deshidratan los cortes y, por último, se coloca un cubre que se pega con un medio de montaje, generalmente Entellan® (#1079600500, Merck, Darmstadt, Germany).

Todo el proceso de inmunotinción se realizó con los cortes dispuestos horizontalmente en una cámara húmeda. Los anticuerpos usados se reflejan en la tabla 3.

4.4.3 Inmunohistoquímica de espiras cocleares

Para inmunotefñir las espiras aisladas, una vez diseccionadas y divididas en secciones (basal, medial y apical) se colocaron en una placa microtituladora y se manipulan con una rejilla de microscopia electrónica para trasladar las secciones sin dañarlas. El procedimiento, básicamente; es similar al descrito anteriormente, pero para quitar o cambiar los líquidos, se usa una micropipeta de 200 µL con precaución de no absorber las espiras.

Se realizó un lavado en TBS 0,05 M pH 7,6 seguido de un bloqueo de marcaje con Normal Horse Serum durante una hora para evitar la inmunotinción inespecífica. A continuación, se incubó en un cóctel de anticuerpos primarios anti-sinaptofisina, VLGR11, parvalbúmina o CDH23 (según el objetivo) durante 72 horas a 4° C en agitación.

Tras este tiempo, se lavó con TBS 0,05 M pH 7,6 tres veces durante 15 minutos en agitación, para después incubar en un cóctel con los anticuerpos secundarios. Tras varios lavados con TBS, previo a la colocación del cubreobjetos, se añadió una mezcla en proporción 1:1 de VECTASHIELD® HardSet™ Antifade Mounting Medium with Phalloidin H-1600-10 (TRITC-Phalloidin) y VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI: H-1200-10; ambos de Vector Laboratories, Inc. CA, USA.

De esta manera, se logró teñir el citoesqueleto de las células gracias a la afinidad de la faloidina (TRITC-Phalloidin) por los filamentos de actina, y los núcleos celulares con DAPI gracias a su afinidad por la timina y adenina del ADN.

Los anticuerpos utilizados y el objetivo de su empleo se reflejan en la tabla 3.

Antígeno	Ac primario	Dilución	Referencia	Ac secundario	Dilución	Referencia	Objetivo
VLGR1	Rabbit anti-Mass1	1/50	NBP2-57048	Goat anti-rabbit IgG	1/200	BA-1000	Visualizar VLGR1 en campo claro
VLGR2	Rabbit anti-Mass1	1/100	NBP2-57048	DyLight horse anti-rabbit IgG (488nm)	20µg/mL	DK-8818	Visualizar VLGR1 mediante epifluorescencia
CDH23	Rabbit anti-Mass1	1/400	Ab131135	Goat anti-rabbit IgG	1/200	BA-1000	Visualizar Cadherina 23 en campo claro
CDH23	Rabbit anti-Mass1	1/400	Ab131135	Cy TM 2 Donkey anti-rabbit IgG	1/50	IR-711-225-152	Visualizar Cadherina 23 mediante epifluorescencia
PCDH15	Rabbit anti-Mass1	1/200	Sc-377235	Horse anti-mouse IgG	1/200	BA-2000	Visualizar Protocadherina 23 en campo claro
SLITRK6	Rabbit anti-Mass1	1/15	Ab188813	Goat anti-rabbit IgG	1/200	BA-1000	Visualizar la proteína de membrana SLITRK6 en campo claro
SYP	Rabbit anti-Mass1	1/100	SVP-38	DyLight horse anti-mouse IgG (594nm)	20µg/mL	DK-8818	Visualizar terminales nerviosas mediante epifluorescencia
PARV	Rabbit anti-Mass1	1/1000	SW-PV28	DyLight horse anti-rabbit IgG (488nm)	20µg/mL	DK-8818	Visualizar parvalbúmina mediante epifluorescencia

Tabla 3. Reactivos utilizados en las inmunotinciones de cócleas. Abreviaturas: AC: anticuerpo; Ab: ©Abcam, Cambridge, UK; BA: ©Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; DK: ©DyLight Kit (Vector Laboratories, CA, USA) Ig: inmunoglobulina; IR: ©Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. PA; USA; NB: ©Novus Biogicals, Centennial, CO, USA; PARV: parvalbúmina; Sc: ©Santa Cruz biotechnology, Inc. Dallas, Texas, U.S.A.; SW: ©Swant Inc. Switzerland ; SA: ©Sigma-Aldrich, MO, USA

4.4.4 Tinción de Nissl

Para tener un contraste y referencia de los tejidos, las secciones se tiñeron con violeta de cresilo (Tinción Nissl). La tinción de Nissl nos permite poner de manifiesto los núcleos de las células, así como la sustancia tigroide de las neuronas. Estas dos estructuras se tiñen debido a su composición en ácidos ribonucleicos. Para ello se emplean colorantes básicos de anilina, en nuestro caso; el violeta de cresilo, que se depositan en los radicales ácidos de los ácidos nucleicos debido a fuerzas electropolares. De esta forma, los portaobjetos que contenían las secciones a destinadas a la tinción de Nissl, tras desparafinar las secciones, fueron sumergidos durante 12 minutos en la solución de violeta de cresilo (C-1791, Sigma) al 1% en agua destilada a 60° C. Transcurrido el tiempo, se continuó con el protocolo de diferenciación y deshidratación rutinariamente empleado en el laboratorio.

4.4.5 Diseño de cebadores (*primers*)

Los primers se diseñaron para el *Mesocricetus auratus*. La secuencia de genes se obtuvieron de Ensembl Genome Browser database (<http://www.ensembl.org/index.html>) y los primers se diseñados alieneados en

diferentes exones usando el software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) (Table 1). La calidad de los primers diseñados fue evaluada a través del software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) evitando pares de cebadores con grandes defectos estructurales. Su especificidad fue probada a través de los análisis de alineamiento se realizaron usando el software Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los primers fueron sintetizados por Thermo Fisher Custom Primers (Invitrogen - Thermo Fisher). Finalmente, para comprobar la especificidad, recurrimos al programa Primer design tool (NCBI).

Símbolo del gen	Ensembl Number	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Tamaño (pb)
<i>Ptprq</i>	ENSMAUG00000014282	GAGTGTTTAGTGACCCATTTCTTTT	GACTGTGAGATTGACCACTTTACC T	71
<i>Gjb2</i>	ENSMAUG00000021056	CTCACTCAGACCTGCTCCTTCC	ATGCTGGTGGAGTGTGGTTGA	149
<i>Kcnq1</i>	ENSMAUG00000020417	CAGCCCCAAGCCTAAGAAGTC	TCTCCAGGACCCATTCCATTAT	81
<i>Kcnq4</i>	ENSMAUG00000013747	TGAAGGTCCAGGAGCAGCATA	CCGGCTTGTGTCAGTGGAGTA	107
<i>Myo7a</i>	ENSMAUG00000002971	GCTACAGGGACCACCTCATCTA	TATTGGTGTATTGGCGGATGT	111
<i>Tecta</i>	ENSMAUG00000021166	TGCTACTTGGGTTTTTCATTGTG	TGAATGTGTACGAGCCATCAGA	116
<i>Pou4f3</i>	ENSMAUG00000004271	CCGTA CTGCAAGAACCCAAA	GCTCTCATCAAAGCTTCAAATA	116
<i>Tmc2</i>	ENSMAUG00000006671	TCTCCGTA CTCTGGGATTTTGA	AATGGTCTCTGGTTGTTGTAGTA G	80
<i>Cacna1d</i>	ENSMAUG00000020160	CTGTGAACACCGAGAACGTAAGT	CAGCCAGTAAAACGTGACAGATT	167
<i>Otoa</i>	ENSMAUG00000013350	TGCCTATCTGAACTCACGGAA	GGGGCTGATACAAACTACTGCTC	92
<i>Whrn</i>	ENSCGRG00001018474	AGAGTGCAGATGAGAAAAAGGTGA	GTCCACGCCAGTGATGTAATG	113
<i>Gipc3</i>	ENSMAUG00000021524	GAGCAGGAGCAAGTGTTCCTG	GATGTAGCTCTCCAGCAGGTCGT	154
<i>Cdh23</i>	ENSMAUG00000016882	ATCCAAGTTGGAGATGTGAATGAC	GTTGACGATGAAGATGGGTGTC	108
<i>Pcdh15</i>	ENSMAUG00000022156	AGTTCTGGATAGAGACCCACCA	ATAACTGTGCCACCTTCTTGT	84
<i>Prestin</i>	ENSMAUG00000000055	TCGCCATGTCTGTGACCTTA	CCCCTGTACCGCTTTGTTT	185
<i>Vlgr1</i>	ENSCGRG00000009203	CAGCGCCGTTCTGGATGTTG	TATCAATTCTGGCACCGCCT	110
<i>Slitrk6</i>	ENSMAUG00000013249	ACTGCACTGTGCTTGGTGT	TGAGGGCATTGGTGATTGGG	210
<i>Actb*</i>	ENSMAUG00000008763	AGCCATGTACGTAGCCATCC	ACCCTCATAGATGGGCACAG	115

Tabla 4. Secuencias de los primers diseñados para los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real. Se utiliza el gen de actina* como control endógeno.

4.4.6 RT-qPCR

Extracción del ARN

Las cócleas recogidas, según el apartado 4.3.1., se transfirieron al reactivo TRIzol™ (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). El ARN celular total del tejido congelado, se extrajo de las muestras individuales de tejido utilizando el reactivo TRIzol™ de acuerdo con el procedimiento del fabricante. En primer lugar, se llevó a cabo la homogenización de las muestras en 400 µL del reactivo TRIzol™, tras lo que fueron incubadas a temperatura ambiente durante 5 min para la completa disociación de las núcleo-proteínas. Seguidamente, se realizó una extracción selectiva del ARN por separación de fases mediante la adición de 80 µl de cloroformo, incubación a temperatura ambiente durante 2-3 min y centrifugación a 15 min a 12.000x *g* a 4°C. Como resultado, se obtuvieron muestras separadas en tres fases: la fase orgánica, formada por proteínas y DNA; la interfase; y la fase acuosa, incolora, que contiene el ARN. El ARN obtenido en la fase acuosa precipita con un volumen de 200 µL de isopropanol, centrifugando durante 10 min a 12.000 x *g* a 4°C. A continuación, el sobrenadante es eliminado, posteriormente resuspendido en 400 µL de etanol al 75% y centrifugado durante 5 min a 7.500 x *g* a 4°C. Después de eliminar el sobrenadante y secar el ARN bajo la campana de flujo laminar, se resuspende en 20-50 µL de agua libre de ARNsas, y se incuba en un baño de agua a 55-60°C durante 10-15 minutos. La concentración de ARN se determina por espectrofotometría a 260 nm mediante el espectrofotómetro *Nanodrop™ 2000c* (Thermo Scientific).

Obtención del ADN complementario y reacción en cadena de la polimerasa

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 800 ng de ARN total utilizando el kit del sistema de transcripción inversa ImProm-IITM (Promega Corporation, Madison, SWI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

El análisis de RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el sistema QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems by Life Technology, Europa) con la Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies, Europa).

La mezcla de PCR de 20 µl contenía 80 ng de molde de ADNc, 400 nMol de cada cebador y 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix. Los cebadores (*primers*) específicos para los genes examinados en el presente estudio (ver Tabla 3), se diseñaron por medio del software Primer3 v.0.4.0., de forma que los productos de la RT-qPCR abarcaran dos intrones identificados. La amplificación de la PCR fue la siguiente: 10 minutos a 95 °C antes de 40 ciclos térmicos, cada uno de ellos consistente en desnaturalización a 95 °C durante 15 s y recocido/extensión a 60 °C durante 30 s, seguido de la curva de fusión. Los datos de salida se analizaron con el software QuantStudio 7™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) y se normalizaron por la expresión de un gen endógeno, beta-actina (*Actb*). El valor de la expresión génica relativa de cada transcrito se calculó siguiendo fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ("condición 1"- ΔCt "condición 2"), donde "condición 1" corresponde a la muestra experimental, "condición 2" corresponde a la muestra del animal de control, y ΔCt de cada "condición" es Ct "gen experimental" - Ct "gen endógeno" (Damasceno et al., 2020). Por último, se utilizó una reacción de control negativa sin muestra (agua) en todas las RT-qPCR y el grupo de control se utilizó como muestra de calibración.

4.4.7 Validación de variantes génicas

Para validar alteraciones en nuestro gen de interés, se siguió el protocolo estándar aplicado en el laboratorio (Díaz-Casado et al., 2020). Básicamente, consiste en diseñar cebadores específicos para las alteraciones genéticas de los genes a estudiar, utilizando Primer-BLAST – NCBI – NIH disponible en línea (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Las mutaciones se probaron en el gen *Otoa*. Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron sintetizados por ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). Las PCR se realizaron utilizando GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, EE. UU.). En un volumen total de 50 µL, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las siguientes condiciones de ciclos térmicos fueron utilizado para la PCR: 2 min a 95° C, seguido de 35 ciclos de 95° C durante 30 s segundos, 60 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 30 s, con una extensión final a 72 ° C durante 5 min. Después de la PCR, 10 µl de carga 6Xtampón (azul de

bromofenol al 0,03%, EDTA 60 mM (ácido etilendiaminotetraacético), 10 mM Tris-HCl pH 7,6 y 30% de glicerol) se mezcló con el volumen total (50 µL) de cada PCR para separar los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en 1X TAE (Tris acetato EDTA) (ThermoFisher Scientific) durante 30-40 min a 100 V. Los ácidos nucleicos, separados en gel de agarosa, se identificaron con RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi, Corea del Sur) y fotografiaron con un transiluminador ultravioleta. El fragmento de ADN de interés se eliminó del gel de agarosa, se purificó usando NucleoSpin Gel y PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y eluyó en 18 µL de agua libre de ADNasa. Las muestras fueron secuenciadas por el método de Sanger de secuenciación en el Servicio de secuenciación de ADN de Nucleus, de la Universidad de Salamanca.

4.5 Adquisición de imágenes y análisis del tejido

Para el análisis de las muestras procesadas para microscopía óptica, se utilizó un microscopio óptico (modelo DMLB de Leica, Wetlar, Alemania) con una cámara Olympus DP70 (Germany 541006) acoplada al mismo, y con disponibilidad de observación en la pantalla y en tiempo real de la imagen captada por el microscopio. El programa con el que se visualizaban las imágenes en el ordenador fue el PDController (versión 1.2.1.108), mientras que el programa de almacenaje de las capturas hechas fue el DPManager (versión 1.2.1.107). Para la adquisición de imágenes de secciones procesadas para inmunofluorescencia se realizaron con el mismo microscopio mediante un sistema de epifluorescencia Leica (modelo EL6000) con lámpara de mercurio.

Para la contabilización y análisis de la morfometría de células, se utilizó el software Fiji Is Just ImageJ 1.53c (plus). El objetivo elegido fue 20x, y la calidad de imagen 1360 x 1024 con ISO 200. Se utilizó el *plugin* “*cell counter*” de dicho software para la contabilización manual de la muestra.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se visualizaron en un Microscopio electrónico JEOL SCANNING MICROSCOPEdJSM 5200.

4.6 Análisis estadístico

Los datos referentes a las muestras obtenidas y analizadas mediante software Fiji Is Just ImageJ, fueron recogidos en Microsoft Excel v16.49 para su análisis cuantitativo. Todos estos datos se expresaron como valor medio \pm error estándar de la media (SEM).

Para comparar los resultados se utilizó el estadístico *t*-student para muestras independientes con varianzas distintas. Los datos son considerados significativos con un valor $p \leq 0,05$. Empleamos el programa SPSS (v 15.0 para Windows; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

5 –RESULTADOS

5.1 Estructura del órgano de Corti del GASH/Sal

5.1.1. Histología coclear

Las alteraciones descritas en los registros troncoencefálicos auditivos (Muñoz et al., 2017; Sánchez-Benito et al., 2017), podrían estar asociadas a la existencia de anomalías en el oído interno. A tal propósito, se efectuó un estudio coclear utilizando muestras incluidas en parafina, con secciones paramodiolares de 6µm contrastadas con el método de Nissl. Tanto en los grupos control como en los GASH/Sal se apreció una total conservación de la membrana de Reissner (vestibular), basilar y tectoria, sin observar ninguna alteración de las espiras cocleares (Figura 5), apreciándose una pérdida aparente de las células ciliadas del órgano de Corti. Además, se demostró la presencia de variaciones de la morfología usual. Debido a estas observaciones, se decidió estudiar las estructuras que componen este órgano. Nomenclatura rara. Hay que actualizar y unificar

En ambos grupos de animales (Figura 5), las células sustentaculares (de soporte) y los penachos de las células ciliadas, se identificaron claramente con esta técnica, pero en los hámsteres GASH/sal se exhibieron, en algunos lugares, una ausencia de penachos de estereocilios tanto en las células ciliadas internas como en las externas (Figura 6).

En ambos animales se pudieron distinguir netamente las células de Deiters y las de los pilares, pero con una densidad en tonofilamentos en estas últimas, claramente menor en los GASH/Sal, como demuestra la disminución en la intensidad de la tinción del violeta de cresilo.

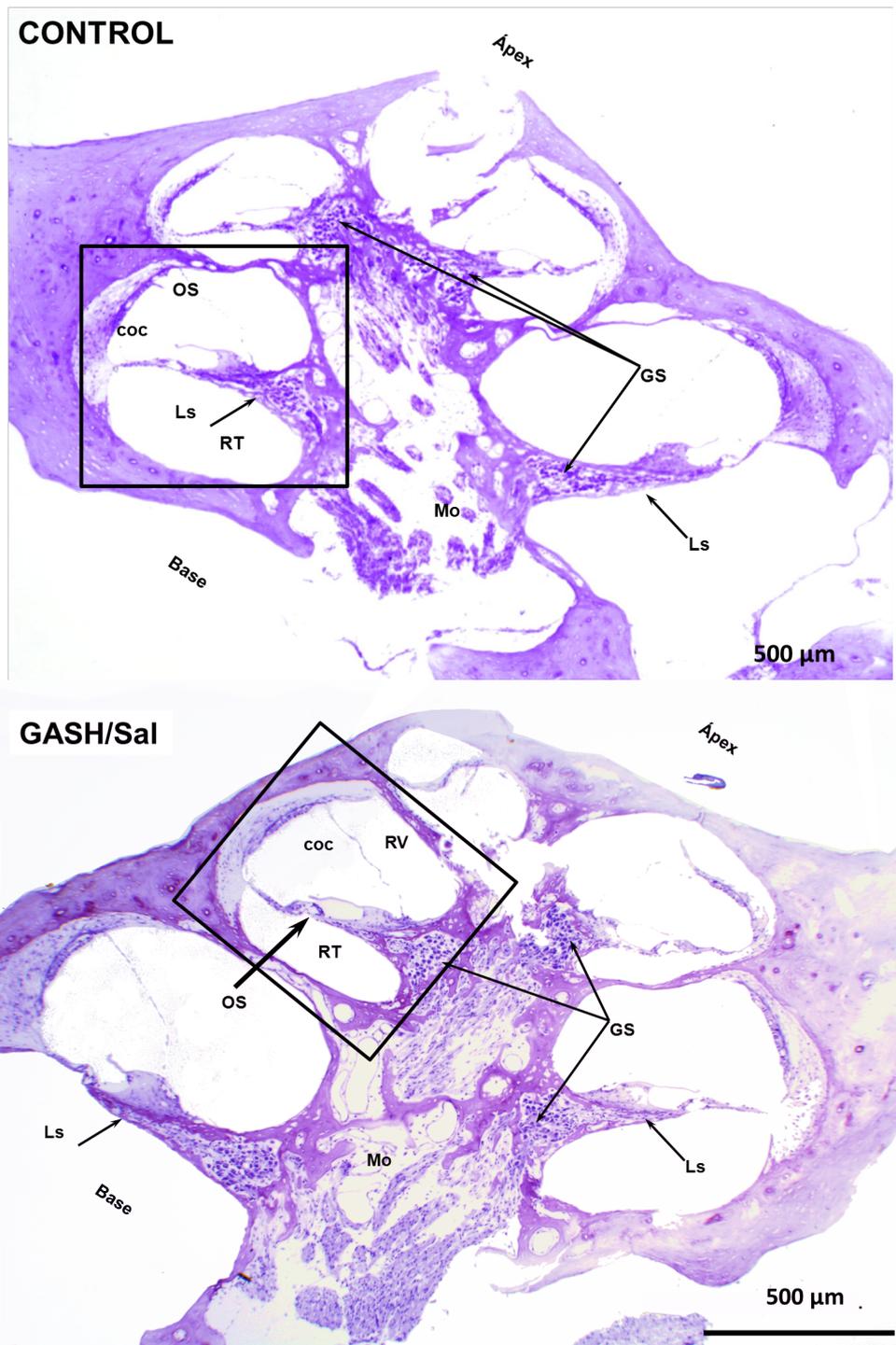


Figura 5. Observación de una sección paramodiolar de la parte media de la cóclea del hámster control y GASH mediante una tinción de Nissl. **A:** Control; **B:** GASH/Sal. Una de las secciones de la espira media se encuentra enmarcada en un rectángulo. Abreviaturas: coc: conducto coclear; RM: ramba media; Mo: columela; GS: ganglio espiral; Ls: lámina espiral; MB: membranas basilar; OS: órgano de Corti; M: la membrana vestibular; RT: ramba timpánica y RV: ramba vestibular.

