

Tesis Doctoral

Modulación de la actividad de las células ciliadas del órgano de Corti por el sistema eferente olivococlear

Ballestero, Jimena A.

2011

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

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

Cita tipo APA:

Ballestero, Jimena A.. (2011). Modulación de la actividad de las células ciliadas del órgano de Corti por el sistema eferente olivococlear. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ballestero, Jimena A.. "Modulación de la actividad de las células ciliadas del órgano de Corti por el sistema eferente olivococlear". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Modulación de la actividad de las células ciliadas del órgano de Corti por el sistema eferente olivococlear.

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

Autor: Lic. Jimena A. Balletero
Director de Tesis: Dra. Eleonora Katz
Consejero de Estudios: Dra. Lidia Szczupak
Lugar de trabajo: Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

Buenos Aires, Junio 2011

Parte de los datos presentados en esta tesis fueron publicados en:

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

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

Taranda J, **Ballesterio JA**, Hiel H, de Souza FS, Wedemeyer C, Gomez-Casati ME, Lipovsek M, Vetter DE, Fuchs PA, Katz E, Elgoyhen AB (2009b) Constitutive expression of the alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit fails to maintain cholinergic responses in inner hair cells after the onset of hearing. *J Assoc Res Otolaryngol* 10:397-406.

Agradecimientos

Al INGEBI y a todos los que allí colaboran para hacer del instituto un mejor lugar de trabajo.

Al CONICET y la Agencia por financiar mis años de doctorado.

A la FCEyN por su excelente formación, sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

A Eleo y a Belén por todos estos años de aprendizaje. Por permitirme formar parte de la historia de su laboratorio, por todas las oportunidades que me brindaron en mi crecimiento profesional, pero también por su apoyo personal, cariño y confianza en mí. Gracias totales!!

A Javi, un verdadero compañero. No podría haber tenido el lujo de un mejor compañero de batalla. Gracias por tu optimismo y entusiasmo contagioso. Porque las tardes de setup no hubieran sido lo mismo sin los mates, las charlas y las melbas de emergencia.

A Ceci y Marce, saben que fueron indispensables en estos años y que este doctorado no hubiera sido posible sin ustedes.

A Caro por estar siempre ahí para lo que se necesite, ayuda técnica, discusión de trabajo o simplemente una oreja. Sos una excelente compañera y una gran persona.

A Guchi, un grande, gracias por nunca haber superado la etapa del por qué. Es un orgullo haber compartido aunque sea un par de años de laburo con vos, pero principalmente es un orgullo que ya hasta te entiendo lo que me decís.

A Vivi, por curarme de la alergia a las pipetas y la buena onda de todos los días.

A Leo y Clau, nuestros flautistas de Hamelin personales. Un millón de gracias por su ayuda y buena onda todos estos años.

A Dani, por acompañarme en todos estos años de doctorado, por todas los consejos de ciencia, gastronomía y arte, pero principalmente, gracias por la receta de la masa tarta.

A Dieguito, Tete y Sabi, por las conversaciones de pasillo en el momento justo que te salvan la vida.

A los viejos nuevos, Maru, traté de cuidar el rancho, bienvenida de vuelta. Te dejo una pesada herencia.

A los nuevos viejos, Juancito, Javi, Andreita, Flor y Fran. Mil gracias por su paciencia con esta pobre anciana, los últimos años de doctorados no son fáciles, ya lo verán. La mejor de las suertes para todos ustedes.

A los nuevos nuevos, Facu y Marcelito: Pilas!!! Qué somos???!!!

A mi familia, gracias por su apoyo incondicional, los esfuerzos infinitos por entender (espero que ya sepan qué es la cóclea!) y por estar siempre ahí cuando los necesité. Y abue, gracias por la poderosa Vaio que dio hasta su último suspiro en la línea del deber.

A Lau, Pao y Pau, gracias por ser mi cable a tierra, por las noches de chicas y los intentos de hacerme incursionar en el mucho del folclore.

A Lea, no sólo por acompañarme todos estos años desde casa, bancando estoicamente las crisis, los días largos de trabajo y los fines de semana trancos, sino también por haberme puesto el hombro y haber hecho de remis, servicio técnico y consultor on-line. No podría haber hecho esto sin vos.