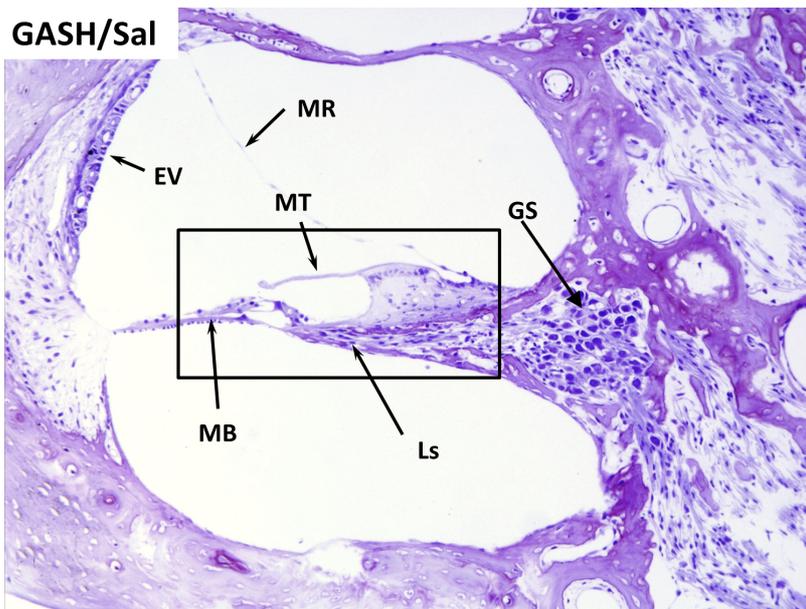
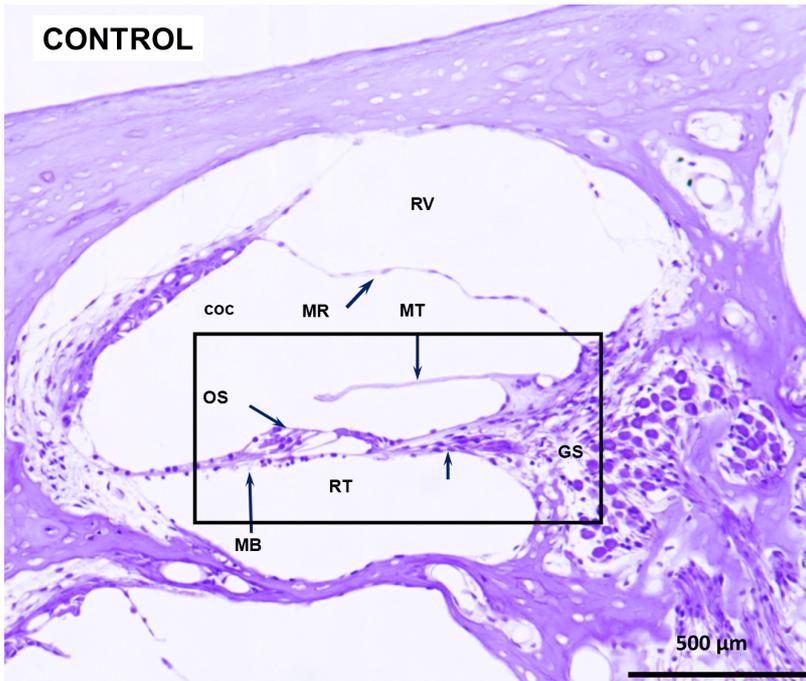


Figura 6. Observación de la sección anterior a mayores aumentos. Nótese que en el interior del modiollo se distingue claramente las neuronas del ganglio espiral en menor densidad que en los animales controles. Abreviaturas: GS: ganglio espiral; EV: la estría vascular; Ls: lámina espiral; MB: la membrana basilar; MR: membrana de Reisner; MT: membrana tectoria.

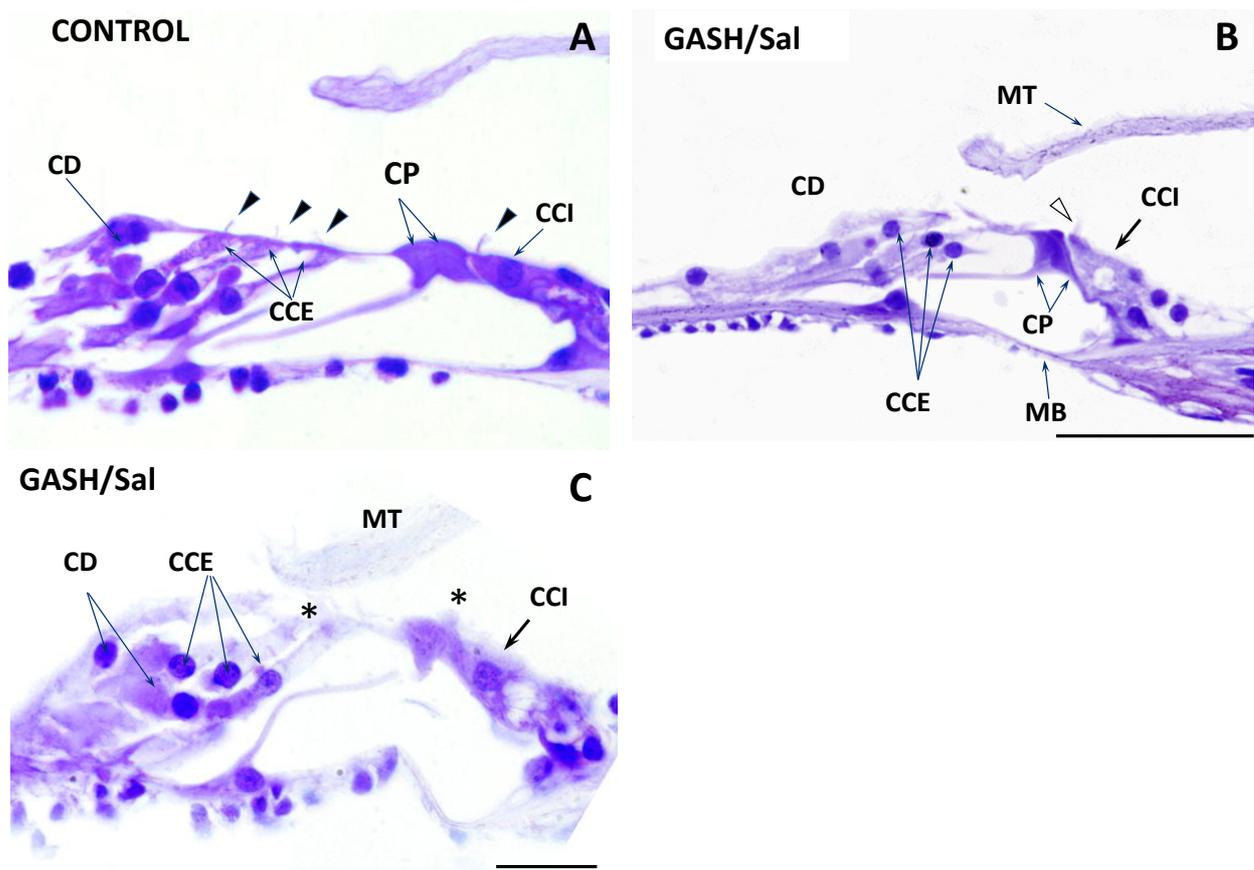


Figura 7. Detalles de la espira media del órgano de Corti enmarcados en la figura. **A:** Control; **B:** GASH/Sal. **C:** Detalle a gran aumento del OC del GASH/Sal. Se aprecian las células ciliadas internas (CCI), sustentadas por las células de Deiters (CD) y separadas por las células de los pilares (CP). Los estereocilios se indican con puntas de flecha. En los GASH/Sal se aprecia una menor intensidad de la tinción en los tonofilamentos en estas células. En las células ciliadas del GASH/Sal no se distinguen con esta tinción los estereocilios (asteriscos), aunque en ocasiones puede aparecer alguno, como se muestra en las ciliadas internas (cabeza de flecha hueca en B). Abreviaturas: CCE; células ciliadas externas; CCI: células ciliadas internas; CD: células de Deiters; CP: células de los pilares; MB: membrana basilar; MT: membrana tectoria. Barras de calibración, A y B, 20 μ m; C, 10 μ m.

5.1.2. Inmunohistoquímica.

Las cócleas incluidas en parafina se procesaron inmunohistoquímicamente para visualizar algunas de las proteínas cocleares del estudio.

De los anticuerpos utilizados, sólo obtuvimos resultados fiables de las inmunotinciones para visualizar SLITRK6 y CDH23 (Figuras 8 y 9). No pudimos observar reacción visible con el anticuerpo anti-VLGR, y con el anti PCDH15 (Protocadherina 15) la reacción fue muy débil (Figura 9C).

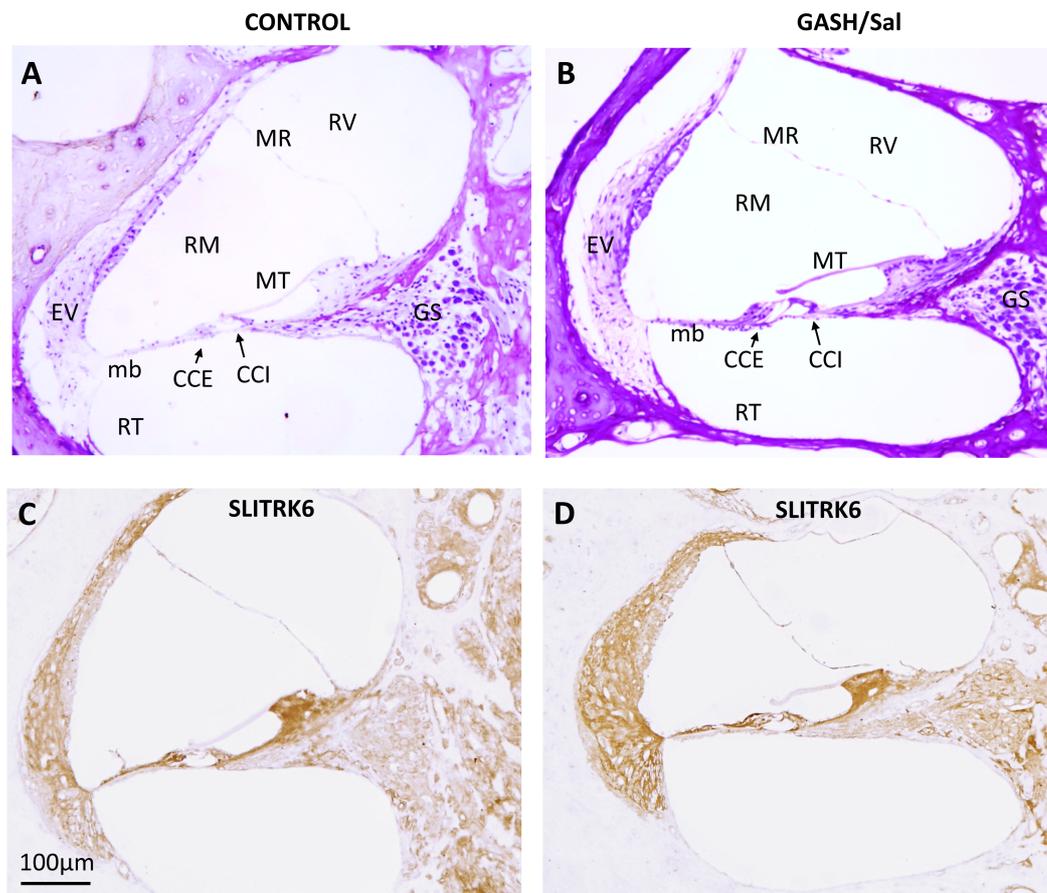


Figura 8. Secciones de cóclea incluidas en parafina seriadas. **A** y **B**: Espira media coclear teñida con Nissl de hámster control (**A**) y de hámster GASH/Sal (**B**). **C** y **D**: Espira media coclear inmunoteñida para visualizar la proteína SLITRK6 de hámster control (**C**) y GASH/Sal (**D**).

La inmunotinción es mayor en todos los casos en los controles (Figura 8), observándose cómo en el GASH queda reducida a las células de soporte, siendo apenas visible en las células ciliadas, tanto internas como externas. La figura 9 muestra un detalle a gran aumento de la inmunotinción para CDH 23 en la que se aprecia el patrón general observado en todas las pruebas.

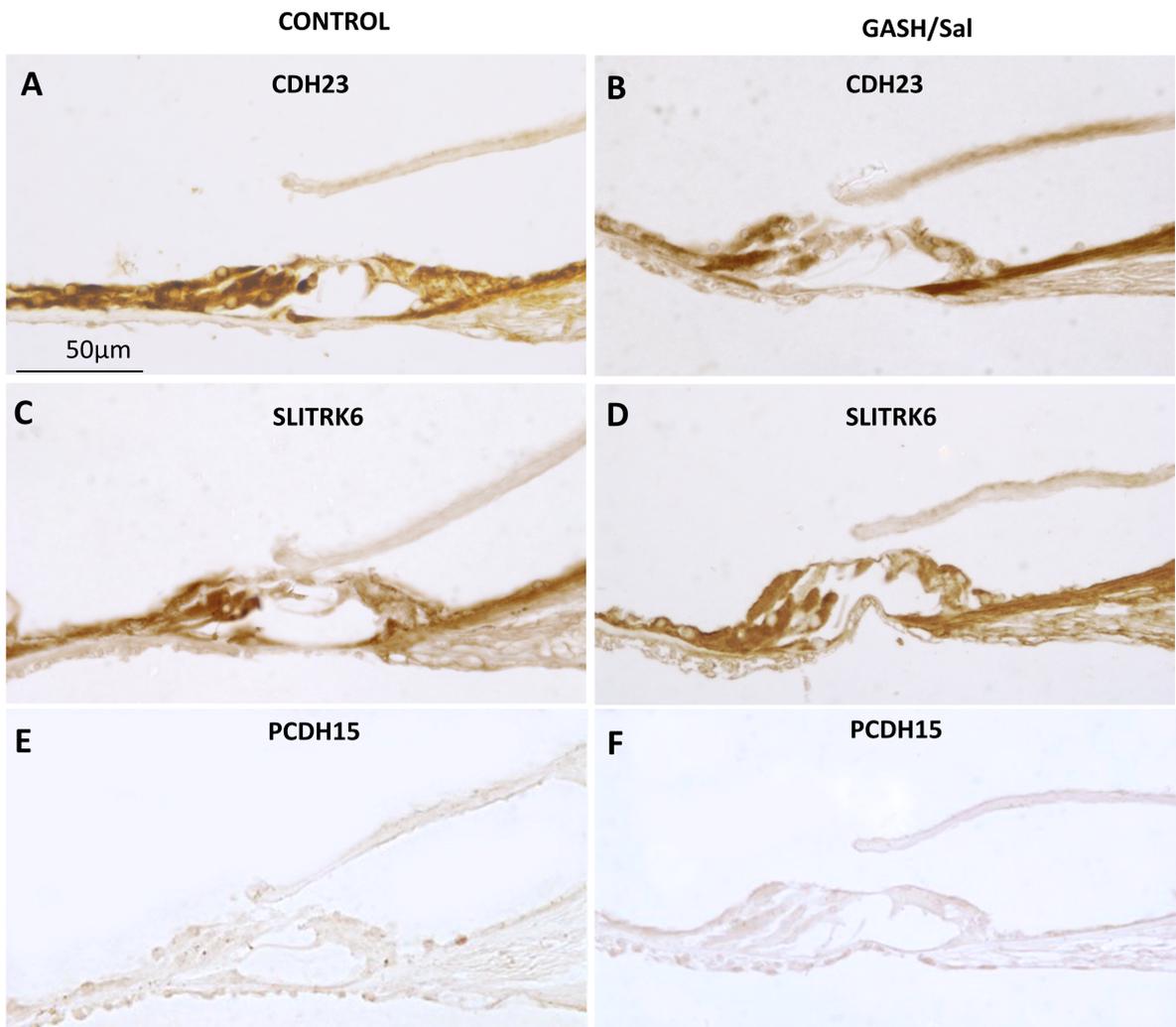


Figura 9. Secciones de cóclea incluidas en parafina e inmunoteñidas seriadas. **A** y **B**: Inmunotinción para visualizar la proteína CDH23. **C** y **D**: Inmunotinción para visualizar la proteína SLITRK6. **E** y **F**: Inmunotinción para visualizar la proteína PCDH15.

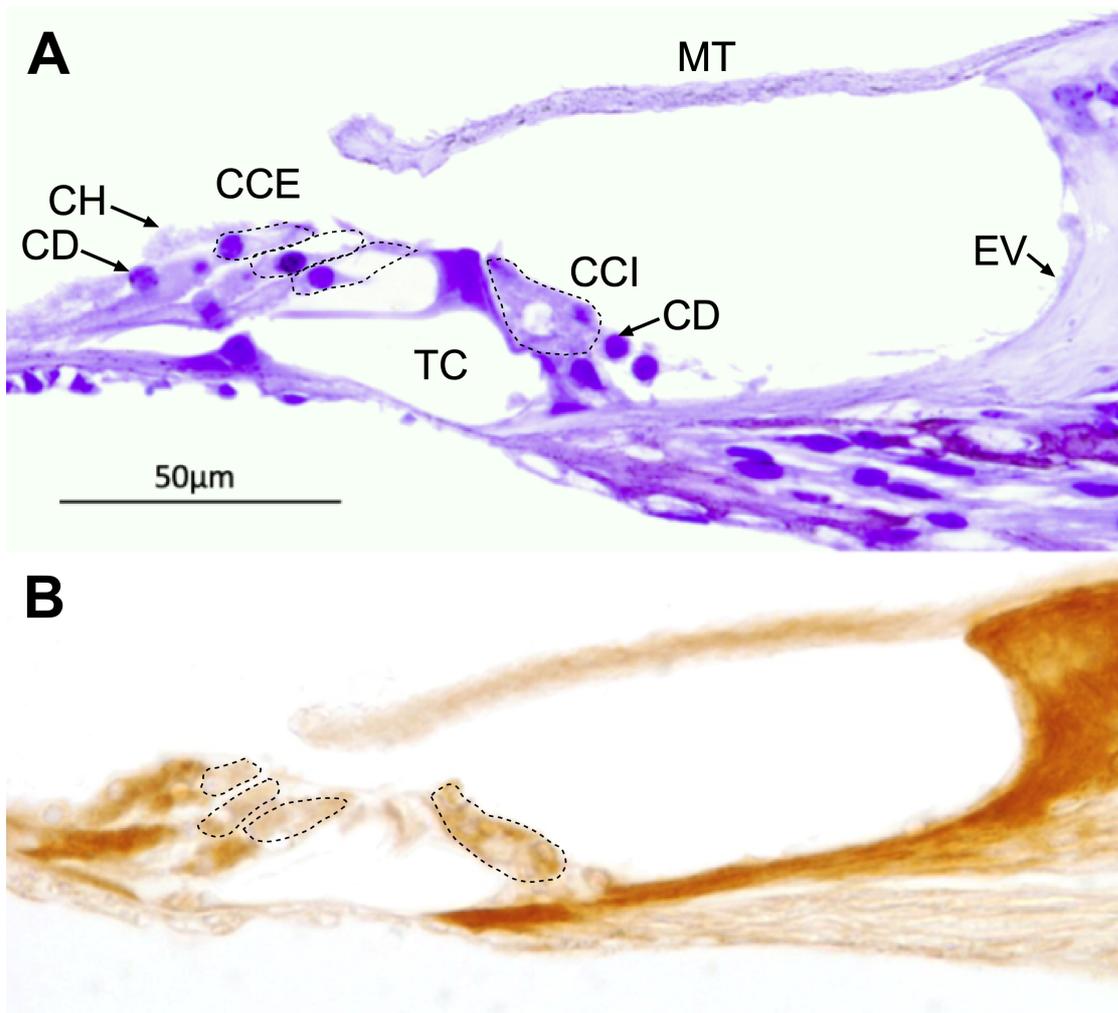


Figura 10. Secciones de cóclea del GASH/Sal incluidas en parafina. Las células cilidadas están silueteadas para su comparación. **A:** Espira media coclear teñida con Nissl. **B:** Espira media coclear inmunoteñida para visualizar la proteína CDH25.

5.1.3. Análisis de las espiras cocleares

Para la determinación de las alteraciones anatómicas existentes, se extrajo una cóclea íntegra para su observación anatómico – topográfica y morfológica. Se analizó el tamaño coclear de las muestras y las dimensiones de las diferentes espiras como se puede ver en la figura 11, obteniendo un diámetro en la espira basal de 2213 μm , en la espira media de 1365 μm y en la espira apical 605 μm .

Asimismo, se determinó la longitud del eje, tomando el modiolo de referencia, en 1728 μm y un diámetro máximo de 1423 μm .

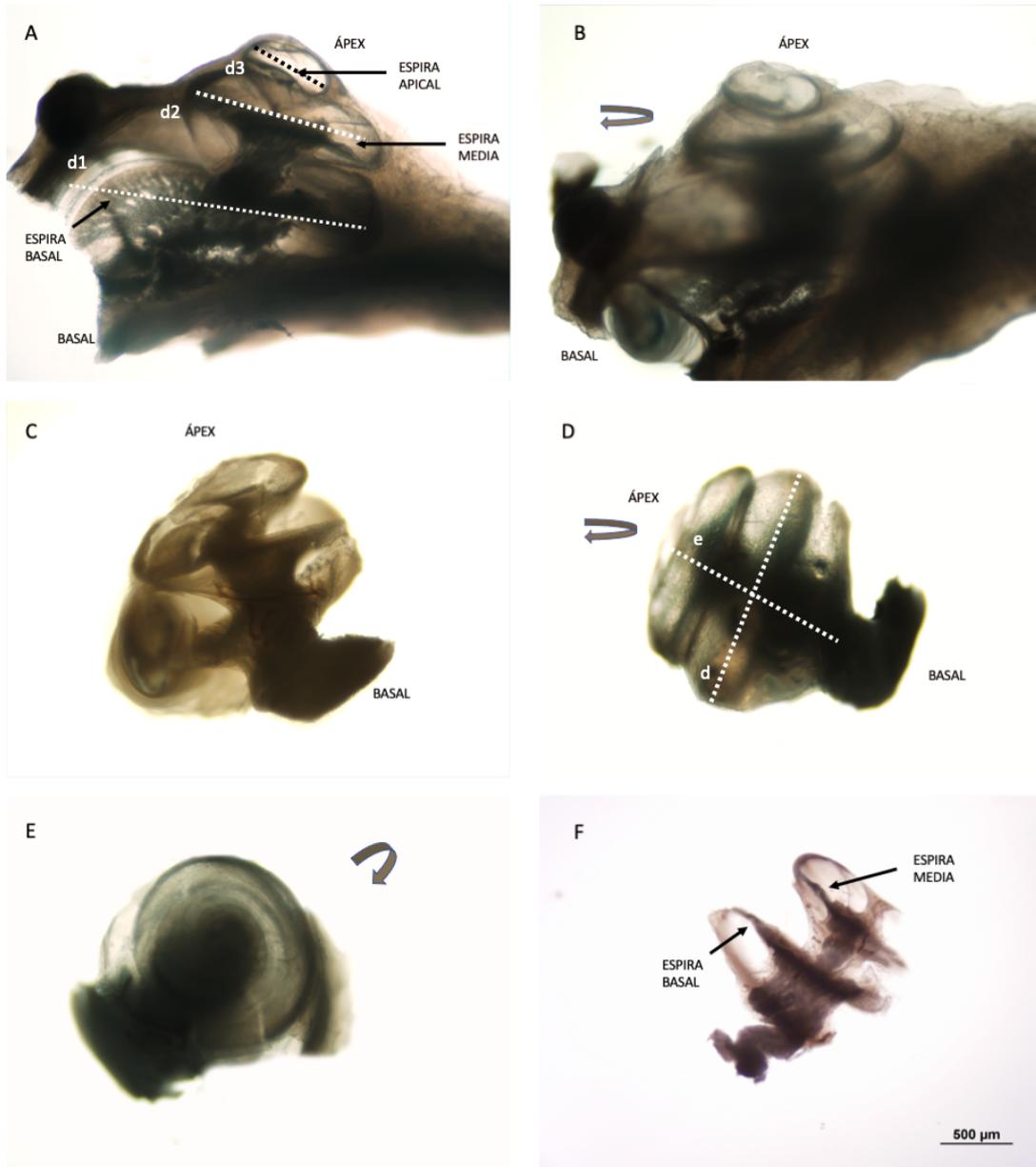


Figura 11. Estructura de la cóclea del GASH/Sal desde diferentes ángulos de visión. **A:** Imagen de microscopía óptica de las diferentes espiras obtenidas tras un corte paramodiolar (d1 = espira basal; d2 = espira media; d3 = espira apical); **B:** Visión obtenida tras rotación de la muestra anterior 180° sobre su eje. **C:** Vista interna de la cóclea sin estructuras óseas; **D:** Rotación de la muestra anterior 180° sobre su eje (e = eje modiolar; d = diámetro coclear máximo); **E:** Visión dorsal desde el ápex; **F:** Espiras basal y media con la estría vascular delimitando la pared lateral.