Índice

ÍNDICE	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	35
CAPÍTULO I	
PARTICIPACIÓN DE LA SUBUNIDAD $\alpha 10$ EN LA SINAPSIS ENTRE LAS FIBRAS DEL SISTEMA MOC Y LAS CÉLULAS CILIADAS DE LA CÓCLEA.	
	36
<i>Introducción</i>	37
<i>Resultados</i>	38
<i>Discusión</i>	51
CAPÍTULO II	
PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA SINAPSIS ENTRE LAS FIBRAS DEL SISTEMA MOC Y LAS CCEs.	
	54
<i>Introducción</i>	55
<i>Resultados</i>	56
<i>Discusión</i>	70
CAPÍTULO III	
EFECTO DE UNA MUTACIÓN PUNTUAL EN EL nAChR $\alpha 9\alpha 10$ EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA SINAPSIS ENTRE LAS FIBRAS DEL SISTEMA MOC Y LAS CÉLULAS CILIADAS DE LA CÓCLEA.	
	75
<i>Introducción</i>	76
<i>Resultados</i>	77
<i>Discusión</i>	87
CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	96

Resumen

Modulación de la actividad de las células ciliadas del órgano de Corti por el sistema eferente olivococlear.

En el órgano de Corti, el epitelio sensorial del sistema auditivo de los mamíferos, las células ciliadas internas (CCIs) transducen los estímulos sonoros a señales eléctricas que son enviadas al sistema nervioso central, mientras que las células ciliadas externas (CCEs) participan del proceso de amplificación y sintonización fina de estos estímulos. La actividad de las CCEs es modulada por una inervación eferente que proviene del tallo cerebral, el sistema olivococlear medial (MOC). Durante el desarrollo, previo al comienzo de la audición, estas fibras eferentes hacen contactos transitorios con las CCIs. En ambos casos, la sinapsis entre las fibras MOC y las células ciliadas es colinérgica, rápida e inhibitoria y está mediada por la activación conjunta del receptor colinérgico nicotínico ($\alpha 9\alpha 10$) y el canal de potasio SK2. La inervación transitoria a las CCI desaparece completamente luego del comienzo de la audición, así como la expresión de la subunidad $\alpha 10$ y la del canal SK2. En el presente trabajo se estudiaron las características moleculares y funcionales de la sinapsis entre estas fibras MOC y las células ciliadas de la cóclea. Para esto se realizaron registros electrofisiológicos en las CCIs y CCEs presentes en preparaciones del órgano de Corti del ratón en distintos periodos postnatales.

En primer lugar, se estudió el rol de la subunidad $\alpha 10$ en las respuestas colinérgicas de las células ciliadas. Se realizó la caracterización biofísica, farmacológica y funcional de estas corrientes en ratones modificados genéticamente que carecían de la subunidad $\alpha 10$ o que la expresaban en forma constitutiva. Se demostró que la subunidad $\alpha 10$ es necesaria para la expresión de las respuestas colinérgicas normales tanto antes como después del comienzo de la audición. Se demostró también que la expresión constitutiva de esta subunidad no es suficiente para mantener las respuestas colinérgicas en las CCIs luego del comienzo de la audición. Estos resultados indican que en este período del desarrollo postnatal, existirían factores que regulan negativamente la expresión funcional del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en las CCIs.

Por otro lado, se estudiaron las propiedades de la transmisión sináptica entre las fibras MOC y las CCEs mediante la estimulación eléctrica de estas fibras eferentes. Se demostró que la eficacia de la sinapsis MOC-CCEs es muy baja a frecuencias bajas de estimulación (1 Hz) pero que la tasa de respuestas aumenta significativamente al aumentar la frecuencia de estimulación (50-100Hz) debido a la acción conjunta de los procesos de facilitación presináptica y sumación de las corrientes postsinápticas. Esta característica de la sinapsis MOC-CCEs es consistente con la dependencia que presentan las respuestas a nivel del nervio auditivo con la frecuencia de activación del sistema eferente MOC y sugiere que la dinámica de esta sinapsis modula la magnitud del efecto inhibitorio producido por este sistema. Esta hipótesis es sustentada, además, por los resultados obtenidos en ratones que poseen una mutación puntual (L9'T) en la subunidad $\alpha 9$ que le confiere al nAChR $\alpha 9\alpha 10$ una ganancia de función, a saber, tiene una afinidad aparente mayor por la acetilcolina y un tiempo de actividad más prolongado. Consistentemente, la cinética de las respuestas sinápticas producidas por estimulación de alta frecuencia en la sinapsis MOC-CCIs de los ratones L9'T resultó significativamente más lenta que la de los ratones salvajes y esto se correlaciona con el cambio en la cinética de inhibición de la función coclear ante la activación del sistema eferente observado *in vivo* en estos animales.