En la figura 12, se aprecian las espiras obtenidas (según lo descrito en el apartado 4.3.2.5 “Obtención de espiras”) para su posterior tinción. Se puede observar la espira basal con la región más externa donde se ubican las CCE e CCI y una parte interna limítrofe al modiolo correspondiente a las neuronas del ganglio espiral que inervan la cóclea.

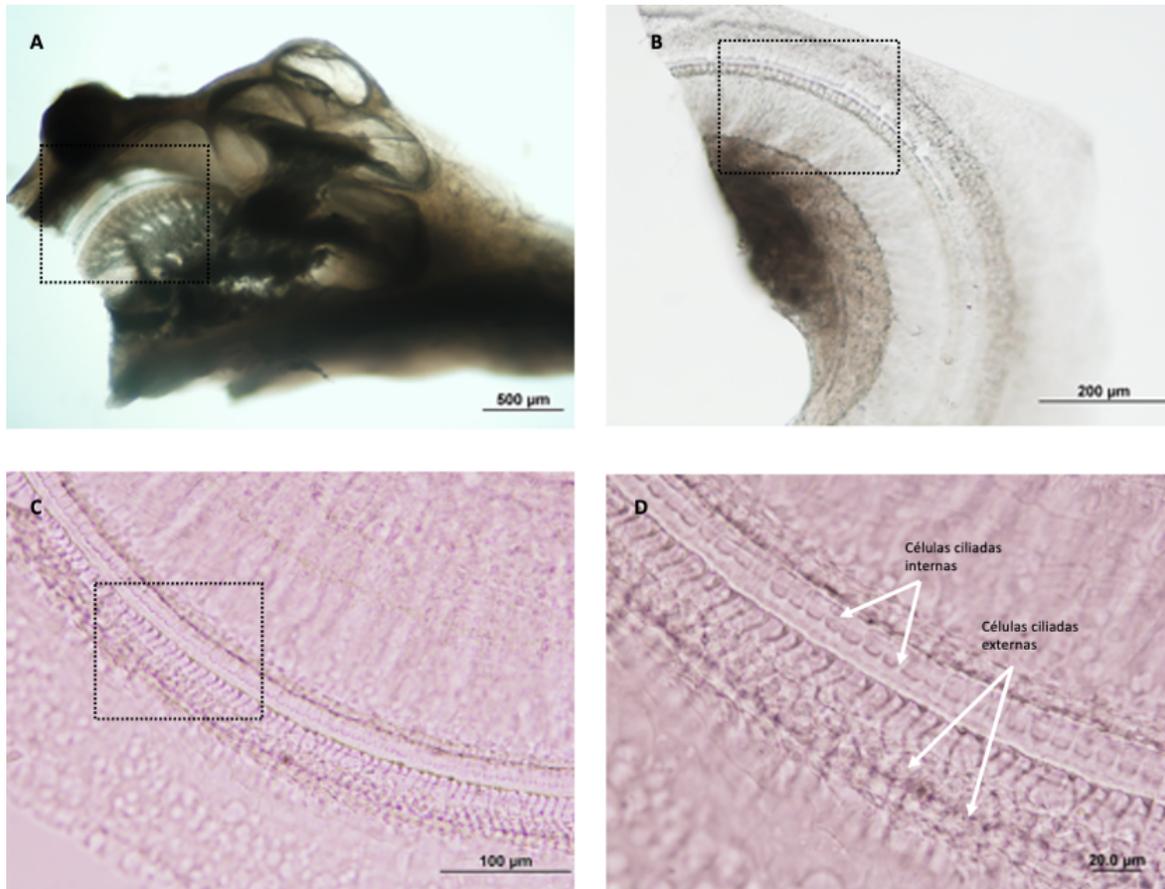


Figura 12. Disección de las cócleas del GASH/Sal. **A:** Fotografía en campo claro de la cóclea y espiras tras un corte paramodiolar; **B:** Microfotografía de la espira basal correspondiente al recuadro en la imagen A; **C** y **D:** Microfotografías a mayor aumento mostrando el detalle del recuadro correspondiente a las imágenes B y C, respectivamente. Obsérvese la disposición de las CCI y las CCE.

Siguiendo los pasos descritos en el apartado correspondiente a la tinción de muestras, éstas fueron analizadas cualitativa y cuantitativamente. Cualitativamente, se observó en las muestras teñidas con DAPI cómo la organización de las CCE era irregular y difería entre las diferentes muestras teñidas en cuanto a la disposición de los núcleos celulares. En la Figura 13A, se pueden apreciar separaciones entre las células, ausencias de determinadas CCE y desorganización en la distribución de las diferentes hileras, lo que puede suponer una anomalía. Con respecto las células de Deiters, teñidas con

faloidina gracias a sus filamentos de actina (Figura 13B), destaca principalmente la ausencia de alguna de dichas células. Cuantitativamente, se seleccionaron las muestras y contabilizaron manualmente las CCI y CCE en tinciones con DAPI, y una contabilización de las células de Deiters en las muestras teñidas con faloidina (Figura 14A y 14B). Además, mediante faloidina, fue posible observar las prolongaciones de las células de Deiters, las cuales se imbrican entre las CCE participando en la disposición espacial de las mismas (Figura 13C). Del mismo modo, con respecto a los estereocilios de las células ciliadas, también formados por actina, se vio que estos presentaban una desorganización en su disposición (Figura 13D).

Tras el análisis de los datos de las diferentes muestras, se obtuvo obteniendo una media de 10,5 CCI/100µm y de 35,3 CCE /100µm con una ratio CCE/CCI de 3,36 (Tabla 5). Con respecto a las células de Deiters, éstas presentaron una proporción de $11,78 \pm 0,98$ células por cada 100 µm de longitud coclear (ver en Tabla 5). De este modo, mediante una prueba ANOVA, se determinó que existían diferencias significativas (p-valor = .000) entre las CCI y el resto de los grupos (Figura 14).

Tipo de célula	N	Mínimo Estadístico	Máximo estadístico	Media	Desviación	Varianza
CCI	31	9,2	11,9	10,5	0,65	0,42
CCE1	53	9,5	15,1	11,9	1,13	1,27
CCE2	31	7,5	14,4	11,7	1,30	1,68
CCE3	31	9,1	14,9	11,7	1,27	1,61
Células de Deiters	9	9,6	12,9	11,8	0,98	0,95

Tabla 5. Estadística descriptiva completa del número de células por cada 100 micras de longitud coclear. Para la cuantificación fueron clasificadas las células en CCI, CCE1, CCE2, CCE3 como se muestra la figura **A**. En el caso de las células de Deiters se clasificaron y cuantificaron como se muestra en la figura **B**. N = número de fotografías analizadas.

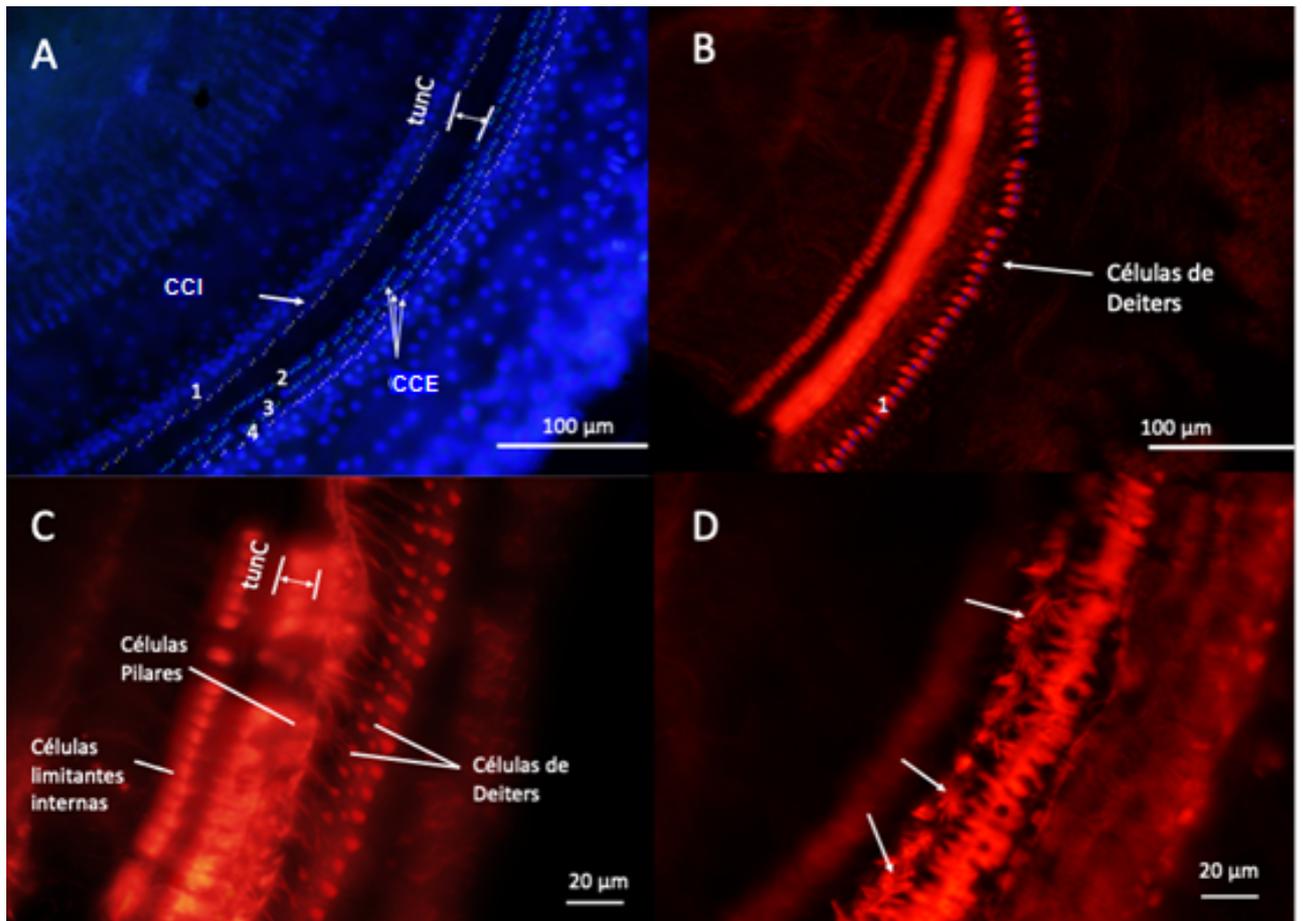


Figura 13. Distribución de las células ciliadas y de soporte en la cóclea del GASH/Sal. **A:** Microfotografía de epifluorescencia teñida con mostrando los núcleos de las CCI y CCE. Obsérvese la hilera de CCI y las tres hileras de CCE, separadas por el túnel de Corti. Nótese que las CCI aparecen marcadas con el número 1; la primera, segunda y tercera fila de CCE se representan con el número 2, 3 y 4, respectivamente. La imagen es representativa de la identificación utilizada durante el análisis cuantitativo del número de células ciliadas por cada 100 μm . **B:** Microfotografía mostrando una sección teñida con faloidina mostrando diferente tipo células de soporte. Con el número 1 aparecen marcadas las células de Deiters contabilizadas en la muestra. **C:** Microfotografía de una sección coclear teñida en faloidina en donde se pueden apreciar las células de Deiters con sus procesos falángicos que se situarían entre las CCE. **D:** Microfotografía en donde se aprecian los estereocilios de las CCI. Obsérvese la marcada desorganización estereociliar en las CCI del GASH/Sal (flechas).

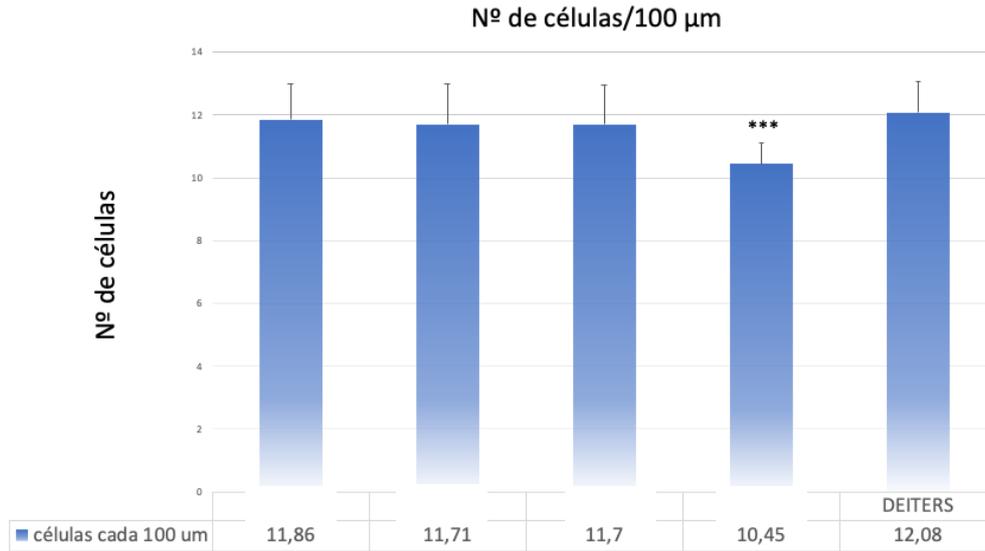


Figura 14. Gráfico de barras de la media del número de células ciliadas internas (CCI), células ciliadas externas (CCE1, CCE2 y CCE3) y de Deiters, contabilizadas en 100 µm de longitud coclear. Las barras representan la media ± SEM. Obsérvese diferencias significativas del número de CCI con respecto a los demás grupos. Análisis estadístico: prueba ANOVA de una vía, con prueba *post hoc* Bonferroni ($p \leq .001^{***}$).

Del mismo modo, se analizaron unas muestras procesadas con anti-parvalbúmina, donde aparecían las CCI teñidas. Obtuvimos un número medio de 9,82 CCI/µm, concordando con los resultados obtenidos en la contabilización con DAPI (Figura 15). Añadido a esto, se obtuvo una inmunopositividad parcial para parvalbúmina, viéndose cómo algunas de las CCI no presentaban inmunotinción.

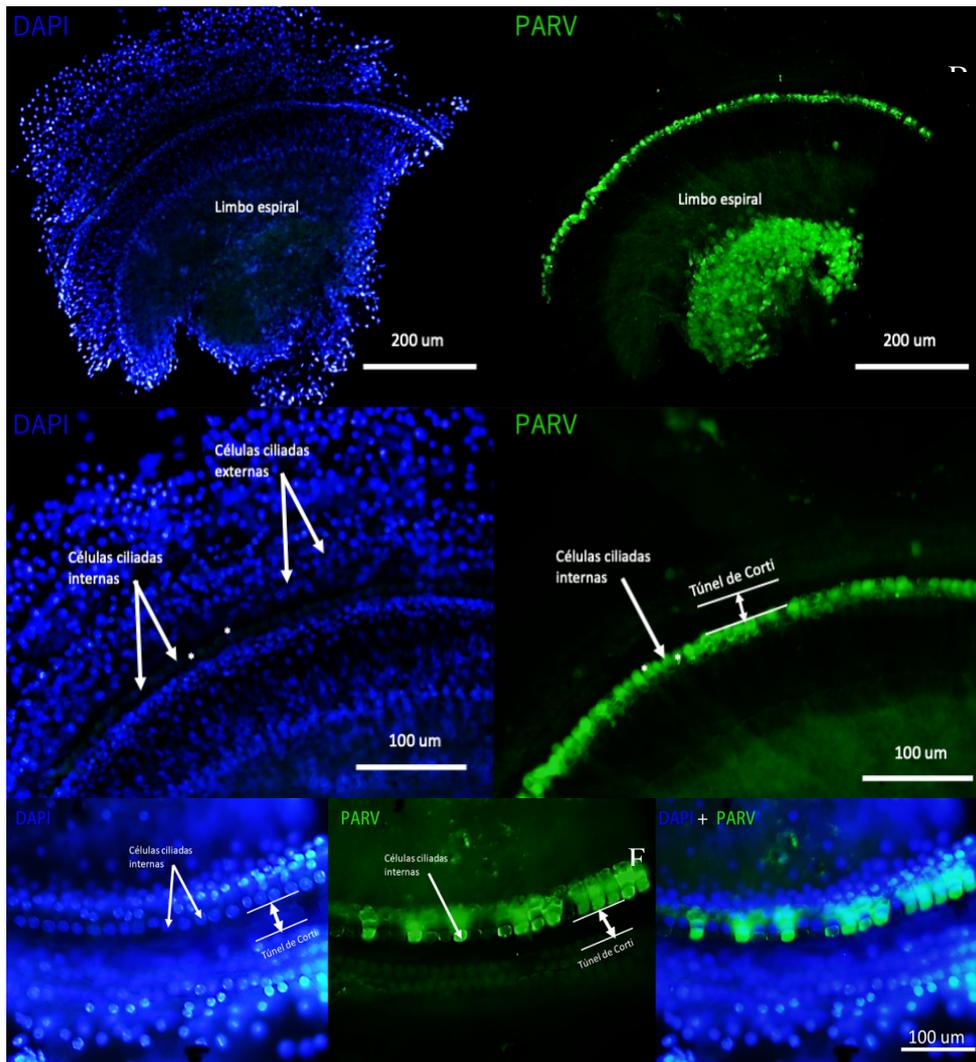


Figura 15. Distribución de las CCI inmunopositivas para Parvalbúmina. **A** y **C**: Microfografías de epifluorescencia teñidas con DAPI donde se aprecian los núcleos de las células cocleares. **B** y **D**: Microfografías de las mismas secciones mostradas en 12A y 12C, respectivamente. Obsérvese la hilera de CCI (flechas) y las neuronas del ganglio espiral (asterisco) inmunopositivas para Parvalbúmina (en verde). **E** y **F**: Microfotografías a mayor aumento de una sección teñida con DAPI y anti-parvalbúmina, respectivamente. **G**: Fotocomposición de las imágenes E y F mostrando la ausencia de inmunopositividad en determinadas CCI.

Por lo que respecta al análisis de la expresión de las proteínas de interés en la mecanotransducción, se estudiaron mediante tinciones que permitiesen la detección en donde éstas se expresaban.

En la figura 16, se aprecia cómo la proteína VLGR1, visualizada mediante la tinción correspondiente, se expresa entre las CCE. Igualmente, entre las CCE, se observan terminales nerviosos immunoteñidos frente a sinaptofisina (SYP)

que presumiblemente proceden del sistema olivococlear medial que inervan las CCE.

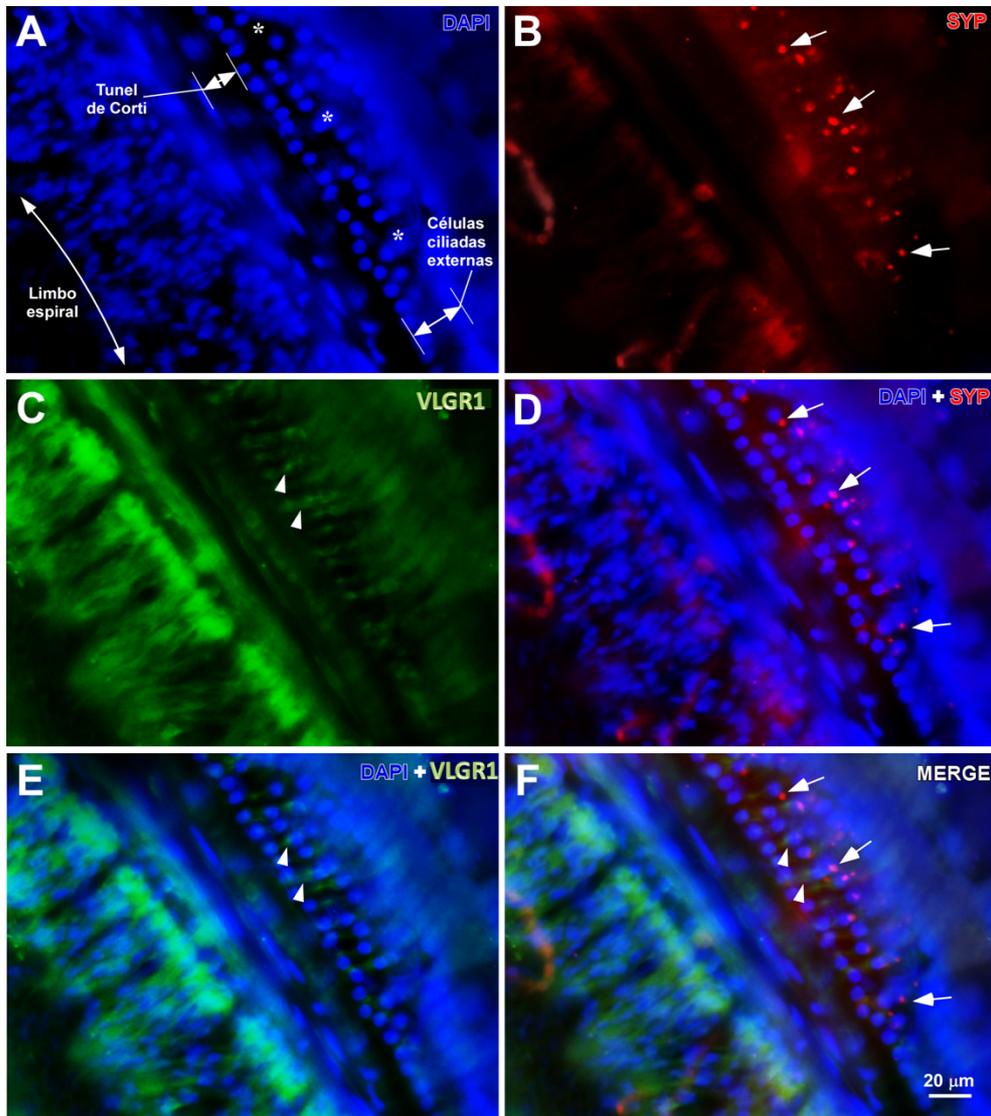


Figura 16. Inmunorreactividad para sinaptofisina y proteína VLGR1 en la cóclea del GASH/Sal. **A:** Microfotografía de epifluorescencia mostrando los núcleos de las CCE con DAPI. Obsérvese la desorganización de las hileras de dichas células (asterisco); **B:** Microfotografía de la misma sección de A mostrando inmunofluorescencia para sinaptofisina. Las flechas indican los terminales presinápticos procedentes del haz olivococlear medial. **C:** Inmunotinción contra la proteína VLGR1 para su visualización; **D:** Fotocomposición de A y B, donde se muestra la ubicación de los terminales inmunomarcados con sinaptofisina en la región de las CCE. **E:** Fotocomposición de A y C donde se observa la proteína VLGR1 en la región de las CCE (flechas). **F:** Fotocomposición de A, B y C.