Palabras clave: cóclea, células ciliadas, receptores nicotínicos, inervación olivococlear, plasticidad sináptica de corto término.

Abstract

Modulation of the activity of the hair cells of the organ of Corti by the olivocochlear efferent system.

In the Organ of Corti, the sensory epithelia of the of the mammalian auditory system, inner hair cells (IHCs) transduce sound stimuli into electrical signals that are conveyed to the central nervous system, while outer hair cells (OHCs) participate in the amplification and fine tuning of these stimuli. OHC's activity is modulated by an efferent innervation that projects from the brainstem, the medial olivocochlear system (MOC). During development, before the onset of hearing, these efferent fibers make transient contacts with the IHCs. In both cases the synapse between the MOC fibers and the hair cells is cholinergic, fast and inhibitory and is mediated by the combined activation of the $\alpha 9\alpha 10$ cholinergic nicotinic receptor (nAChR) and the SK2 potassium channel. The transient innervation to the IHCs completely disappears after the onset of hearing, as does the expression of the $\alpha 10$ subunit and the SK2 channel. In the present work we studied the functional and molecular characteristics of the synapse between the MOC fibers and the hair cells. To accomplish this, electrophysiological recordings were carried out in IHCs and OHCs present in acutely isolated organs of Corti from mice at different postnatal ages.

First, we studied the role of the $\alpha 10$ subunit in the hair cell's cholinergic responses. A biophysical, pharmacological and functional characterization of these currents was carried out in genetically modified mice that either lacked the $\alpha 10$ subunit or expressed it constitutively. It was demonstrated that the $\alpha 10$ subunit is necessary for the expression of normal cholinergic currents both before and after the onset of hearing. It was also shown that the constitutive expression of this subunit is not sufficient to maintain cholinergic responses in IHCs after the onset of hearing. These results indicate that in this period of postnatal development, there might be factors that down-regulate the functional expression of the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR in the IHCs.

In addition, the properties of synaptic transmission between the MOC fibers and the OHCs were studied by electrical stimulation of the efferent fibers. It was demonstrated that the synaptic efficacy of the MOC-OHC synapse is very low at low stimulation frequencies (1 Hz) but that the response rate increases significantly when the stimulation frequency is increased (50-100 Hz), due to the combined effect of presynaptic facilitation and summation of the postsynaptic currents. This characteristic of the MOC-OHC synapse is consistent with the dependence of the auditory nerve responses with the frequency of activation of the MOC efferent system and suggests that the dynamics of this synapse modulates the magnitude of the inhibitory effect exerted by this system. This hypothesis is further supported by the results obtained using mice that bear a point mutation in the $\alpha 9$ subunit (L9'T) that confers a gain of function to the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR, namely, an increased affinity for acetylcholine and a longer period of activity. Consistently, the kinetics of the synaptic responses evoked by high frequency stimulation at the MOC-IHC synapse in the L9'T mice was significantly slower than that of the wild type mice. This is in agreement with the change in the kinetics of cochlear function inhibition by the efferent system observed *in-vivo*.

Key words: *cochlea, hair cell, nicotinic receptor, olivocochlear innervation, short-term synaptic plasticity.*

Abreviaturas

A : amperios

ACh: acetilcolina

ADN: ácido deoxirribonucleico

BAPTA: ácido 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N, N, N', N', -tetraacético

BK: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia grande

Ca²⁺ : ion calcio

CCDV : canales de calcio activados por voltaje

CCs : células ciliadas

CCEs: células ciliadas externas

CCIs: células ciliadas internas

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

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

Cm: capacitancia de la membrana

E_{rev}: potencial de reversión

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

FI: índice de facilitación

fX: femto (X * 10⁻¹⁵)

I: corriente

Ibx : iberiotoxina

IPSCs : corrientes sinápticas inhibitorias (prefijo e: evocadas; s: espontáneas)