Por otra parte, otra proteína de interés que se ha observado su expresión es la CDH23. En la Figura 17 nuevamente se ven los núcleos teñidos con DAPI y, entre estos, zonas débilmente inmunoteñidas frente a CDH23 en una región

compatible con la ubicación de las uniones apicales de los estereocilios (Figura 17, B y C).

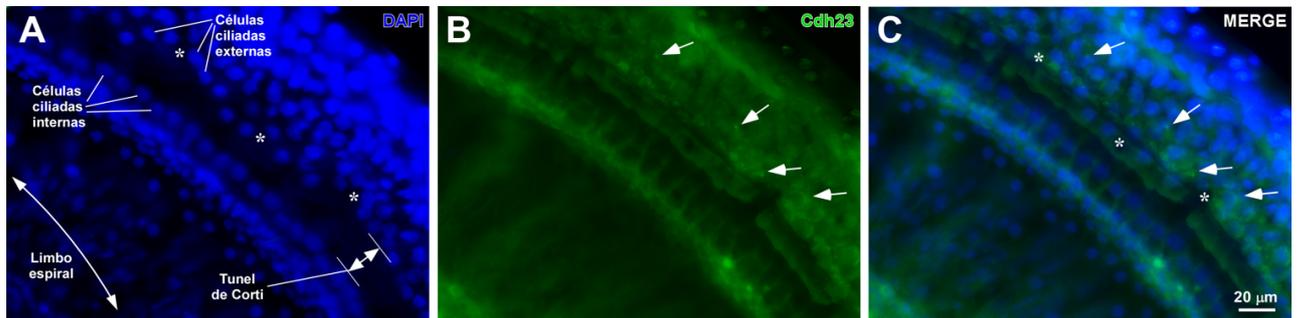


Figura 17. Inmunorreactividad para CDH23 en la cóclea del GASH/Sal. **A:** Se observan los núcleos de las células cocleares teñidos con DAPI; **B:** Inmunotinción contra cadherina (punta de flecha) en la misma sección observada en A; **C:** fotocomposición de A y B muestra la ubicación de la proteína en la región de las CCE. Obsérvese la débil inmunorreactividad para CDH23 en dicha región.

5.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Conociendo los cambios en la regulación se decidió estudiar las células ciliadas del GASH/Sal con el microscopio electrónico de barrido (MEB).

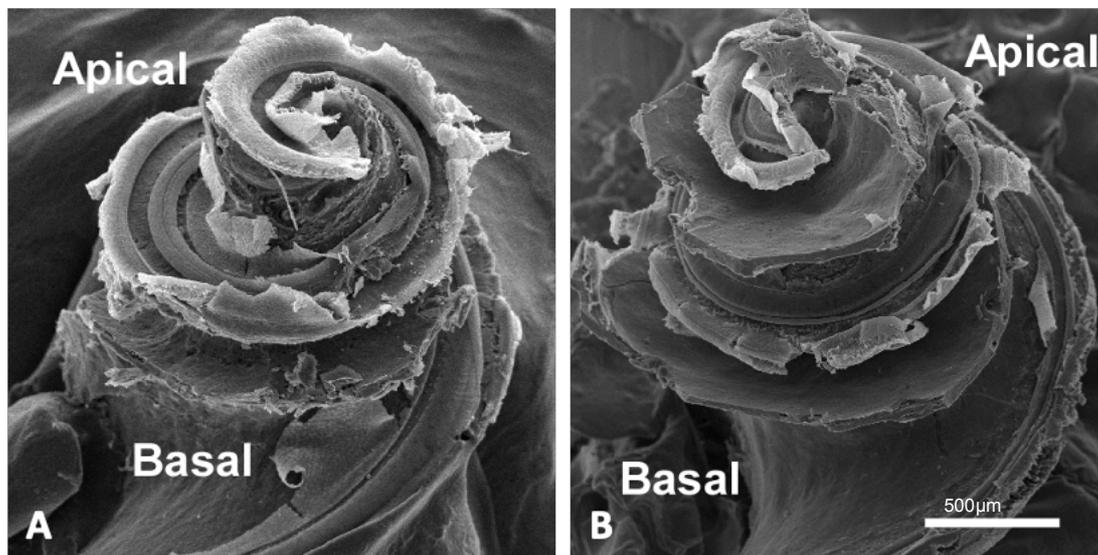


Figura 18: Panorámica de las cócleas de hámster procesadas para su visualización al microscopio electrónico de barrido. **A:** control; **B:** GASH/Sal. Barra de calibración: 500µm.

Se observó tanto el órgano espiral (Corti) de los controles como el de los GASH/Sal, con el fin de evaluar las variaciones existentes en la disposición y distribución de las células ciliadas. El resultado de este estudio mostró en la superficie del órgano una ordenación de las estructuras semejante a las

existentes en los animales normales, con las filas de células ciliadas externas (CCE) en la superficie de la lámina reticular y la fila de células ciliadas internas (CCI), separadas ambas ciliadas por la extremidad de las células de los pilares (Figura 19).

Sin embargo, mientras que en los hámsteres controles (Figura 19A) los elementos del órgano se mostraban en la habitual y ordenada organización de estructuras cocleares, en los hámsteres GASH/Sal (Figura 19B) esta disposición desaparecía.

En los controles las células ciliadas externas (CCE) e internas (CCI), mostraban una típica morfología con sus penachos de estereocilios con su habitual ordenamiento en sus filas, con la estricta figura en uve de cada uno de los penachos de las CCE, y con los estereocilios agrupados de las CCI mostrando su normal homogeneidad, y su porte erguido en su recto o ligeramente curvado trayecto (Figura 19A).

En los GASH/Sal se mostraba en ambas células ciliadas internas y externas una grave alteración de la disposición en los estereocilios con pérdida de sus mecanismos de unión. Asimismo, en las células ciliadas externas, en vez de la distribución lineal, presentaban una apariencia quebrada, con los penachos agrupados en densidades diferentes sin la característica forma en uve, con estereocilios acortados sin orden y ocasionalmente desplomados sobre la superficie apical de las CCI (Figura 19B).

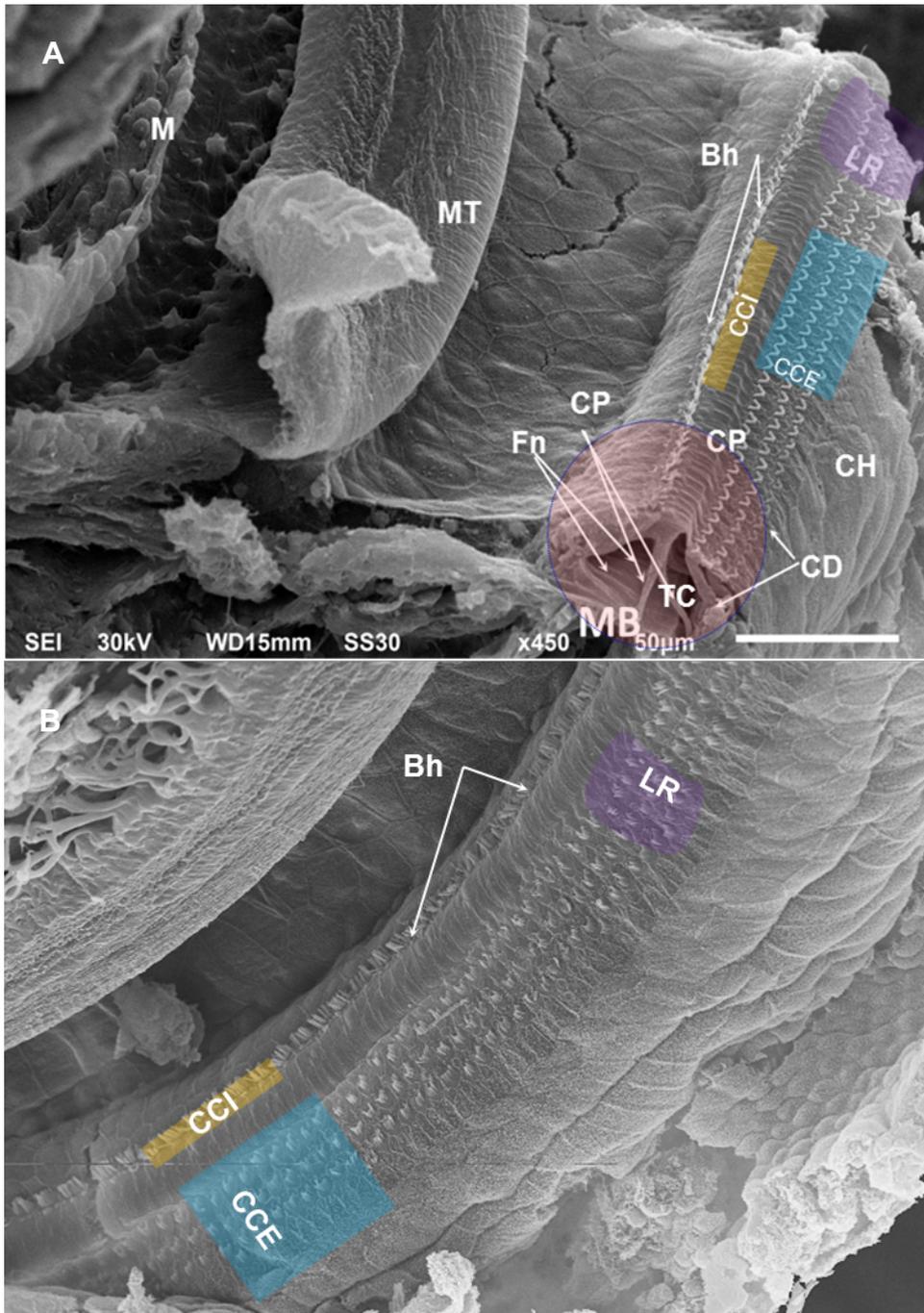


Figura 19: Fractura sagital de la cóclea de hámster, mostrando el órgano de Corti en la espira basal de la cóclea visto con microscopía electrónica de barrido en controles (A) y en GASH/sal en (B). Abreviaturas: Lr: lámina reticular; e: estereocilios; cce: células ciliadas externas; cci: células ciliadas internas; Te: el túnel espiral; CD: células de Deiters; CP: células de los pilares; MB: la membrana basilar; Mt; la lámina tectoria, fn; las fibras nerviosas, bh; la banda; ch: las células de Hensen y M: la columela o modiolo. Barra de calibración: 50µm.

En los GASH/Sal (Figura 19B), aunque la disposición es semejante a los controles, todos los elementos de la porción basal, como células ciliadas internas (CCE) y externas (CCI) muestran una grave alteración en la disposición en los estereocilios con la aparición de espacios separando los

estereocilios (figura 19B,C y D), que proporciona en las células ciliadas externas la desaparición de la forma de uve, y en las CCI estereocilios acortados sin orden, y ocasionalmente desplomados sobre la superficie apical de las CCI.

A mayores aumentos (figura 20), se observa la elevación de los estereocilios desde las CCE y las CCI. En las fotografías (figura 20A) pertenecientes a un hámster control se muestra la disposición de la trayectoria recta de los penachos ciliares. En el caso de las CCE, estos penachos están dispuestos en grupos de tres filas de diferente altura en cada una de ellas, siendo los más largos los situados en la parte lateral y los más cortos en la fila medial; disminución que se efectúa en un gradiente regular.

En los GASH/Sal (figura 20; B, C y D), la línea de los penachos está totalmente alterada y en una disposición quebrada en cada una de las hileras de las CCE. En estas filas los penachos están formados por estereocilios ocasionalmente separados, más delgados y con diferentes inclinaciones sobre la superficie apical de las células, haciendo visible su irregular conformación debido a la pérdida de sus mecanismos de unión (o anclaje).

La diferencia entre la longitud de los estereocilios de las CCE y las CCI es bastante más notable que entre los controles, diferencia también existente entre el número de estereocilios entre estas.

Con el MEB a mayores aumentos, se observa la propagación de los estereocilios desde las CCE y las CCI.

En la figura 20A, perteneciente a un hámster control; se muestra la disposición de la trayectoria recta (o muy ligeramente curvada) de los penachos ciliares. Estos penachos están dispuestos en grupos de tres filas de diferente altura en cada una de ellas, siendo los más largos los situados en la parte lateral y los más cortos en la fila medial mientras que en los GASH/sal, la línea de los penachos está totalmente alterada y en disposición quebrada en cada una de las hileras estando los penachos formados por estereocilios separados, más delgados y con diferentes inclinaciones sobre la superficie apical de las células debido a la pérdida de sus mecanismos de unión (o anclaje).

La diferencia entre la longitud de los estereocilios de las CCE y las CCI es bastante más notable en GASH/Sal que entre los controles. Se diferencian también el número de estereocilios entre las diferentes imágenes y en algunos casos, se observa que en GASH/Sal, los conjuntos de estereocilios en las zonas apicales están ausentes.

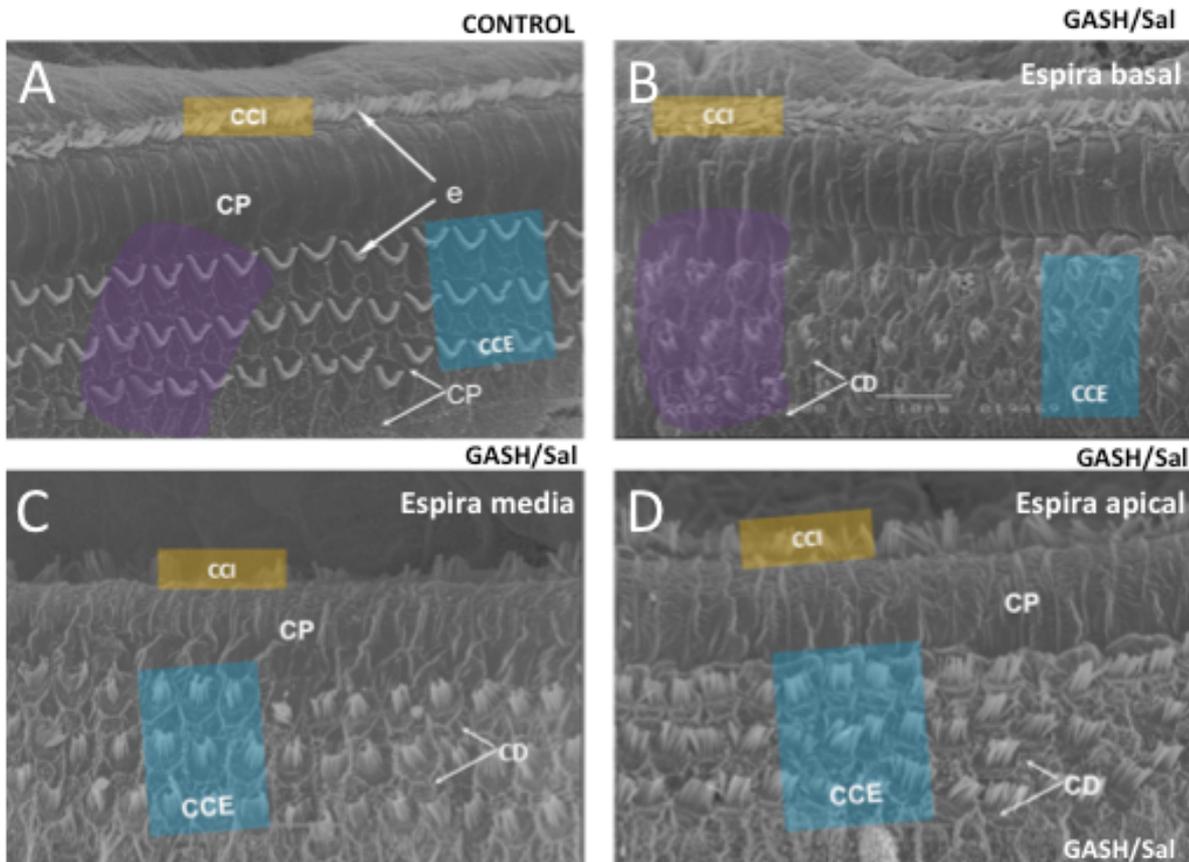


Figura 20. Fractura sagital de la cóclea de hámster en controles y en GASH/sal a mayores aumentos que en la figura 19. **A:** control; **B, C y D:** GASH/Sal. Abreviaturas: CCI: células ciliadas internas; CCE: células ciliadas externas; CP: células pilares; CD: células de Deiters; e: estereocilios. Barra de calibración: 10 μ m

La lámina reticular a mayores aumentos (Figura 21), nos proporciona una visión de la superficie apical de las tres filas del borde apical de las células ciliadas externas (CCE) entre las de las células falángicas de Deiters (CD), con una superficie muy lisa; presentando sólo algunas pequeñas elevaciones correspondiente a microvellosidades aisladas (cabezas de flechas). Estas son un poco más frecuentes en las superficies celulares que rodean a las de la 2ª y 3ª fila, y fundamentalmente; en los límites celulares.

En los animales control (Figura 21A) se observan los penachos estereociares con la formación de las habituales imágenes en uve de gran uniformidad o largo de toda la hilera. Más allá de las células de los pilares, está el conjunto que forman la hilera de la superficie apical de las CCI con sus penachos, formados por estereocilios de dirección vertical o suavemente curvados (flechas).

En los GASH/Sal (Figura 21B) se ha desorganizado la formación regular de la hilera de penachos de las CCE, donde se ha borrado la figura en uve, a la par que se muestra la diferente longitud de los estereocilios (cabezas de flechas). Es notable en estos animales la falta de adherencia en algunos puntos que permiten inclinaciones de algunos estereocilios, con diferente angulación; que en algunos casos, llegan a desmoronarse sobre la superficie apical de las células (asterisco). En ocasiones, dentro de la misma fila se muestran estereocilios muy acortados.

En la fila de estereocilios internos, los penachos de las CCI tienen una morfología muy alterada; con la línea de los estereocilios sin formar regulares penachos y con algunos de ellos muy acortados (cabezas de flechas). Tampoco presentan los medios de unión habituales, apareciendo desparramados con numerosas dehiscencias entre ellos (asteriscos) con diferentes inclinaciones y desapareciendo en algunos puntos.

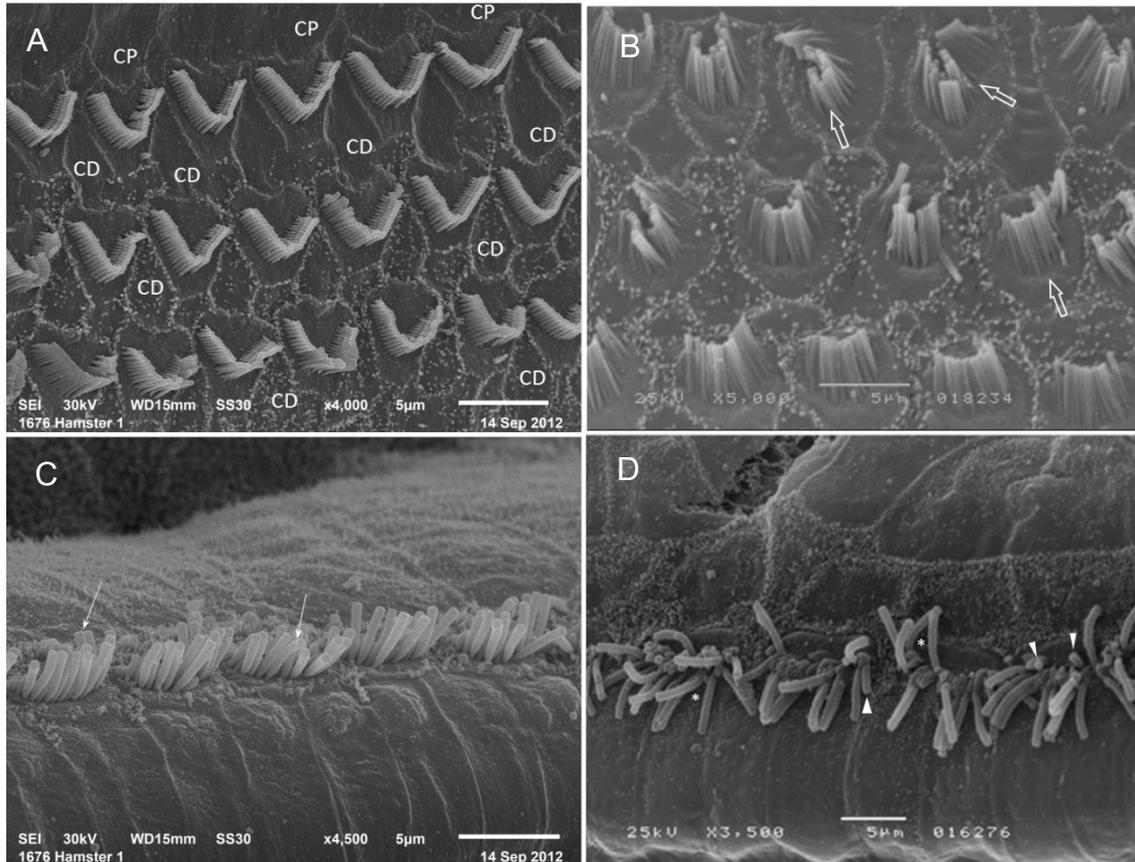


Figura 21. Visión de la superficie apical a mayores aumentos de las tres filas del borde apical de las células ciliadas externas entre las de las células falángicas de Deiters (CD) en Controles (A) y GASH/Sal (B), y de la fila del borde apical de las células ciliadas internas en Controles (C) y D). Abreviaturas: CP: células pilares; CD: células de Deiters. Barra de calibración: 5µm

A mayor aumento, (Figura 22) se pueden estudiar las superficies celulares apicales individualmente de las células ciliadas. En los animales controles, los estereocilios de la superficie apical de las células ciliadas internas presentan (Figura 22A) una clara tendencia a la verticalidad, con un agrupamiento homogéneo y en general muy semejantes en altura, mientras que en el GASH/Sal (Figuras 22 B), los estereocilios aparecen con diferente inclinación, altura y grosor, notándose separaciones e inclinaciones que trazan, en vez de la dirección vertical, trayectos casi horizontales.

En las células ciliadas externas de los hámsteres control (Figura 22C) demuestran la regular distribución de los penachos en tres filas de estereocilios, ordenados en diferente altura en cada una de las filas, mientras que en los hámsteres GASH/Sal (figuras 22D) los elementos del penacho son más delgados con curvaturas en su trayecto, con separaciones e inclinaciones

debidas a la pérdida clara de sus medios de anclaje. A estos aumentos, se observa claramente la destrucción de los estereocilios.