IPSPs : potenciales sinápticos inhibitorios (prefijo e: evocadas; s: espontáneas)

I-V: corriente en función del potencial

ICS : ICS 205,930 o tropisetron

ISI: intervalo entre estímulos

Hz: hertz

K⁺: ion potasio

KO: 'knock out' mutante nulo

l : litro

m: contenido cuántico

m: metro

M: molar (moles/litro)

μX : micro ($X * 10^{-6}$)

mX: mili ($X * 10^{-3}$)

MX: mega ($X * 10^6$)

min: minutos

Mg^{2+} = ion magnesio

MOC: medial olivococlear

nX: nano ($X * 10^{-9}$)

nAChR: receptor colinérgico nicotínico

OE = 'overexpressor', sobreexpresante

Ω : ohm

P: probabilidad

PX: X días postnatal

pX: pico ($X * 10^{-12}$)

RyR: receptor de rianodina

s: segundos

S.E.M.: error estándar de la media

S.D.: desvío estándar

SK2: canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña

SNC: sistema nervioso central

T: temperatura

TTX : tetrodotoxina

V: voltaje

V_m: potencial de membrana

V_{sostén} ó V_s: potencial de sostén

Introducción

Introducción

Características generales del sistema auditivo periférico

La función principal del sistema auditivo periférico es convertir las vibraciones complejas presentes en el aire en sus componentes de frecuencias fundamentales, extrayendo información no sólo sobre la frecuencia sino también sobre la intensidad y estructura temporal y finalmente, comunicándola al sistema nervioso central (SNC).

El sistema auditivo de los mamíferos es el más desarrollado de los vertebrados, lo que se refleja en el amplio rango de frecuencias que pueden detectar (un rango típico en mamíferos es de 10 octavas) y su capacidad para diferenciar entre frecuencias (el oído humano puede detectar diferencias menores al 0.2%). Asimismo, el oído de los mamíferos es capaz de percibir sonidos muy leves, cuya energía está en el orden del ruido térmico al que están expuestos los receptores, y asimismo puede discriminar sonidos de gran intensidad, es decir, posee un amplio rango dinámico (Dallos, 1996).

Transducción auditiva

El primer paso en la transducción auditiva es la conversión de las oscilaciones de presión en el aire en oscilaciones de fluido que puedan ser percibidas por los receptores que se encuentran en el epitelio sensorial. En los mamíferos, las ondas sonoras impactan sobre la membrana timpánica, y son los tres huesecillos del oído medio (martillo, estribo y yunque) los encargados de transmitir el movimiento de esta membrana a una segunda membrana, ubicada en la ventana redonda, que conecta con los fluidos del oído interno donde se encuentran el sistema auditivo y el vestibular (Fig. 1A).

La cóclea, el órgano auditivo del oído interno (Fig. 1A), es una estructura ósea cerrada en forma de caracol que posee tres compartimentos llenos de fluido: la escala vestibular, la escala timpánica y la escala media (Fig. 1B-C). La escala timpánica y vestibular se conectan en el extremo apical de la cóclea y se encuentran llenos de perilinfa, una solución cuya composición es similar al medio extracelular. La escala media se encuentra aislada y posee una solución rica en potasio (157 mM) llamada *endolinfa*. Dada la composición iónica de la endolinfa, esta presenta una diferencia de potencial de +80 mV respecto al resto de las escalas. A este potencial se lo conoce como *potencial endococlear*. La escala timpánica y la escala media se encuentran separadas por la *membrana basilar*, sobre la cual se encuentra emplazado el *Órgano de Corti*.

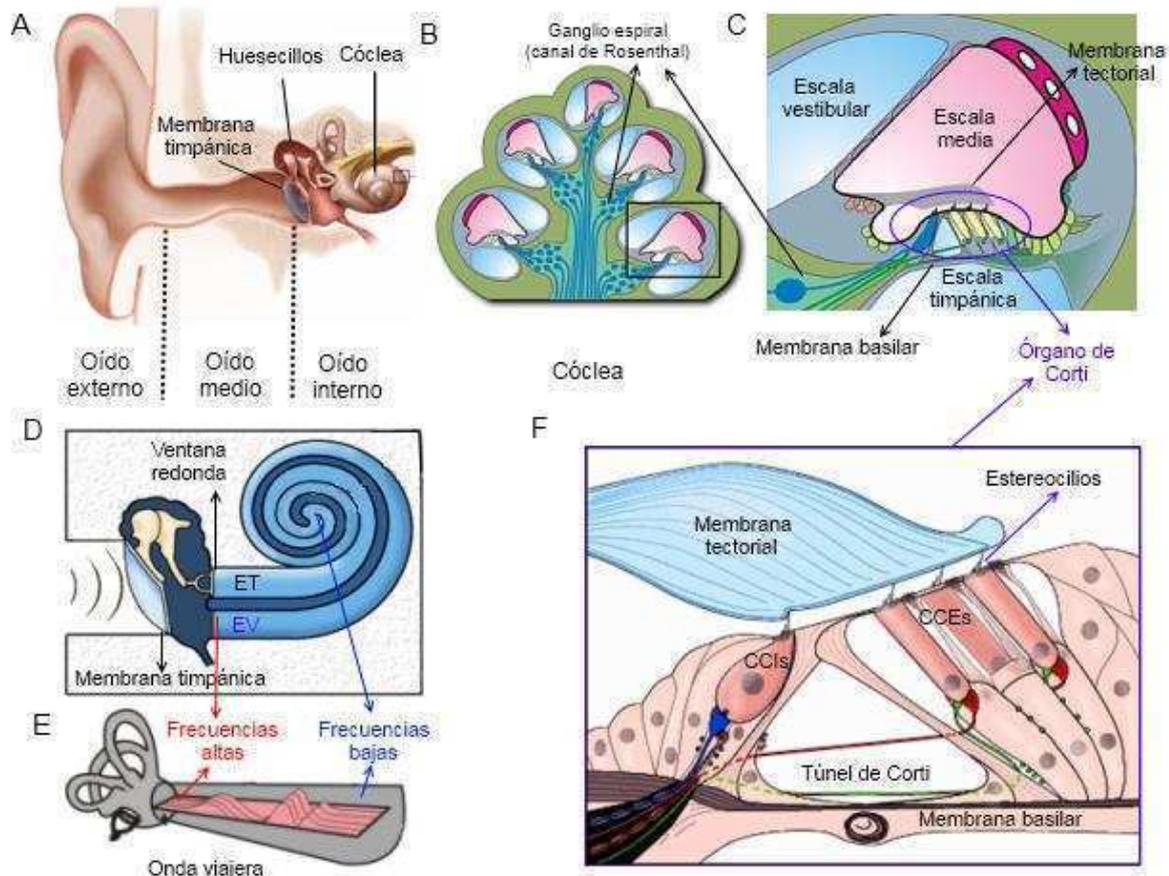


Figura 1. **Estructura anatómica del oído.** En A se observa la estructura general del oído compuesto por el oído externo, medio e interno. El sonido ingresa por el oído externo, impacta en la membrana timpánica y este movimiento es transmitido por los huesecillos del oído medio hacia la cóclea en el oído interno. En B y C se muestra un corte transversal de la cóclea en el que pueden observarse los tres compartimentos cocleares y la localización del órgano de Corti. En D se esquematiza la transmisión del estímulo sonoro entre el oído medio y el oído interno a través de la ventana redonda. En E se muestra cómo el movimiento transmitido por los huesecillos a la ventana redonda se transforma en la onda viajera de la membrana basilar. En D y E se indica la zona de la membrana basilar donde se decodifican las frecuencias altas y las bajas. F, detalle de la estructura del órgano de Corti. En el mismo se pueden observar las células ciliadas internas (CCIs), los fonoreceptores propiamente dichos, y las células ciliadas externas, los amplificadores.

El Órgano de Corti es el epitelio neurosensorial del oído y posee las células sensoriales auditivas: las células ciliadas. Las células ciliadas poseen su zona basal apoyada sobre células de soporte que a su vez se apoyan sobre la membrana basilar, mientras que su extremo apical se encuentra expuesto hacia la escala media, inmerso en la endolinfa (Fig. 1C y F). Las células ciliadas poseen en la zona apical un haz de prolongaciones que, contrario a lo que indica su nombre, no son verdaderos cilios sino que están formadas por filamentos de actina, y son llamadas *estereocilios* (Fig. 2). Los estereocilios se encuentran unidos entre sí por diversos complejos proteicos, el más apical de los cuales se denomina *Tip Link* (Vollrath et al., 2007). Recubriendo los estereocilios se encuentra una membrana acelular llamada *membrana tectorial* (Fig. 1E).