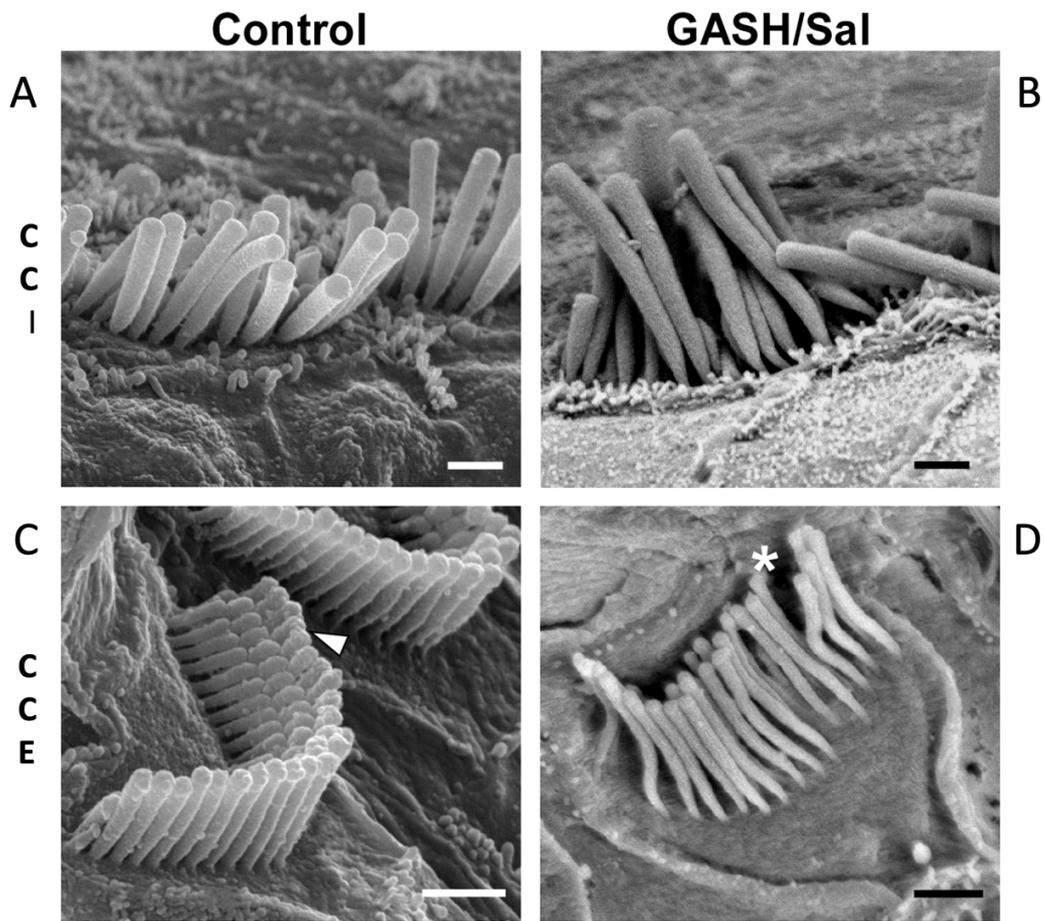


Figura 22. Detalle de los estereocilios en las células ciliadas internas y externas del órgano de Corti. **A y C;** controles; **B y D:** GASH/Sal (Se aprecia la desorganización, tamaño irregular y diferente grosor de los estereocilios del GASH/Sal en comparación con el hámster control. Abreviaturas: CCE: células ciliadas externas; CCI: células ciliadas internas. Barra de calibración: 1 μ m)

El análisis morfológico de la superficie de las células de soporte también muestra una alteración importante, pues el órgano de Corti de los controles aparece con todos los elementos ordenados, con la estructura en mosaico de las células de Deiters y de los pilares, donde la superficie apical de ambas células, ciliadas y de Deiters se presenta lisa con algunas, muy escasas, microvellosidades (Figura 23 A y B)

En el GASH/Sal, los pilares están deformados, desapareciendo su habitual lisura transformada en una superficie irregularmente surcada por crestas y valles (Figura 23C y 23D), donde las células de Deiters aparentan estar

apiladas unas sobre otras. Otra variación son las protrusiones nacidas en estas células de Deiters junto con la abundancia en microvellosidades, no existentes en los controles, que en las zonas donde se pueden observar la totalidad de las células, se muestran anormales angulaciones en las prolongaciones falángicas (Figura 23D).

En la figura 23 A se muestra el túnel espira (o de Corti), en una sección sagital del órgano de Corti, con la superficie apical y el cuerpo de las células de los pilares interna y externa. Obsérvese la lámina reticular formada por las extremidades de las prolongaciones falángicas (f) de las células de Deiters junto con las de los pilares sosteniendo a las células ciliadas externas (CCE).

En la figura 23B, se observa una fila de células ciliadas externas perfectamente alineada formando las uves con sus tres filas de sus estereocilios, homogéneamente decreciente hacia medial entre las extremidades falángicas (f). La superficie apical de ambas células, ciliadas y de Deiters se presenta lisa con algunas, muy escasas, microvellosidades (cabeza de flecha).

En los GASH/Sal (figura 23C y 23D) se observa la lámina reticular con la superficie apical formando un conjunto extremadamente desorganizado de la superficie de las CCE, desapareciendo la típica formación lineal de los penachos estereociliares, donde en los grupos de cada célula desaparece la figura en uve, y mostrándose las tres filas sin el paralelismo ni la diferencia en longitud, con la visión de espacios que muestran la separación entre los componentes del penacho e inclinaciones variables en los estereocilios, a lo que se suma una variación en la densidad de estas estructuras. Las microvellosidades son además mucho más abundantes en la superficie apical de las extremidades falángicas (Figura 23C).

En cuando a las células de Deiters de los GASH/Sal (figuras 23C y 23D), se comprueba la presencia de angulaciones en sus prolongaciones falángicas. También se aprecian convexidades apicales en estas células, que sobresalen como una protrusión convexa en el conjunto epitelial. Estas elevaciones están revestidas por una capa de microvellosidades.

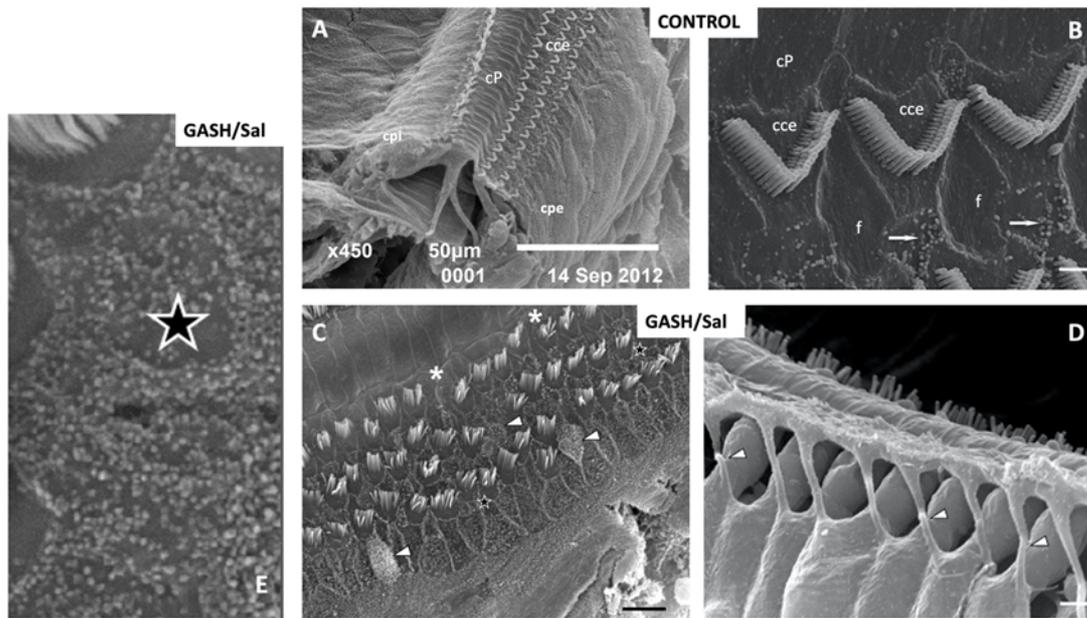


Figura 23: Imagen del túnel espira (Corti) en una sección sagital del órgano de Corti de un control (A); fila de células ciliadas externas perfectamente alineada formando las uves con sus tres filas homogéneamente decreciente medialmente entre las extremidades falángicas de un control (B); la lámina reticular con la superficie apical de las células de los pilares el conjunto externamente desorganizado de la superficie de las células ciliadas externas de GASH/Sal (C); prolongaciones falángicas de la células de Deiters de GASH/Sal, con angulaciones en su trayecto (cabezas de flechas) (D). E: Ampliación del asterisco negro de la figura C. Se observan microvellosidades que no aparecen en el control. Abreviaturas: CPi: células de los pilares internos; CPe: células de los pilares internos externas; F: prolongaciones falángicas de las células de Deiters; CP: células pilares pilares; cce: células ciliadas externas.

En la morfología de los animales GASH/Sal, hay que incluir unas variaciones morfológicas de la banda de células ciliadas internas, además de la distorsión existente en los estereocilios de sus penachos, como es la aparición en las áreas adyacentes a los penachos de protrusiones, en general esféricas, de aspecto secretor en la superficie apical, formando agrupaciones en la frontera con la superficie apical de las células de los pilares (Figura 24). Estas protrusiones parecen invadir también el territorio contiguo de estas células de los pilares.

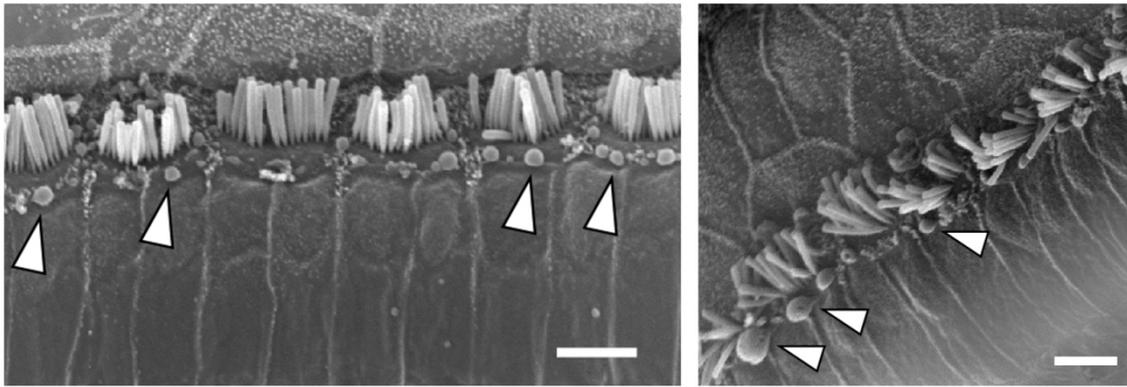


Figura 24. Imagen de las células ciliadas internas de GASH/Sal (CCI) con inclinaciones, falta del normal agrupamiento y con la aparición en estas células de frecuentes protrusiones (cabezas de flechas) en las superficies.

5.3. Estudio de la expresión génica en el órgano de Corti

Evaluamos los niveles de transcripciones de diferentes genes involucrados en la estructura y transmisión de información sonora en la cóclea. Todas las determinaciones las hicimos en estado basal, libres de estimulación acústica y de ocurrencia de convulsiones, lo que nos permite verificar los antecedentes de regulación de estos genes en la estructura coclear

Genes relacionados con canales iónicos: *Kcnq1*, *Kcnq4* y *Cacna1d*.

En el estudio de los genes relacionados con los canales iónicos, *Kcnq1* mostró una regulación negativa en GASH/Sal en comparación con el grupo de control (Figura 25A), mientras que el gen *Kcnq4* presentó una regulación positiva en los animales con propensión a las crisis con respecto al grupo control (Figura 25A). El gen *Cacna1d*, sin embargo; no mostró diferencias transcripcionales

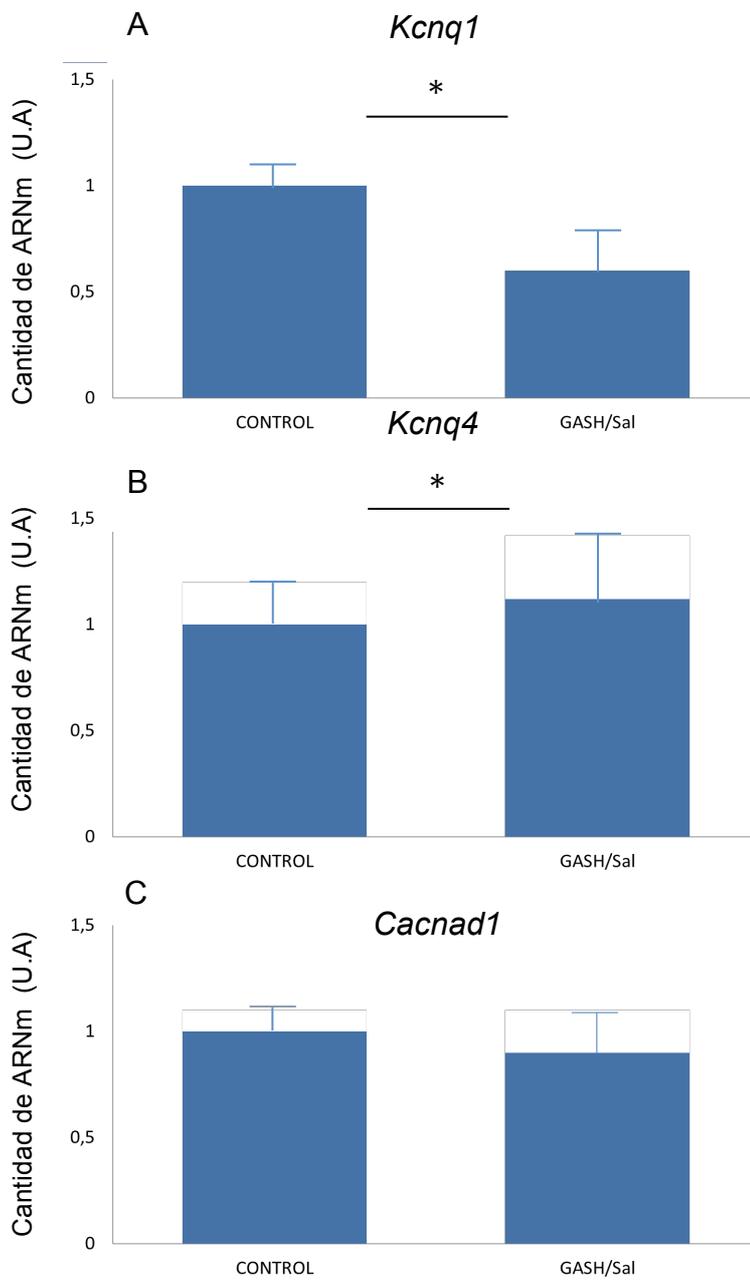


Figura 25. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea. **A:** *Kcnq1* ($t = 4,426$; $p = 0,0002$); **B:** *Kcnq4* ($t = 2,303$; $p = 0,0342$) **C:** *Cacna1d* ($t = 1.152$; $p = 0.2619$). Eje X: Cantidades relativas de ARNm en unidades arbitrarias. Eje Y: Grupos experimentales: hámsters sirios (Control) y hámsters propensos a convulsiones (GASH/Sal). Las barras representan la media \pm SEM. Análisis estadístico: prueba T de Student, * $p \leq 0,05$.

Genes relacionados con la estría vascular: *Pou4f3* y *Gjb2*.

Los dos genes estudiados que se expresan en la estría vascular, *Pou4f3* y *Gjb2*; mostraron una regulación negativa en GASH/Sal en comparación con el grupo de control (Figura 26A-26B).

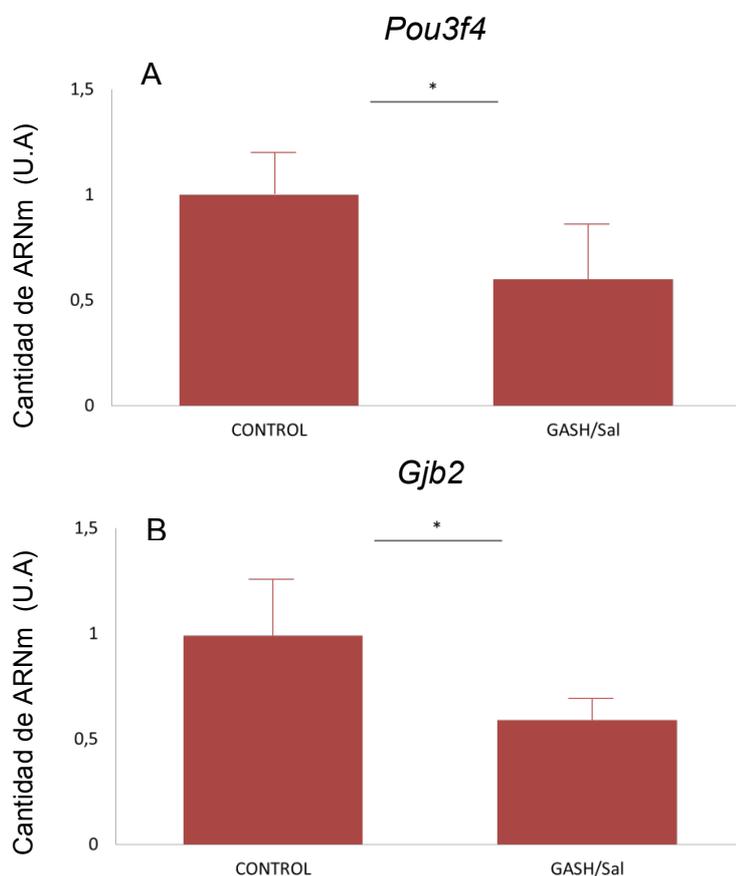


Figura 26. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea. **A:** *Pou4f3* ($t = 2.912$; $p = 0,0083$); **B:** *Gjb2* ($t = 5.315$; $p < 0,0001$) Eje X: Cantidades relativas de ARNm en unidades arbitrarias. Eje Y: Grupos experimentales: hámsters sirios (Control) y hámsters propensos a convulsiones (GASH/Sal). Las barras representan la media \pm SEM. Análisis estadístico: prueba T de Student, $*p \leq 0,05$.

Genes relacionados con la membrana tectoria: *Otoa* y *Tecta*.

Los dos genes estudiados cuya expresión se asocia con la membrana tectoria, *Otoa* y *Tecta*; estaban infraexpresados en el modelo GASH/Sal en relación con el grupo control (Figura 27, A-B).

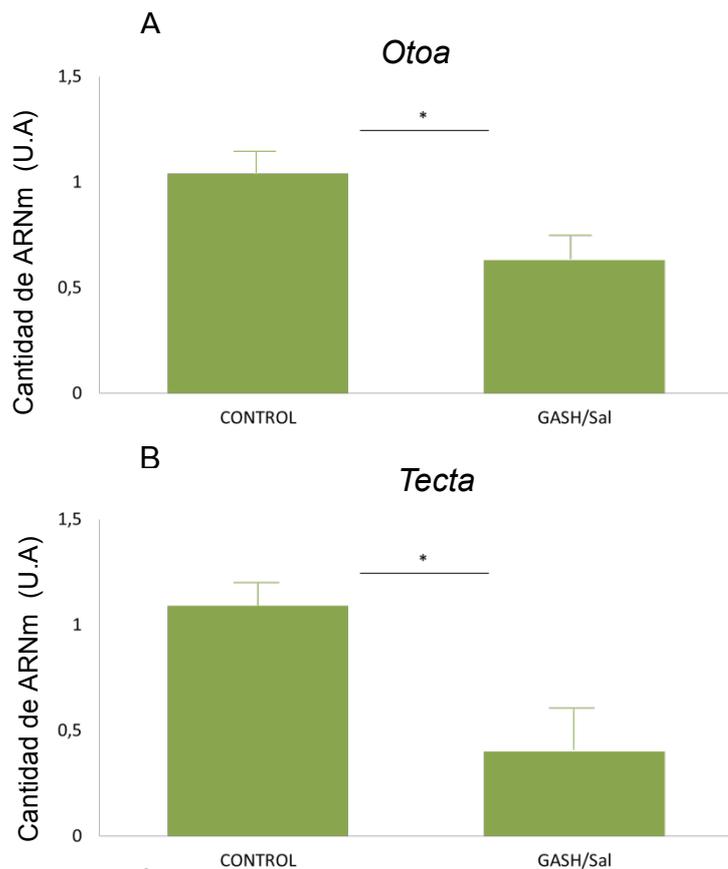


Figura 27. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea. **A:** *Otoa* ($t = 4,360$; $p = 0,0004$). **B:** *Tecta* ($t = 8,221$; $p < 0,0001$) Eje X: Cantidades relativas de ARNm en unidades arbitrarias. Eje Y: Grupos experimentales: hámsters sirios (Control) y hámsters propensos a convulsiones (GASH/Sal). Las barras representan la media \pm SEM. Análisis estadístico: prueba T de Student, $*p \leq 0,05$.

Genes relacionados con los estereocilios y con el canal de mecanotransducción: *Cdh23*, *Pcdh15*; *Vlgr1*, *Whrn*; *Myo7a*, *Tmc2* y *Ptprq*.

De los genes relacionados con los estereocilios, sólo el gen *Ptprq* presentaba una mayor expresión en el GASH/Sal con respecto a los controles, mientras que los genes *Cdh23*, *Pcdh15* y *Tmc2* mostraron una regulación negativa en GASH/Sal en comparación con el grupo de control (Figuras 24A-B; 25F-G). Los genes *Vlgr1*, *Whrn*, *Myo7a* no mostraron diferencias transcripcionales entre los grupos evaluados (Figura 28C; 29A-B).

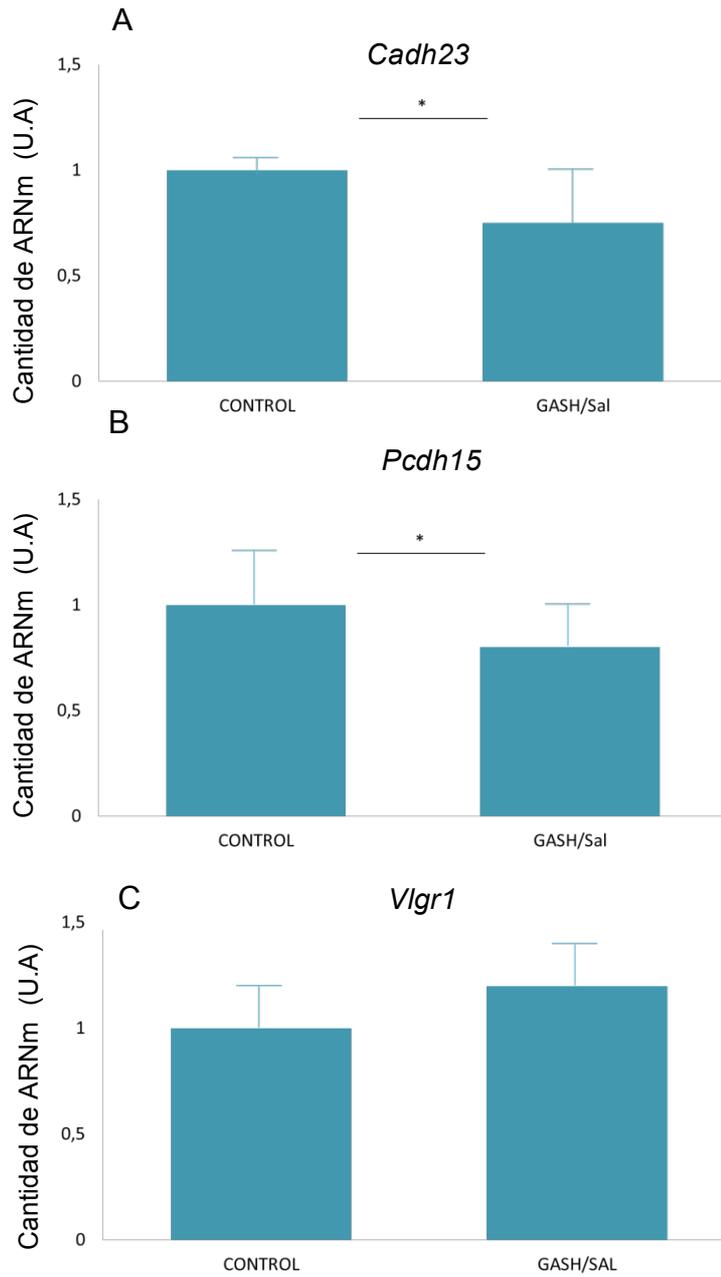


Figura 28. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea. **A:** *Cdh23* ($t = 4,692$; $p = 0,0001$); **B:** *Pcdh15* ($t = 3,261$; $p = 0,0036$); **C:** *Vlgr1* ($t = 1,659$; $p = 0.1127$); Eje X: Cantidades relativas de ARNm en unidades arbitrarias. Eje Y: Grupos experimentales: hámsters sirios (Control) y hámsters propensos a convulsiones (GASH/Sal). Las barras representan la media \pm SEM. Análisis estadístico: prueba T de Student, $*p \leq 0,0$.

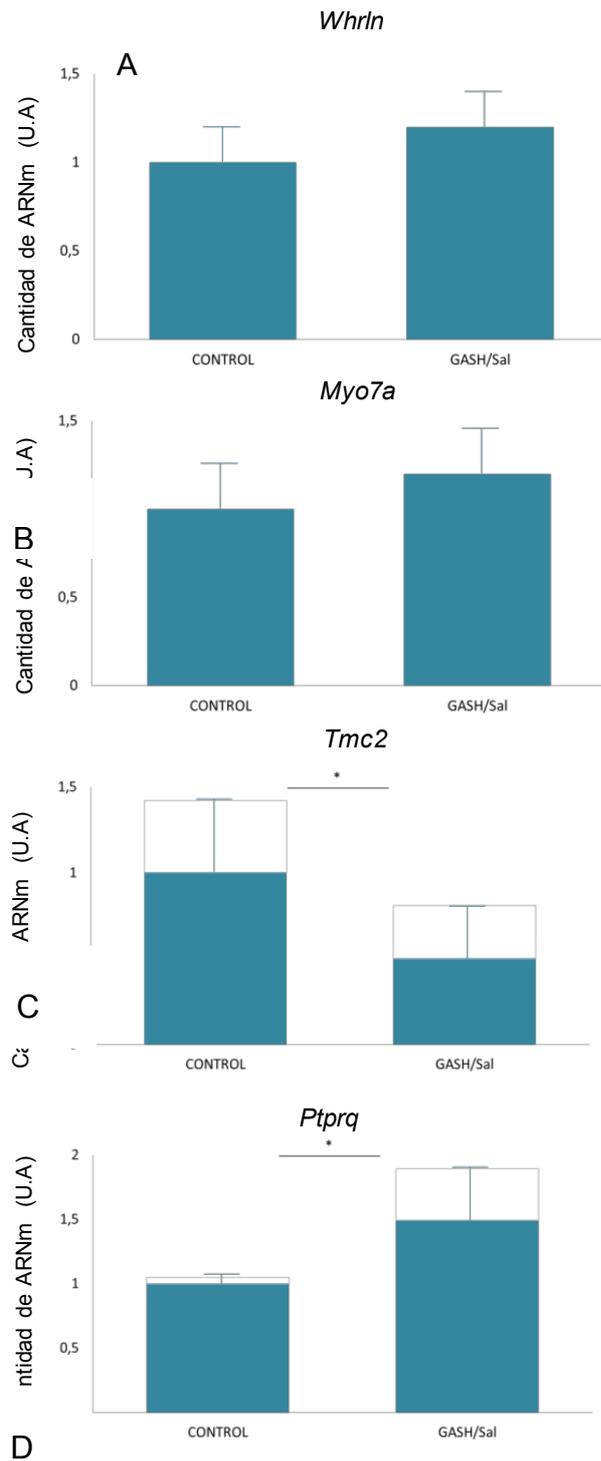


Figura 29. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea. **A:** *Whrn* ($t = 1,455$; $p = 0,1611$); **B:** *Myo7a* ($t = 0,3408$; $p = 0,7368$); **C:** *Tmc2* ($t = 4,082$; $p = 0,0005$); **D:** *Ptprq* ($t = 4,457$; $p = 0,0002$): Eje X: Cantidades relativas de ARNm en unidades arbitrarias. Eje Y: Grupos experimentales: hámsters sirios (Control) y hámsters propensos a convulsiones (GASH/Sal). Las barras representan la media \pm SEM. Análisis estadístico: prueba T de Student, $*p \leq 0,05$.

Otros genes relacionados con la cóclea: *Prestin*, *Slitrk6*, *Gipc3*.

El gen *Gipc3* mostró una regulación positiva en el modelo GASH/Sal, y los genes *Prestin* y *Slitrk6* presentaron una regulación negativa en el modelo GASH/Sal en comparación con el grupo control (Figuras 30A-30C).

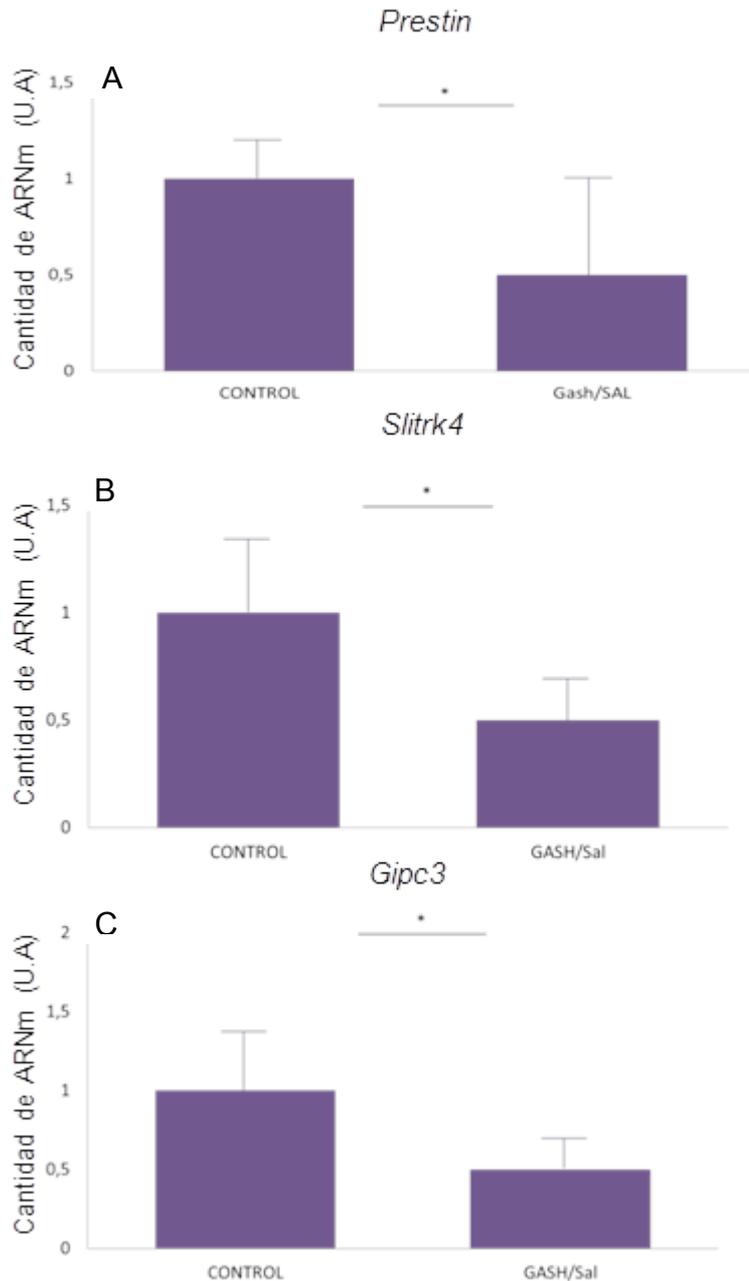


Figura 30. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea. **A:** *Prestin* ($t = 5,145$; $p < 0,0001$); **B:** *Slitrk6* ($t = 2,847$; $p = 0,0111$); **C:** *Gipc3* ($t = 2,919$; $p = 0,0088$). Eje X: Cantidades relativas de ARNm en unidades arbitrarias. Eje Y: Grupos experimentales: hámsters sirios (Control) y hámsters propensos a convulsiones (GASH/Sal). Las barras representan la media \pm SEM. Análisis estadístico: prueba T de Student, $*p \leq 0,05$.

5.4. Validación de la mutación en el gen *Otoa*

La variante del gen *Otoa* encontrada en el análisis del exoma, presenta un cambio de la Timina por la Citosina en la posición 77653451 del exón 19 (Figura 31). Fue confirmadas por secuenciación de Sanger en 5 GASH/ Sal y 5 hámsteres sírios controles (Figura 32). Esta variación en un nucleótido origina el cambio del aminoácido His por Arg en la posición 641 de la proteína

Gen	Proteína codificada	Reference Genome	Posición	Base de referencia	Base alternativa	Consecuencia	Impacto	Codón de cambio	Cambio de aminoácido	Posición en la proteína	Número de lecturas		Frecuencia el alelo alterado	
											Control	altertantina GASH/Sal	Control	GASH/Sal
<i>Otoa</i>	otoancorin	NW_004801604.1	77653451	T	C	Cambio de aa	Moderado	CAC/CGC	H/Ar	641	338	0,323	0	0,994

Figura 31. Característica de la variante del gen *Otoa* en el GASH/Sal. Resumen de la mutación y la consecuencia que tiene en la proteína resultante.

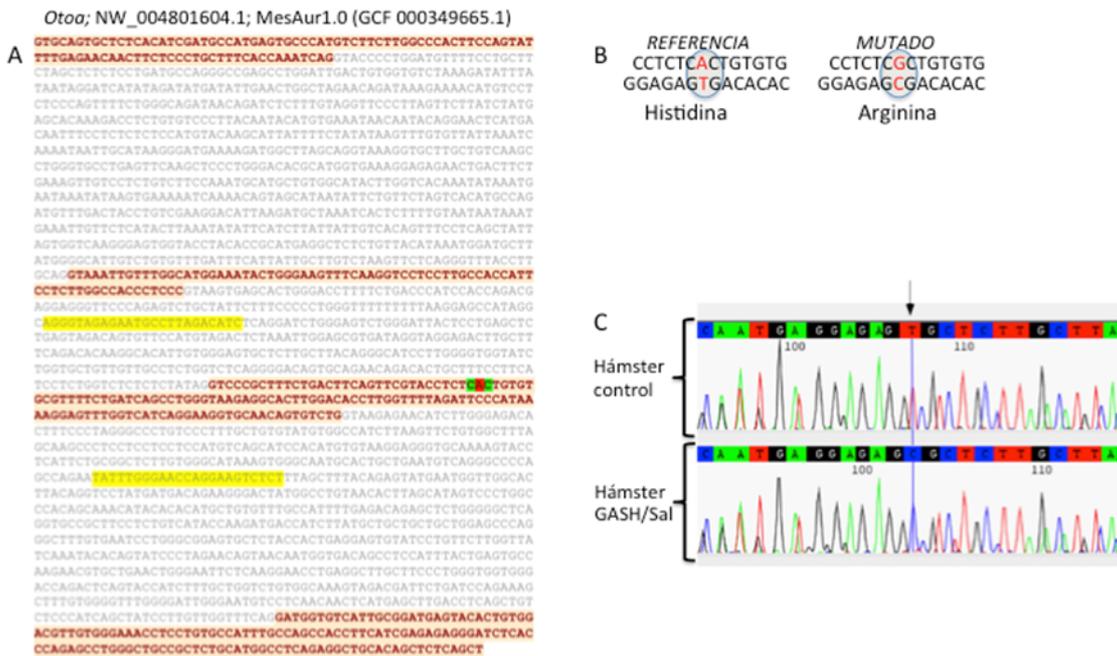


Figura 32. Polimorfismo del gen *Otoa* en el GASH/Sal. **A:** Secuencia del gen *Otoa* en *Mesocricetus auratus*. El gen tiene 3303bp y codifica 1100 aa en un total de 29 exones. La mutación en el hámster GASH/Sal está en la posición 773451. **B:** Hay una sustitución de A por G, lo que implica un cambio de Histidina por Arginina. **C:** Validación de la mutación del gen *Otoa* mediante secuenciación de Sanger.

6 – DISCUSIÓN

6.1 Análisis morfológicos

En nuestro trabajo, se ha proporcionado un conjunto de hechos morfológicos y moleculares del epitelio sensorial auditivo en contraste con el hámster sirio dorado, considerado como control. Para ello, fue esencial un conocimiento amplio de los controles, que sirviese como guía para valorar las alteraciones tanto morfológicas como moleculares presentes en el GASH/Sal.

Durante nuestras investigaciones, encontramos alteraciones morfológicas en la cóclea de GASH/Sal y una disminución de la expresión de genes relacionadas con un aumento decisivo del umbral auditivo (con reducción de las reacciones auditivas troncoencefálicas de la onda I).

En animales sanos, las células estereociliadas de la cóclea están distribuidas en tres filas de CCE y una fila de CCI. Se asientan en la membrana basilar, que oscila en respuesta a las ondas de presión sonora (Gillespie y Müller, 2009). Las CCE responden a potenciales inducidos por el sonido para ejercer una función de amplificador coclear y, por tanto, entre sus funciones destacan el aumento de sensibilidad a niveles bajos de presión sonora, la selectividad frecuencial y el adecuado rendimiento coclear (Ashmore, 2019; Santos-Sacchi, 2019). La relación entre la pérdida de CCE y la capacidad de amplificación coclear aún no está clara, pero se ha observado en ratas que, si la pérdida de CCE es superior a 2/3 del total, la amplificación se ve disminuida siempre y cuando el resto de CCE se encuentren funcionales (Chen et al., 2008). Esto puede implicar que, si el hámster GASH/Sal presenta anomalías cuantitativas en el número de CCE contabilizadas en el presente estudio, la capacidad de amplificación pueda estar reducida, contribuyendo a la hipoacusia que presentan de manera congénita y hallada en estudios previos mediante potenciales evocados troncoencefálicos (Muñoz et al., 2017).

Se ha descrito la densidad de células ciliadas, tanto externas como internas, en la cóclea de otros roedores cuantificado que la cóclea del hámster GASH/Sal tiene

35.3 CCE por cada 100 μm , siendo esta proporción entre el 5 y 20% menor que los encontrados en otros roedores. Por el contrario, nuestro estudio ha mostrado que las CCI del GASH/Sal se encuentran en una proporción de 10.5 por cada 100 μm , siendo este resultado mayor que en la rata silvestre, la cepa Wistar y el topo de Palestina. En cambio, las CCI del GASH/Sal presentan una proporción entre 2 y 13 % menor que las descritas en el ratón silvestre, el de campo y el ratón de la línea NMRI, así como en la rata negra, la rata topera y el topillo (Burda et al., 1989; Lange et al., 2004).

En lo referente a la ratio CCE/CCI, se puede apreciar cómo los roedores descritos poseen una mayor ratio que el GASH/Sal.

Aunque se mantenía la presencia de CCI y CCE, si bien diferente en cantidad con respecto a los controles; se observaron alteraciones tales como la desorganización de los componentes de la lámina reticular con una importante modificación de los penachos ciliares, una atrofia de la estría vascular y una disminución de las neuronas de ganglio espiral, como previamente descrito (Sánchez-Benito et al.).

Estas alteraciones, pueden ser una de las causas primarias de las modificaciones en la transmisión glutaminérgica, que desencadenen la propensión a los ataques epilépticos por estímulos acústicos en estos animales.

A la desestructuración en las células ciliadas del órgano de Corti descrita en los GASH/Sal, hay que añadir la alteración del alineamiento uniforme de los penachos, la irregular cantidad del número de estereocilios que forman cada uno de ellos, y el desdibujamiento de su habitual forma en V, en el caso de CCE y ligeramente curvadas, en CCI; con tres filas de decreciente altura y visible pérdida de sus mecanismos de anclaje favoreciendo la formación de espacios entre los elementos del penacho y el colapso de muchos, en varios grados de intensidad.

La disposición anárquica en las CCI es incompatible con la deflexión sincrónica de todos los estereocilios que determina la apertura y cierre de

canales asociados a la mecanotransducción. Estas alteraciones sugieren problemas en el procesamiento y la propagación de la información auditiva.

En el caso de las CCE, en muchos casos, las agrupaciones estaban colapsadas y se veía que faltaban algunos estereocilios. Las mediciones realizadas demostraron que, los que quedaban, eran significativamente mayores en el animal epiléptico, como describe Sánchez-Benito et al. (2020). Este alargamiento podría ser debido a algún tipo de mecanismo de compensación para intentar contactar con la membrana tectoria.

También, observamos una densidad menor de somas neuronales en el ganglio espiral en comparación con los normales, tal como se había resaltado en estudios previos (Sánchez-Benito et al., 2020).

Por otro lado, las células de Deiters aparecen expandidas y con unas granulosidades muy peculiares. Estos defectos, los estereocilios y las células de soporte, también han sido descritos en las ratas GEPR (*Genetically Epilepsy-Prone Rats*) (Penny et al., 1983) y en los ratones BLSW (Black Swiss mouse) (Charizopoulou et al., 2011), por lo que estas alteraciones cocleares son comunes a los modelos animales con convulsiones audiógenas.

En los controles, la función auditiva era normal y en consecuencia, los principales elementos del conducto coclear, como el órgano de Corti, el ganglio espiral, y la estría vascular se revelaron con su apariencia habitual (Kaltenbach et al., 1994).

El desarrollo de la cóclea del hámster ha sido estudiado ampliamente con microscopía óptica y electrónica, sin embargo; la información sobre los hámsteres adultos GASH/Sal, es todavía parcial.

Defectos morfológicos y moleculares en cóclea de los GASH/Sal revelan una susceptibilidad a los ataques convulsivos audiógenos

No se conocen del todo los efectos de las alteraciones cocleares en el entramado epiléptico de los modelos AGS (*Audiogenic Seizures*). En este sentido, trabajos recientes de nuestro grupo, han demostrado que el GASH/Sal tiene alterada la sensibilidad acústica, mostrando una alta elevación del umbral

de ABR y variaciones en la DPOAE (*Distortion Product Otoacoustic Emissions*) (Muñoz et al., 2017; Sánchez-Benito et al., 2017).

La pérdida de neuronas del ganglio espiral y la conservación de células ciliadas, como ocurre en los GASH/Sal, puede indicar una desaferentación del nervio auditivo y aunque no está relacionada con exposición a sonidos de fuerte intensidad, puede compararse con la neuropatía coclear, donde se observa daño en las sinapsis cocleares sin pérdida de células sensoriales auditivas. Esta neuropatía, sin embargo; se asocia con la exposición a sonidos de alta intensidad y al envejecimiento, donde se producen varias formas de pérdida de audición, acufenos e hiperacusia (revisión de Liberman y Kujawa, 2017; Milloy et al, 2017).

Defectos moleculares y morfológicos en la cóclea de los GASH/Sal revelan susceptibilidad a crisis convulsivas audiogenas (AGS)

En la actualidad existen datos que hacen considerar al colículo inferior como el lugar de inicio para las AGS en los modelos epilépticos de roedores (Faingold et al., 1992; Garcia-Cairasco, 2002).

Tal como propusieron con anterioridad (Church y Kaltenbach, 1993), en nuestras observaciones se han demostrado alteraciones provocadas por actividad neuronal del colículo. Los resultados obtenidos por nuestro laboratorio, parecen indicar la existencia de una neuropatía coclear, con disminución de las fibras nerviosas el nervio auditivo (coclear), un descenso de la sincronización de las descargas del nervio y una actividad neuronal aberrante dentro del foco epileptogénico.

En estudios previos, se observaron alteraciones en de la estría vascular (Sánchez-Benito et al., 2017), que en ocasiones se habían relacionado como propios del envejecimiento y que cursan con pérdida de audición y con alteraciones de la homeostasis coclear (Schuknecht et al., 1974; Gratton y Schulte, 1995; Patuzzi, 2011). Estas alteraciones de la homeostasis pueden ser la causa de las modificaciones morfológicas observadas con la MEB, al encontrarse aumentos de microvellosidades y la aparición de protrusiones esféricas de diferente volumen, que se ha considerado un aumento de la

secreción en las células epiteliales que muestran estos fenómenos. A estas formaciones se les ha dado la función de absorción y de secreción según estén aisladas (Martín y Spicer, 1973) o en asociación con cilios (Dohrmann, 1970).

6.2 Estudios de expresión génica

La evaluación del perfil transcripcional de los diferentes genes en la estructura coclear en el modelo GASH/Sal y en los hámsteres sirios controles, mostró que el gen *Slitrk6* está infra-expresado en el modelo GASH/Sal.

Este gen juega un papel fundamental en el desarrollo normal de la audición y de la vista (Tekin et al., 2013; Salime et al., 2018). En el desarrollo embrionario del ratón, más allá del sistema nervioso central (CNS), se detectó expresión de *Slitrk6* en el otocisto primitivo, retina, cóclea y en el primordio del órgano visceral entre otros (Aruga, 2003). En el desarrollo del oído interno, *Slitrk6* está fundamentalmente expresado en el neuroepitelio primitivo sensorial que más tarde se desarrolla en las células cocleares del oído (Aruga, 2003).

Slitrk6 se ha relacionado con síndromes de sordera y miopía en algunas poblaciones (Aruga, 2003; Tekin et al., 2013; Salime et al., 2018). Hasta la fecha, todos los pacientes citados con sordera y miopía tenían variantes *Slitrk6* homocigóticas sin sentido (Tekin et al., 2013).

El gen *Gipc3* localizado en las células ciliadas del oído interno y en el ganglio espiral estaba sobreexpresado en el modelo GASH/Sal. En su estudio, Charizopoulou y colaboradores (Charizopoulou et al., 2011) mostraron una mutación sin sentido en el dominio PDZ del gen *Gipc3* lo que supone un efecto atenuante en la mecanotransducción y en la adquisición de las corrientes potasio de las células ciliadas del oído interno maduras. Estos autores sugieren que la proteína codificada por este gen se necesita para la maduración postnatal de las células del oído y para su supervivencia a largo plazo, así como del ganglio espiral. Tiene una función crítica en la adquisición de la señal acústica y en su propagación en las células auditivas del oído (Charizopoulou et al., 2011). Este gen, según algunas citas, causa pérdida auditiva sensorineural con la edad y diferentes mutaciones se asocian con pérdida auditiva nonsindrómica (Rehman et al., 2011; Simarci et al., 2012; Ramzan, et

al., 2013; Siddiqi et al., 2014; Asgharzarde et al., 2018 Khan et al., 2019).