La ventana redonda conecta directamente con la escala timpánica (Fig. 1D). Las ondas de presión generadas en el fluido de la escala timpánica por el movimiento de la ventana redonda son convertidas en una onda de movimiento transversal que se desplaza a lo largo de la membrana basilar llamada *onda viajera* (Fig. 1F) (Von Bekesy, 1956). Este movimiento de la membrana basilar produce una deflexión de los haces de estereocilios que resulta en la apertura de canales mecanotransductores ubicados en los mismos. Se propone que la tensión generada en el *Tip link* es el responsable de producir la apertura del mecanotransductor (Vollrath et al., 2007) (Fig. 2). Si bien la identidad molecular de los canales mecanotransductores es aún desconocida, se ha comprobado que se trata de un canal catiónico inespecífico de alta conductancia (~ 100 pS), muy permeable al Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 5$) y cuya velocidad de apertura es la más rápida medida en un canal iónico (constantes de activación en el orden de μs egundos) (Fettiplace, 2009). Dada la composición de la endolinfa, la apertura de los canales mecanotransductores produce una entrada masiva de K^+ que genera una rápida despolarización en las células ciliadas.

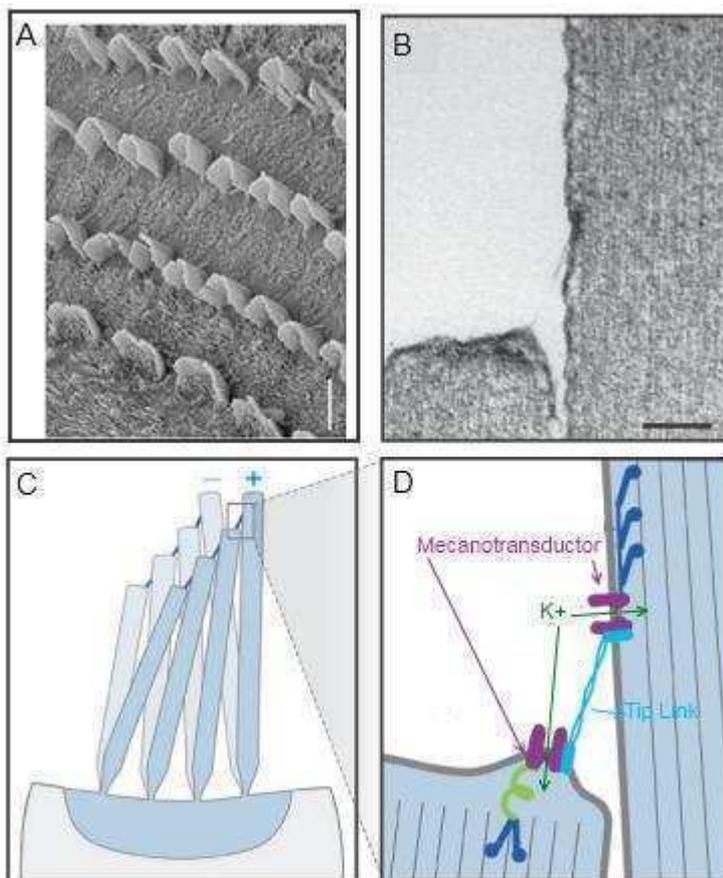


Figura 2. El **mecanotransductor**. A, microscopía electrónica mostrando los haces de estereocilios de las CCI (1 hilera, abajo hacia la izquierda) y los de las CCEs (3 hileras). En B se muestra una ampliación de dos estereocilios unidos por el *tip link* (escala = $0.1 \mu\text{M}$). En C se muestra un esquema del movimiento de los estereocilios durante la transducción del sonido. En D se muestra un modelo esquemático de las moléculas involucradas en la transducción sonora. Durante el movimiento de los estereocilios, aumenta la tensión en el *tip link* lo que promueve la apertura de los canales mecanotransductores permitiendo el ingreso de potasio desde la endolinfa y generando así un cambio de voltaje o potencial receptor en la célula ciliada. (Adaptado de Vollrath et al., 2007).