El gen *Prestina*, infrarregulado en el modelo GASH/Sal; pertenece a una familia de transportadores aniónicos y se asocia con una sordera no-sindrómica (Dallos, 2008; Alper and Sharma, 2013). En mamíferos, la *Prestina* se localiza en la membrana basolateral de las células ciliadas externas del oído (CCE), en las cuales; actúa como una proteína motor (Song and Santos-Sacchi, 2012; Birke and Javelle, 2016). Las CCE son electro-móviles y llevan a una amplificación coclear para mejorar la capacidad del individuo en la detección y discriminación de sonidos (Song and Santos-Sacchi, 2012; Bai et al., 2019). Es decir; El gen *Prestina* es el responsable de esta electromotilidad que hace cambiar la rigidez y la longitud de estas células, alterando su potencial de membrana durante la transducción auditiva (Dallos, 2008; Alper and Sharma, 2013). Por ello, este es generalmente considerado el responsable de, al menos parte; la amplificación de la señal coclear detectadas por los mecanismos de la mecanotransducción estereociliar (Dallos et al., 2008; Alper and Sharma, 2013).

Dallos y colaboradores (2008), en su estudio con ratones con el gen *Prestina* activado y desactivado, vieron que las células ciliadas del oído externo de los ratones *Knockin* (activación) tenían una longitud y una rigidez adecuada. Sin embargo, estos ratones mostraron sensibilidad similar al modelo *knockout* (Dallos et al., 2008). En los ratones *knockout* (bloqueo), se observó tanto una pérdida completa de la electromotilidad como una reducción del tamaño de las CCE (Takahashi et al., 2018). Otros estudios han mostrado que los ratones *knockout* para la *prestina* presentan una pérdida prematura de las CCE, lo que invita a pensar que el gen *Prestin* puede estar también involucrado en mantenimiento y supervivencia de las CCE (Wu et al., 2004; Cheatham et al., 2007, 2015; Takahashi et al., 2018). Estos datos muestran que una baja funcionalidad y expresión de esta proteína puede afectar al procesamiento de la información auditiva.

El gen *Pou4f3* se encuentra infraexpresado en el modelo GASH/Sal. Los experimentos con animales *Knockout* para el gen *Pou4f3* indican un papel crucial de este gen en la maduración, supervivencia y migración de las células auditivas (Xiang et al, 1998). Mutaciones en el dominio POU causa pérdida

auditiva en humanos y ratones como consecuencia de la pérdida de células auditivas en el oído interno (Xiang et al, 1998) y 27 variantes del gen *Pou4f3* se han asociado con una pérdida no-sindrómica autosómica en diferentes poblaciones humanas (Lin et al., 2017; Gao et al., 2018). El gen *Pou4f3* codifica un factor de transcripción y está expresado en las células de la cóclea y del sistema vestibular del oído interno además de activar la transcripción de un gen *downstream* (hacia el extremo 3') objetivo cuya expresión es necesaria para el mantenimiento de las células ciliadas externas del oído (Zhang et al, 2016; He et al., 2016).

También hemos evaluado tres genes importantes relacionados con el reciclaje de los iones potasio (K^+) en la estructura coclear: *Kcnq4*, *kcnq1* y *Gjb2*. Los genes *Gjb2* y *Kcnq1* se infraexpresaron mientras el gen *Kcnq4* se sobreexpresó en la cóclea del modelo GASH/Sal. Los genes *Gjb2* y *Kcnq1* están expresados en la estría vascular del conducto coclear y el gen *Kcnq4* en las células del oído (HCs). La circulación de K^+ es esencial para la transducción sensorial en la cóclea. Para mantener la hemostasia, el K^+ que entra en las células auditivas (HCs) debe retornar a la estría vascular a través de las células de soporte del órgano de Corti (OC) (Carignano, 2019). En el ciclo coclear, el K^+ disponible en la endolinfa entra en las células ciliadas del oído y se libera a través de los canales basolaterales de las células del oído HCs, especialmente el canal de potasio KCNQ4. El ion potasio K^+ puede ser absorbido por los fibrocitos y transportado de célula a célula a través de las uniones gap, incluyendo GJB2 (conexina 26), a las células intermedias de la estría vascular. El K^+ es liberado desde las células intermedias al espacio intraestrial que genera el potencial endococlear. Desde el espacio intraestrial, K^+ es absorbido por las células marginales de la estría vascular que lo liberan a la endolinfa a través del canal potasio KCNQ1/KCNE1, momento en el que termina el ciclo coclear (Wangemann, 2002; Carignano, 2019) (Ver Figura 33).

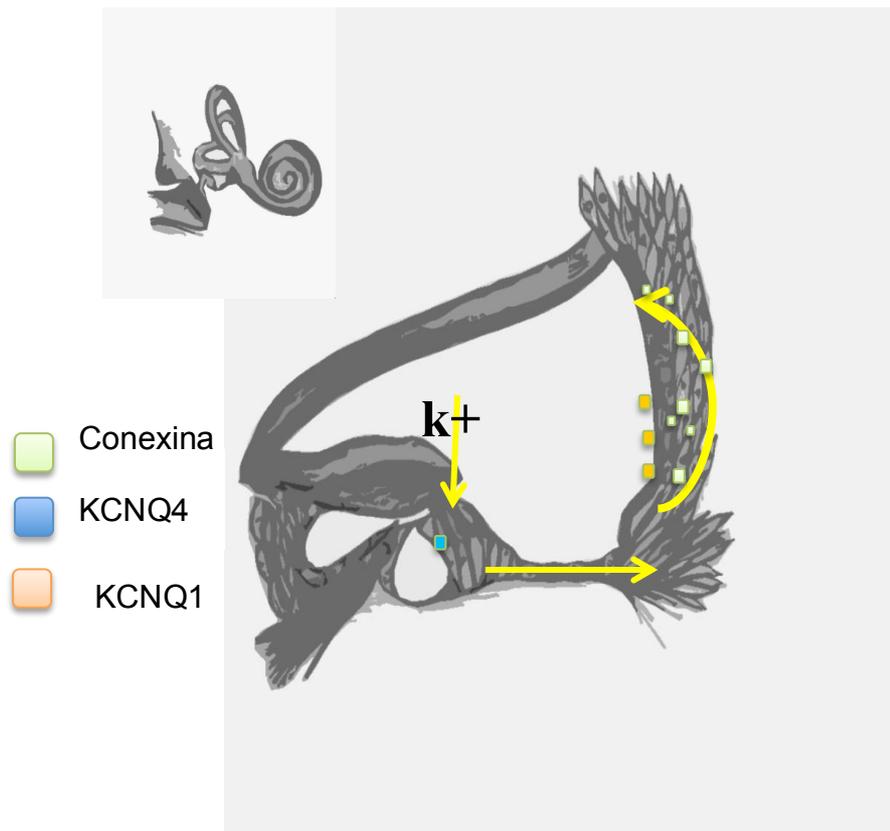


Figura 33. Representación del Ciclo del Potasio para la formación del potencial endococlear. El potasio entra en las células ciliadas externas, es captado por las células de Deiters para luego transportarse desde los fibrocitos hasta las células marginales a través de las conexinas y ser liberados a través de canales potasio a la Rampa media. Abreviaturas: k^+ : Ión potasio.

El gen *Kcnq4* codifica el principal canal potasio K^+ involucrado en la extrusión de potasio desde las células externas del oído (CCEs) (Carignano, 2019; Cazals, 2015; Grunet et al., 2003). Así como *Kcnq4*, *Kcnq1* es también crucial para el mantenimiento de la homeostasis K^+ y generación del potencial endococlear en la endolinfa manteniendo la función auditiva (Wang, 2017).

El gen *Gjb2* codifica la conexina 26, un componente de la unión gap en la estría vascular de la cóclea. La conexina 26 está relacionada con el metabolismo del potasio K^+ y juega un papel fundamental en la señalización intercelular (Terrinoni, 2010; Zainal 2012). El ciclo de potasio permite que tengan lugar los procesos fisiológicos de la audición. Cambios en cualquiera de los pasos del proceso pueden generar diferentes tipos de sordera (Carignano, 2019). Mutaciones en los genes *Gjb2*, *Kcnq1* y *Kcnq4* se asociaron con pérdida auditiva no-sindrómica, un desorden autosómico recesivo llamado Jervell y el

síndrome Lange–Nielsen, una pérdida auditiva no-sindrómica autosómico dominante (Bussini, 2019; Vojdani, 2019; Cazals, 2015). La infraexpresión de estos genes puede interferir en las concentraciones iónicas intracelulares.

Entre los genes cuya expresión tiene lugar en los estereocilios, el gen *Ptpqr* estaba sobreexpresado mientras que *Tmc2*, *Pcdh15* y *Cdh23* estaban infraexpresados. El gen *Ptpqr* codifica un receptor de la tirosina fosfatasa (PTPRQ), que es una proteína de membrana localizada en la región basal de los estereocilios. PTPRQ juega un papel fundamental en la regulación y reorganización de los filamentos de actina, cambios en la forma de la célula y formación del eje conector. Además, parece mantener la organización de los revestimientos de la superficie celular y la estructura de las hileras de estereocilios (Sakuma, 2015). PTPRQ es esencial para la maduración normal y función de las hileras de estereocilios de la cóclea. Sus mutaciones pueden causar defectos de los estereocilios de las células auditivas, lo que lleva a una pérdida auditiva sensorineural no sindrómica (Talebi, 2017; Sakuma, 2015; Whu, 2018).

La expresión de *Tmc2* en la cóclea se limita al desarrollo de las agrupaciones de los estereocilios. Este gen codifica el canal transmembrana TMC2 que constituye un canal mecanotransducción complejo que incluye la proteína PCDH15 entre otras (Kurima et al., 2015; Liu et al., 2019; Corey et al., 2019; Jia et al., 2020). PCD15 y CDH23 constituyen los puentes apicales entre los estereocilios y PCDH15 interacciona directamente con TMC2 (Corey et al., 2019) Estos genes son necesarios para la transducción sensorial que se produce gracias a los canales iónicos mecanosensitivos en los estereocilios en las células ciliadas internas del oído. La mecanotransducción MET es una consecuencia de la desviación de los estereocilios hacia la fila más larga de estereocilios, lo que genera tensión en los puentes apicales, abriendo los canales y causando la despolarización de las células ciliadas del oído (Kurima et al., 2015; Corey et al., 2019; Choudhary et al., 2020). En este aspecto, presumiblemente, la infraexpresión tanto de *Pcdh15* como de *Cdh23*, se materializa con anomalías en dichas uniones dependientes de calcio haciendo que estas sean menos eficientes, algo que con apoyan nuestros resultados sobre inmunopositividad para parvalbúmina. En los resultados se aprecia cómo

las células son inmunopositivas de manera parcial, lo que puede ser indicativo de una inadecuada mecanotransducción.

Por otro lado, se conoce que las mutaciones en los genes *Pcdh15* y *Cdh23* son responsables del Síndrome Usher tipo 1 que se caracteriza por ceguera y una forma de sordera autosómica no-sindrómica recesiva denominada DFNB12 (Han et al, 2012; Mathur, 2015). Estudios publicados previamente demuestran la falta de organización de los estereocilios durante el desarrollo en ausencia de PCDH15, al comprometer el papel de la proteína LHFPL5 (proteína de membrana tetraspanina de los estereocilios de las células ciliadas) con la que su interacción es crucial en los *tip links* en las células ciliadas de la cóclea (Ge et al., 2018; Mahendrasingam et al., 2017). Estos estudios concuerdan con los datos publicados por Sánchez-Benito et al., (2020), donde se muestra la falta de un adecuado orden y desarrollo estereociliar en el GASH/Sal y también concuerdan con el presente estudio, donde se observa la infraexpresión de PCDH15 detectada mediante RT-qPCR de la cóclea del GASH/Sal frente a controles. Por tanto, nuestros resultados apoyan los estudios previos y podrían explicar la hipoacusia presente en el GASH/Sal, pudiendo estar afectada tanto la transducción por anomalías de las CCI como la función de amplificación coclear de las CCE debido al déficit de PCDH15.

Otros genes que codifican proteínas estereociliares estudiados, *Vlgr1*, *Whrn* y *Myo7a*, no presentan cambios significativos en su expresión génica en relación a los controles, por lo que no hemos ahondado en su estudio. Además, la ausencia de diferencias en la expresión génica no implica que la proteína no esté alterada, ya que aspectos como su estabilidad o tasa de recambio podrían presentar alguna anomalía y ser causantes de las alteraciones encontradas.

Los genes *Tecta* y *Otoa* de la membrana tectoria. El gen *Tecta* codifica la proteína alpha-tectorin (TECTA), una proteína modular no-colagénica de la membrana tectoria (Moreno-Pelayo, 2008; Legan, 2013) mientras que el gen *Otoa* codifica la proteína (OTOA) necesaria para la unión limboespiral de la membrana tectoria en el oído interno (Lukashkin et al., 2012). *Tecta* es el gen que se ha citado con mayor frecuencia como causante de la hipoacusia

neurosensorial de frecuencia media, pero mutaciones también llevan a otras formas de hipoacusias no sindrómicas (Yamamoto, 2017).

Respecto a la mutación del gen *Otoa*, no se ha encontrado información para asignar un papel al residuo His641, ni descrita esta mutación en la literatura. Sin embargo, mutaciones en este gen también llevan a otras formas de hipoacusias no sindrómicas, comunes en individuos con mutaciones en el gen *Otoa* (Lee et al., 2013; Kim et al., 2019) (Moreno-Pelayo, 2008; Yasukawa, 2019). La pérdida de audición en pacientes con mutaciones de *Otoa* se cree que es causada por un defecto en la estimulación de las células ciliadas internas provocada por la desunión de la membrana tectoria del limbo espiral. La mutación del gen *Otoa* encontrada en nuestro modelo puede que contribuya más a la hipoacusia del mismo que a la génesis de crisis convulsivas audiógenas.

7 – CONCLUSIONES

Primera- Se han encontrado alteraciones morfológicas en las células sensoriales del órgano de Corti y en las células adyacentes.

Segunda- El órgano de Corti del GASH/Sal presenta pérdida de células ciliadas y del patrón estereociliar, alargamiento de algunos estereocilios y anomalías en las células de Deiters.

Tercera- Los defectos encontrados en los estereocilios y en las células de soporte coinciden con los descritos en otros modelos animales con epilepsia audiógena.

Cuarta- Las anomalías numéricas encontradas en las células ciliadas internas pudieran contribuir a la hipoacusia presente en el GASH/Sal

Quinta- El déficit de proteínas de unión estereociliar puede afectar a la mecanotransducción y a la amplificación coclear, lo que repercute en la sensibilidad auditiva de GASH/Sal.

Sexta- Se valida la mutación del gen *Otoa*, codificante de la proteína otoancorina en la línea de hámsteres GASH/Sal. Este hecho, unido a la menor expresión génica en la cóclea, refuerza el cuadro de hipoacusia de los GASH/Sal.

Séptima- Hay una menor expresión de genes codificantes de proteínas implicadas en la morfofuncionalidad del órgano de Corti en el GASH/Sal, haciéndole particularmente susceptible a las convulsiones audiogénicas.

8–BIBLIOGRAFÍA

- Ades, HW, Engström H. Anatomy of the Inner Ear. Auditory System. *Handbook of Sensory Physiology*, 1974. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-65829-7-5>.
- Alper Seth L, Sharma, Alok K. The SLC26 Gene Family of Anion Transporters and Channels. *Molecular aspects of medicine*, 2013; 34 (2–3): 494-515. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.009>.
- Aruga, J. Slitrk6 expression profile in the mouse embryo and its relationship to that of Nlrr3. *Gene Expression Patterns*, 2003; 3 (6); 727-733. [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00141-8).
- Asgharzadea S, Amin Tabatabaiefarb, Mohammadi-asld J, Hashemzadeh Chaleshtori M. A novel missense mutation in GIPC3 causes sensorineural hearing loss in an Iranian family revealed by targeted next-generation sequencing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2018; (108): 8-11. <https://doi.org/doi:10.1016/j.ijporl.2018.01.006>.
- Ashmore J. Outer hair cells and electromotility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2019, 9(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033522>.
- Avoli M. A brief history on the oscillating roles of thalamus and cortex in absence seizures. *Epilepsia*, 2012; 53(5):779–789.
- Babel J, A Bischoff A, Spöndlin H. Ultrastructure of the peripheral nervous system and sense organs: Atlas of normal and pathological anatomy. Auditory System, 1974: (5); 1.
- Bai J-P, Navaratnam D, Santos-Sacchi J. Prestin kinetics and corresponding frequency dependence augment during early development of the outer hair cell within the mouse organ of Corti. *Sci Rep*, 2019; 11; 9 (1):16460. <https://doi:10.1038/s41598-019-52965-1>.
- Barrera-Bailón B, Oliveira J.A.C, López DE, Muñoz LJ Garcia-Cairasco N, Sancho C. Pharmacological and neuroethological studies of three antiepileptic drugs in the Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal).

Epilepsy&behavior, 2013; (28); 3,413-425. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.05.028>.

-Barrera-Bailón B, Oliveira JAC, López DE, Muñoz L.J.Garcia-Cairasco N, Sancho C. Pharmacological and neuroethological study of the acute and chronic effects of lamotrigine in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy&behavior*, 2017 ;71:207-217. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.11.005>.

-Birke AS, Javelle A. Prestin and the good vibrations. *Biochem Journal*, 2016, 473 (15): 2425–2427. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160015>.

-Bonnet C, El-Amraoui A. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): Pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Current Opinion in Neurology*, 2012; 25(1), 42-49. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32834ef8b2>.

-Brandt A, Striessnig J, Moser T. Cav1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci*, 2003; 23(34):10832-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10832.2003>.

-Burda H, Bruns V, Nevo E. Middle ear and cochlear receptors in the subterranean mole-rat, *Spalax ehrenbergi*. *Hearing Research* 1989, 39(3), 225-230. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(89\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0378-5955(89)90042-7)

-Burgess DL, Jones JM, Meisler MH, Noebels JL. Mutation of the Ca²⁺ channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse. *Cell*, 1997; 88(3):385-392.

-Bussini A, Righi R, Pessina C, Genoni A, Cristofari E, Meli A. The p.Gly130Val mutation in the *GJB2* gene: A familiar case of autosomal dominant non-syndromic hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019; (127):109653. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2019.109653>.

-Carballosa-Gonzalez MM, Muñoz Luis J, López-Alburquerque T, Pardal-Fernández JM, Nava E, de Cabo C. EEG characterization of audiogenic

seizures in the hamster strain GASH:Sal. *Epilepsy Research*, 2013; (106): 3; 318-325.

-Carignano C, Pablo Barila E, Ignacio Rías E, Dionisio L, Aztiria E, Spitzmaul G. Inner Hair Cell and Neuron Degeneration Contribute to Hearing Loss in a DFNA2-Like Mouse Model. *Neuroscience*, 2019; 1(410):202-216. [https://doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.05.012](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.012).

-Cazals Y, Bévengut M, Zanella S, Brocard F, Barhanin J, Gestreau C. KCNK5 channels mostly expressed in cochlear outer sulcus cells are indispensable for hearing. *Nature Communications*, 2015; 6: 8780. [https://doi: 10.1038/ncomms9780](https://doi.org/10.1038/ncomms9780).

-Chang EH, Van Camp G, Smith RJ. The role of connexins in human disease. *Ear Hear*, 2003; (24): 314-23.

-Charizopoulou N, Lelli A, Schraders M, Ray K, Hildebrand MS, Ramesh A, Noben-Trauth K. Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human. *Nature Communications*, 2011; 2: 201. [https://doi:10.1038/ncomms1200](https://doi.org/10.1038/ncomms1200).

-Cheatham MA, Edge RM, Homma K. Prestin-Dependence of Outer Hair Cell Survival and Partial Rescue of Outer Hair Cell Loss in Prestin Knockin Mice. *Plos one*, 2015; 10: (12) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145428>.

-Cheatham MA, Zheng J, Huynh KH. Evaluation of an Independent Prestin Mouse Model Derived from the 129S1 Strain. *Audiol Neurotol*, 2007; 12:378–390. <https://doi.org/10.1159/000106481>.

-Chen G-D, Tanaka C, Henderson D. Relation between outer hair cell loss and hearing loss in rats exposed to styrene. *Hearing Research* 2008, 243(1-2), 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.05.008>.

-Choudhary D, Narui Y, Neel BL, Wimalasena L N, Klanseck CF, de la Torre Structural determinants of protocadherin-15 mechanics and function in hearing and balance perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020; 117(40), 4837-24848.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1920444117>.

-Church MW, Kaltenbach JA. The hamster's auditory brain stem response as a function of stimulus intensity, tone burst frequency, and hearing loss. *Ear Hear*, 1993; 14 (4), 249e257. <https://doi.org/10.1097/00003446-199308000-00004>.

-Corey DP, Akyuz N, Holt JR. Function and Dysfunction of TMC Channels in Inner Ear Hair Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019; 1; 9(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033506>.

-Dallos P. Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Curr Opin Neurobiol*, 2008; (18);4, 370-376. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.016>.

-Damasceno S, Gómez-Nieto R, Garcia-Cairasco N, Herrero-Turrión MJ, Marín F, López DE. Top Common Differentially Expressed Genes in the Epileptogenic Nucleus of Two Strains of Rodents Susceptible to Audiogenic Seizures: WAR and GASH/Sal. *Frontiers in Neurology*, 2020, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00033>.

-De kok YJ, Van Der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science*, 1995; (267): 685-688.

-Díaz-Casado E, Gómez-Nieto R, Pereda JM, Muñoz LJ, Jara M, López D.E. Analysis of gene variants in the GASH/Sal model of epilepsy. *PLoS ONE* 2020, 15(3): e0229953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229953>.

-Driver, E.C., Kelley, M.W. Development of the cochlea. *Development (Cambridge)*, 2020; 147(12). <https://doi.org/10.1242/dev.162263>.

-Erkman L, Evil RJ, Lou L. Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature*, 1996; (381): 603-6.

-Engstrom H, Ades HW, Hawkins JE. The vestibular sensory cells and their innervation. *Symp Biol*, 1965. 5, 1965; 40-34.

-Engström H, Wersäll J. Structure and Innervation of the Inner Ear Sensory Epithelia. *International Review of Cytology*, 1958; (7); 535-585.

[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62695-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62695-9).

-Faingold CL, Naritoku DK, Copley C.A., Randall ME, Riaz A, Anderson. Glutamate in the inferior colliculus plays a critical role in audiogenic seizure initiation. *Epilepsy Res*, 1992; 13 (2), 95e105. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(92\)90064-Z](https://doi.org/10.1016/0920-1211(92)90064-Z).

-Felix R. Insights from mouse models of absence epilepsy into Ca²⁺ channel physiology and disease etiology. *Cell Mol Neurobiol*. 2002; 22(2):103-120.

-Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger E. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014; 55(4): 475–482.

-Fuentes-Santamaría V, Cantos R, Alvarado JC, García-Atarés N, López DE Morphologic and Neurochemical Abnormalities in the Auditory Brainstem of the Genetically Epilepsy-prone Hamster (GPG/Vall). *Epilepsia*, 2005; 46(7):1027–1045. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.68104>.

-Gao X, Su Y, Huang S-S, Mao, J-N. Clinical and molecular characterization of POU3F4 mutations in multiple DFNX2 Chinese families. *BMC Medical Genetics*, 2018; 19, 4;19 (1):157 <https://doi:10.1186/s12881-018-0630-9>.

-García-Cairasco N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear. Res.*, 2002; 168 (1-2), 208-222. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00371-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00371-4).

-Gillespie PG, Müller U. Mechanotransduction by Hair Cells: Models, Molecules, and Mechanisms. *Cell*, 2009; 139(1), 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.010>.

-Gómez-Nieto, Hormigo S, López DE Prepulse Inhibition of the Auditory Startle Reflex Assessment as a Hallmark of Brainstem Sensorimotor Gating Mechanisms. *Brain Sci*; 2020, 10(9), 639; <https://doi.org/10.3390/brainsci100906392020>).

-Gratton MA, Schulte BA. Alterations in microvasculature are associated with atrophy of the stria vascularis in quiet-aged gerbils. *Hear. Res*, 1995 82, 44e52. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(94\)00161-1](https://doi.org/10.1016/0378-5955(94)00161-1).

-Hackney CM, Furness DN. The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *Journal of Cell Science*, 2013; 126(8), 1721-1731. <https://doi.org/10.1242/jcs.106120>.

-Han F, Yu H, Tian C, Chen HE, Benedict-Alderfer C, Zheng Y. A new mouse mutant of the *Cdh23* gene with early-onset hearing loss facilitates evaluation of otoprotection drugs. *The Pharmacogenomics Journal*, 2012; 12, 30–44. <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.60>.

-He L, Pang X, Chen P, Wu H, Yang T. Mutation in the Hair Cell Specific Gene *POU4F3* is a Common Cause for Autosomal Dominant Nonsyndromic hearing Loss in Chinese Hans. *Neural Plasticity*, 2016; 9890827. <https://doi.org/10.1155/2016/9890827>.

Helbig I. New technologies in molecular genetics: the impact on epilepsy research. *Prog Brain Res*, 2014; 213:253-278.

-Helbig I. Genetic Causes of Generalized Epilepsies. *Semin Neurol*, 2015; 35(3):288-292.

-Hughes JR. Absence seizures: a review of recent reports with new concepts. *Epilepsy Behav*, 2009; 15(4):404-412.

-ILAE. Commission on classification and terminology of the International league against epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsias and epileptic syndromes. *Epilepsia*, 1989; 30:389- 399.

-Jia Y, Zhao Y, Kusakizako T, Wang Y., Pan C, Zhang Y. TMC1 and TMC2 Proteins Are Pore-Forming Subunits of Mechanosensitive Ion Channels. *Neuron*, 2020; 105(2):310-321. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.017>.

-Johannesen K, Marini C, Pfeffer S, Møller RS, Dorn T, Niturad C, et al. *GABRA1*: From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies.

Neurology, 2016; Aug 12. [https://doi.org/ 10.1212/WNL.0000000000003087](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003087).

-Jones NC, O'Brien TJ, Powell KL. Morphometric changes and molecular mechanisms in rat models of idiopathic generalized epilepsy with absence seizures. *Neurosci Lett*, 2011; 497(3):185 –193.

-Kandratavicius L, Balista P, Lopes-Aguiar C, Ruggiero R, Umeoka E, Garcia-Cairasco N. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2014; 10:1693. <https://doi.org/10.2147/NDT.S50371>.

-Khan A, Han S, Wang, R., Ansar, M, Ahmad W, Zhan X. Sequence variants in genes causing nonsyndromic hearing loss in a Pakistani cohort. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2019; 7(3). [https://doi.org/ 10.1002/mgg3.917](https://doi.org/10.1002/mgg3.917).

-Komsuoglu Celikyurt I, Isik E, Erdolu CO. Audiogenic Seizures and Their Importance in Experimental Behavioral Studies: A Review. *Medical Science Review*, 2016; 3, 110–118. <https://doi.org/10.12659/msrev.899608>.

-Kubish C. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 1999; (96): 437-46.

-Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell*, 1996; (84): 381-8.

-Kurima K, Ebrahim S, Pan B., Sedlacek M, Sengupta P, Millis BA. TMC1 and TMC2 Localize at the Site of Mechanotransduction in Mammalian Inner Ear Hair Cell Stereocilia, 2015. *Cell reports*, 2015; 12 (10): 1606-1617. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.058>.

-Gregory, FD, Pangršič T, Calin-Jageman IE, Moser T, Lee A. Harmonin enhances voltage-dependent facilitation of Cav1.3 channels and synchronous exocytosis in mouse inner hair cells. *J. Physiol*, 2013; 591:13; 3253–3269. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.254367>.

-Kaltenbach A, Falzarano PR. Postnatal development of the hamster cochlea: Growth of hair cells and the organ of Corti. *JCN*, 1994. <https://doi.org/10.1002/cne.903400107>.

- Kim BJ, Kim DK, Hee Han J. Clarification of glycosylphosphatidylinositol anchorage of OTOANCORIN and human OTOA variants associated with deafness. *Hum Mutat*, 2019. 40, 5; 525-531. [https://doi: 10.1002/humu.23719](https://doi.org/10.1002/humu.23719).
- Laer L, Crynsm K, Smith R, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear*, 2003; 24:275-88.
- Lange S, Stalleicken J, Burda H. Functional morphology of the ear in fossorial rodents, *Microtus arvalis* and *Arvicola terrestris*. *Journal of Morphology* 2004, 262(3), 770-779. <https://doi.org/10.1002/jmor.10277>.
- Lee K, Chiu I, Santos-Cortez RLP, Basit S, Khanc S, Azeemd Z, Andradea PB, Kima S, Ahmadc W., Leala SM. Novel OTOA mutations cause autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in Pakistani families. *Clin Genet*, 2013; 84(3): 294–296. doi:10.1111/cge.12047.
- Legan PK, Lukashkina VA, Goodyear RJ. A targeted deletion in alpha-tectorin reveals that the tectorin membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. *Neuron*, 2000; (28): 273-85.
- Legan PK, Goodyear RJ, Morín M, Mencia A, Pollard H, Olavarrieta L. Three deaf mice: mouse models for TECTA-based human hereditary deafness reveal domain-specific structural phenotypes in the tectorial membrane. *Human Molecular Genetics*, 2014; 23: 10; 2551–2568. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt646>.
- Liberman M, Kujawa, SG Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: manifestations and mechanisms. *Hear. Res*, 2017: (349); 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003>.
- Liberman MC, Gao J, He DZ. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for cochlear amplifier. *Nature*, 2002; (419): 300-304.
- Lin W, Giachello CNG, Baines A. Seizure control through genetic and pharmacological manipulation of Pumilio in *Drosophila*: a key component of neuronal homeostasis, 2017. *Dis Model Mech*, 2017; 10 (2): 141–150 <https://doi.org/10.1242/dmm.027045>.

-Liu S, Wang S, Zou L, Li J., Song C, Chen J. TMC1 is an essential component of a leak channel that modulates tonotopy and excitability of auditory hair cells in mice. *Elifesciences*, 2019; 29; 8. [https:// doi: 10.7554/eLife.47441](https://doi.org/10.7554/eLife.47441).

-Lukashkin AN, Kevin Legan P, Weddell TD. A mouse model for human deafness DFNB22 reveals that hearing impairment is due to a loss of inner hair cell stimulation. *PNAS*, 2012; 109: 47; 19351-19356; <https://doi.org/10.1073/pnas.1210159109>.

-McGuirt WT, Prasad SD, Griffith AJ. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nature Genetics*, 1999; (23): 413-9.

-Mathur P, y Yang J. (2015). Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2015; 1852(3), 406-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.020>.

-McGee JA, Goodyear RJ, McMillan DR, Stauffer EA, Holt JR, Locke KG. The very large G-protein-coupled receptor VLGR1: A component of the ankle link complex required for the normal development of auditory hair bundles. *Journal of Neuroscience*, 2016; 26(24), 6543-6553. [https:// doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0693-06.2006](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0693-06.2006).

-Milloy V, Fournier P, Benoit D, Norena A, Koravand A. Auditory brainstem responses in tinnitus: a review of who, how, and what? *Aging Neurosci*, 2017.9, 237. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00237>.

-Moreno-Pelayo MA, Goodyear RJ, Mencía A, Modamio-Høybjør S, Legan PK, Olavarrieta L. Characterization of a spontaneous, recessive, missense mutation arising in the Tecta gene. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2008; 9, 2; 202-14. <https://doi/10.1007/s10162-008-0116-0>.

-Moseley BD, Dhamija R, Wirrell EC, Nickels KC. Historic, clinical and prognostic features of epileptic encephalopathies caused by CDKL5 mutations. *Pediatr Neurol*, 2012; 46: 101-115.

-Muñoz LJ, Carballosa-Gautam MM, Yanowsky K, García-Atarés N, López DE.

The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: the GASH:Sal. *Epilepsy and Behavior* 2017; 71:181–92. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.03.002>.

-Neyroud N, Tesson F, Denjoy I. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics*, 1999; (15): 186-189.

-Noebels JL, Qiao, Bronson RT, Spencer C, Davisson MT. Stargazer: a new neurological mutant on chromosome 15 in the mouse with prolonged cortical seizures. *Epilepsy Res*, 1990; 7(2):129-135.

-Pangrsic T, Lasarow L, Reuter K, Takago H, Schwander M, Riedel D. Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nat Neurosci*, 2010; (13):869–76.

-Parsa A, Webster P, Kalinec F. Deiters cells tread a narrow path-The Deiters cells-basilar membrane junction. *Hearing Research*, 2012; 290(1-2), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.05.006>.

-Patuzzi R. Ion flow in stria vascularis and the production and regulation of cochlear endolymph and the endolymphatic potential. *Hear. Res*, 2011. 277, 4e19. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.01.010>.

-Penny JE, Brown RD, Hodges KB, Kupetz SA, Glenn DW, Jobe PC Cochlear morphology of the audiogenic-seizure susceptible (AGS) or genetically epilepsy prone rat (GEPR). *Acta Otolaryngol.* 1983, 95 (1e2), 1e12. <https://doi.org/10.3109/00016488309130909>.

-Prieto-Martín AI, Aroca-Aguilar J D, Sánchez-Sánchez F, Muñoz LJ, López DE, Escribano J. Molecular and neurochemical substrates of the audiogenic seizure strains: The GASH:Sal model. *Epilepsy and Behavior*, 2017; 71, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.025>.

-Pujol R, Lenoir M, Rebillard G, Gil-Loyzaga P. Viaje al mundo de la audición, 16 de junio de 2021. <http://www.cochlea.eu/es>.

-Ramzan K, Al-Owain M, Rabab A, Amal B, Gheid A, Khalid Taibahet. Homozygosity mapping identifies a novel GIPC3 mutation causing congenital nonsyndromic hearing loss in a Saudi family. *Gene*, 2013, (521); 1, 195-199.

-Rehman AU, Gul K, Morell RJ, Lee K. Mutations of GIPC3 cause nonsyndromic hearing loss DFNB72 but not DFNB81 that also maps to chromosome 19p. *Hum Genet*, 2011; 130(6): 759–765. doi:10.1007/s00439-011-1018-5.

-Rosenfeld, M.G. POU-domain transcription factors: Pou-er-ful developmental regulators. *Genes*, 1991; (5): 897-907.

-Ross K, Coleman J. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000;24:639– 53. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00029-4).

Roux I, Safieddine, S., Nouvian R, Grati M, Simmler M.C., Bahloul A. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell*, 2006;(127):277–89.

-Sakuma N, Moteki H, Azaiez H, Booth KT, Takahashi M, Arai Y. Novel PTPRQ mutations identified in three congenital hearing loss patients with various types of hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2015. 124:1;184S-92S. <https://doi.org/10.1177/0003489415575041>.

-Salime S, Riahi Z, Elrharchi S, Elkhatabi L, Charoute H, Nahili HA novel mutation in SLITRK6 causes deafness and myopia in a Moroccan family. *Gene*, 2018; 659; 89-92. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.042>.

-Sánchez-Benito D, Hyppolito MA, Alvarez-Morujo AJ, López DE, Gómez-Nieto R. Morphological and molecular correlates of altered hearing sensitivity in the genetically audiogenic seizure-prone hamster GASH/Sal. *Hearing Research*; 2020, 392, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107973>.

-Sánchez-Benito D, Gómez-Nieto R, Hernández-Noriega S, Andrade Batista Murashima A, Cortes de Oliveira J.A. Morphofunctional alterations in the olivocochlear efferent system of the genetic audiogenic seizure-prone hamster

GASH:Sal. *Epilepsy Behav*, 2017; (71):193-206.[https://doi.org/ 10.1016/j.yebeh.2016.05.040](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.05.040).

-Santos-Sacchi J. The speed limit of outer hair cell electromechanical activity. *Hno* 2019, 67(3), 159-164. <https://doi.org/10.1007/s00106-019-0615-9>.

-Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008; 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.

-Schuknecht HF, Watanuki K, Takahashi T, Belal J. Atrophy of the stria vascularis, a common cause for hearing loss. *Laryngoscope*, 1974; 84 (10), 1777e1821. <https://doi.org/10.1288/00005537-197410000-00012>.

-Schulze-bahr E, Wang Q, Wedekind H. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature Genetics*, 1997; 17: 267-268.

-Sharma AD, Klein GJ, Mildtein S. Diagnostic assessment of recurrent syncope. *PACE*, 1984; (7): 749-759.

-Smith CA, Dempsey EW. Electron microscopy of the organ of Corti. *Am J Anat*, 1957; 100(3):337-67. <https://doi.org/10.1002/aja.1001000304>.

-Siddiqi S, Ismail M, Oostrik J, Munawar S, Mansoor A., Kremer H. canonical splice site mutation in GIPC3 causes sensorineural hearing loss in a large Pakistani family. *Journal of Human Genetics*, 2014; 59, 683–686.

-Sirmaci A, Edwards YJK, Akay H, Tekin M. Challenges in Whole Exome Sequencing: An Example from Hereditary Deafness. *PLoS ONE*, 2012; 7(2): e32000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032000>.

-Song L, Santos-Sacchi J. Disparities in voltage-sensor charge and electromotility imply slow chloride-driven state transitions in the solute carrier SLC26a5. *PNAS*, 2013; 110 (10) 3883-3888. [https://doi.org/ 10.1073/pnas.1218341110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218341110).

Takahashi S, Sun W, Zhou Y, Homma K, Kachar B, Cheatham MA, Zheng J. Prestin Contributes to Membrane Compartmentalization and Is Required for

Normal Innervation of Outer Hair Cells. *Front Cell Neurosci*, 2018; 20;12:211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00211>.

-Talebi F, Ghanbari Mardasi F, Mohammadi A, Tizno S, Najafvand Zadeh M. Identification of Novel PTPRQ and MYO1A Mutations in An Iranian Pedigree with Autosomal Recessive Hearing Loss. *Cell J*, 2018; 1, 127–131. <https://doi.org/10.22074/cellj.2018.4805>.

-Taylor RR, Jagger DJ, Forge A. Defining the cellular environment in the organ of corti following extensive hair cell loss: A basis for future sensory cell replacement in the cochlea. *PLoS ONE*, 2012; 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.003057>.

-Tejada J, Costa KM, Bertti P, Garcia-Cairasco N. The epilepsies: complex challenges needing complex solutions. *Epilepsy and Behavior*, 2013; 26(3):212-28. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2012.09.029>.

-Tekin M, Arnos KS, Pandya A. Advances in hereditary deafness. *Lancet*, 2001; (358): 1082-1090.

-Tekin M, Chioza BA, Matsumoto Y, Diaz-Horta O, Cross HE, Duman D. *SLITRK6* mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J Clin Invest*. 2013; 123, 5: 2094-2102. <https://doi.org/10.1172/JCI65853>.

-Terrinoni A, Codispoti A, Serra V, Didona B, Bruno E, Nisticò R, Giustizieri M, Alessandrini M, Campione E, Melino G. Connexin 26 (GJB2) mutations, causing KID Syndrome, are associated with cell death due to calcium gating deregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 16;394(4):909-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.073>.

-Van Luijtelaar EL, Drinkenburg WH, van Rijn CM, Coenen AM. Rat models of genetic absence epilepsy: what do EEG spike-wave discharges tell us about drug effects? *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2002; (24):65-70.

-Vojdani S, Amirjalili S, Milanizadeh S, Molaei F, Ajalloueyane M, Khosravi A. Mutation Screening of KCNQ1 and KCNE1 Genes in Iranian Patients with Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Fetal Pediatr Pathol*, 2019; 38(4):273-

281. <https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1585500>.

-Wang L, Qiao GH, Hu HN, Gao ZN. Discovery of Novel Retigabine Derivatives as Potent KCNQ4 and KCNQ5 Channel Agonists with Improved Specificity. *ACS Med Chem Lett*, 2018; 19;10(1):2733. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00315>.

-Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear Res*, 2002; 165: 1-2;1-9. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(02\)00279-4](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(02)00279-4).

-World Health Organization. World health statistics, 2017: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255336>.

-Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K. The Usher Syndrome, a Human Ciliopathy. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, 2018; 235(3), 273-280. <https://doi.org/10.1055/a-0573-9431>.

-Wu X, Wang S, Chen S, Wen Yy, Liu B, Xie, W. Autosomal Recessive Congenital Sensorineural Hearing Loss due to a Novel Compound Heterozygous PTPRQ Mutation in a Chinese Family. *Neural Plast*, 2018; Art. ID: 9425725. <https://doi.org/10.1155/2018/9425725>.

-Xiang M, Gao WQ, Hasson T, Shin JJ. Requirement for Brn-3c in maturation and survival, but not in fate determination of inner ear hair cells. *Development*, 1998, 125; (20):3935-46.

Yamamoto N, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S, Nishi Y. Prevalence of TECTA mutation in patients with mid-frequency sensorineural hearing loss. *Orphanet J Rare Dis*; 2017; 25: 12(1):157. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0708-z>.

-Yasukawa R, Moteki H, Nishio SY, Ishikawa K, Abe S, Honkura Y. The Prevalence and Clinical Characteristics of TECTA-Associated Autosomal Dominant Hearing Loss. *Genes Basel*, 2019; 10 (10): 744. <https://doi.org/10.3390/genes10100744>.

-Zainal SA, Khairi M, Daud M, Abd Rahman N, Zainuddin Z. Mutation detection in GJB2 gene among Malays with non-syndromic hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2012; 76:8;1175-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2012.04.027>.

-Zhang C, Wang M, Xiao, Y, Zhang F, Zhou Y, Li J. A Novel Nonsense Mutation of POU4F3 Gene Causes Autosomal Dominant Hearing Loss. *Neural Plast*, 2016;1512831. <https://doi.org/10.1155/2016/1512831>.

-Zhao B, Müller U. The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 2015 (3), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.08.006>.

8 –ANEXOS

Anexo 1- APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Nºs 257 y 375.



COMITÉ DE BIOÉTICA (CBE)

Edificio I+D+i
C/ Espejo 2, 37007 Salamanca
Tel. (34) 923 29 44 00 ext 1181
e-mail: cbioetica@usal.es

Informe de Evaluación de Proyectos de Investigación o Docencia (RD 53/013):

Órgano Habilitado: Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Título del Proyecto: Caracterización multidisciplinar del modelo de epilepsia GASH-Sal: Expresión diferencial de GASH-Sal tras estimulación sonora

Número de Registro: 257

Investigador(a) principal: MARIA DOLORES LOPEZ GARCIA

Resultado de la Evaluación: Favorable

La información presentada referente al proyecto reseñado cumple los requisitos del RD 53/13 en cuanto a:

- Los objetivos del proyecto se encuentran justificados desde un punto científico o docente, o legal estando justificado el uso de animales vivos.
- Su diseño procedimental respeta los principios de humanidad con los animales y cuidado del medio ambiente
- Se estima que los posibles beneficios científicos o el valor docente del mismo son adecuados
- Los procedimientos experimentales planteados se encuentran diseñados de conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.
- El proyecto está clasificado según su grado de severidad y tipificación contemplada en la ley.
- Se ha realizado un análisis de daño-beneficio, contemplando el posible beneficio obtenido para la salud humana, animal o el medio ambiente, en función de los objetivos propuestos y el número y gravedad de los procedimientos empleados con los animales, habiendo examinado a su vez las situaciones y excepciones que contempla la ley
- No es necesaria la evaluación retrospectiva del proyecto
- Se ha garantizado la inexistencia de conflicto de intereses en los casos que existieran, con respecto al proyecto evaluado tal como se contempla en los estatutos del comité
- Asesoramiento de expertos externos: NO

Salamanca a 28 de febrero de 2018

Fdo.: Luis Muñoz de la Pascua
Secretario del CBE



Fdo: Jose Julián Calvo Andrés
Presidente del CBE

Informe de Evaluación de Proyectos de Investigación o Docencia (RD 53/013):

Órgano Habilitado: Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca

Título del Proyecto: Búsqueda de nuevos biomarcadores moleculares para detección de la epileptogénesis

Número de Registro: 375

Investigador(a) principal: M^a Dolores López García

Resultado de la Evaluación: Favorable

La información presentada referente al proyecto reseñado cumple los requisitos del RD 53/13 en cuanto a:

- Los objetivos del proyecto se encuentran justificados desde un punto científico o docente, o legal estando justificado el uso de animales vivos.
- Su diseño procedimental respeta los principios de humanidad con los animales y cuidado del medio ambiente
- Se estima que los posibles beneficios científicos o el valor docente del mismo son adecuados
- Los procedimientos experimentales planteados se encuentran diseñados de conformidad con los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento.
- El proyecto está clasificado según su grado de severidad y tipificación contemplada en la ley.
- Se ha realizado un análisis de daño-beneficio, contemplando el posible beneficio obtenido para la salud humana, animal o el medio ambiente, en función de los objetivos propuestos y el número y gravedad de los procedimientos empleados con los animales, habiendo examinado a su vez las situaciones y excepciones que contempla la ley
- No es necesaria la evaluación retrospectiva del proyecto
- Se ha garantizado la inexistencia de conflicto de intereses en los casos que existieran, con respecto al proyecto evaluado tal como se contempla en los estatutos del comité
- Asesoramiento de expertos externos: NO

Salamanca a 22 de marzo de 2019



Fdo.: Luis Muñoz de la Pascua
Secretario del CBE



Fdo: Jose Julián Calvo Andrés
Presidente del CBE