En los mamíferos existen dos tipos de células sensoriales: las células ciliadas internas (CCIs) y las células ciliadas externas (CCEs) (Fig. 1). Las CCIs son los fonoreceptores propiamente dichos. Estas células poseen en la zona basal una maquinaria de liberación sináptica muy desarrollada y como consecuencia de la despolarización producida por el movimiento de los estereocilios (potencial

receptor) liberan glutamato, activando así a los receptores para este neurotransmisor presentes en las dendritas de las neuronas aferentes que las inervan. Estas son las neuronas cuyo axones conforman el nervio auditivo, el cual lleva las señales hacia el SNC (Fuchs et al., 2003).

La membrana basilar es una estructura compuesta por fibras de colágeno cuya forma y rigidez varía a lo largo de la longitud de la cóclea. Como consecuencia de las propiedades estructurales de esta membrana el sitio de máxima oscilación de la onda viajera a lo largo de la cóclea dependerá de la frecuencia del estímulo que llega a la ventana redonda. De esta manera los estímulos de mayor frecuencia producen desplazamientos máximos en la zona basal y los estímulos de menor frecuencia lo hacen en la zona apical (Von Bekesy, 1956) (Fig. 1D-E). Este fenómeno es la base del mecanismo por el cual el oído interno es capaz de realizar un análisis de frecuencia de los sonidos, ya que las frecuencias detectadas por cada CCI queda determinada por su posición longitudinal en la cóclea.

El amplificador coclear

Si bien existe consenso en que las propiedades mecánicas de la membrana basilar determinan la capacidad del oído de analizar las frecuencias componentes de un sonido, el grado de discriminación de las frecuencias (sintonización fina) que se logra mediante este mecanismo es menor al que se observa fisiológicamente (Robles y Ruggero, 2001). Esto se debe a la amortiguación de la propagación del movimiento de la membrana basilar que impone el fluido coclear. Este efecto de amortiguación es contrarrestado por un mecanismo dependiente de energía que retroalimenta positivamente el movimiento de la membrana basilar. Este mecanismo fue llamado en forma genérica *amplificador coclear* (Davis, 1983). Tanto la existencia del amplificador coclear como su contribución a la sintonización fina de la frecuencia óptima en cada sitio de la membrana basilar han sido extensamente demostradas experimentalmente. A su vez, se encontró que la magnitud de la amplificación de los sonidos presenta una relación no lineal con la intensidad del estímulo, de manera que los sonidos de baja intensidad son amplificados en mayor magnitud que los de alta intensidad (Rhode, 1971; Sellick et al., 1982; Robles et al., 1986; Robles y Ruggero, 2001; Ashmore, 2008). Esta característica explica la gran amplitud en el rango dinámico de la audición. Otra consecuencia de la existencia de una retroalimentación positiva es la generación espontánea de movimiento de la membrana basilar. Estos movimientos espontáneos pueden ser medidos como sonidos en el canal auditivo. Estos sonidos son llamados *emisiones otoacústicas* (Kemp, 1978). Todos estos fenómenos dependen de la integridad de las CCEs (Ryan y Dallos, 1975; Evans y Harrison, 1976; Dallos y Harris, 1978), por lo tanto se considera que estas células conforman el amplificador coclear.

Existe actualmente un gran debate respecto de cuál es la base molecular del amplificador coclear en los mamíferos. Uno de los mecanismos propuestos se basa en una propiedad particular de las CCEs de los mamíferos llamada *electromotilidad*, descrita por primera vez en 1985 (Brownell et al., 1985). Esta propiedad implica que las CCEs son capaces de cambiar su forma en respuesta a cambios en su potencial de membrana y que resulta en un movimiento en el eje vertical de las células (una hiperpolarización resulta en una elongación de las CCEs mientras que una despolarización resulta en un acortamiento, Fig. 3). Los estereocilios de las CCEs, a diferencia de los de las CCI, se encuentran adheridos a la membrana tectorial, de modo que los movimientos de estas células son transmitidos a la membrana basilar. El modelo de funcionamiento del amplificador coclear basado en la electromotilidad es que cuando las CCEs cambian su potencial de membrana en respuesta a los estímulos sonoros se produce, en fase con el estímulo, un movimiento de las CCEs que amplifica mecánicamente el movimiento de la membrana basilar, aumentando así la señal detectada por las CCI (Ashmore, 1987). Estudios posteriores identificaron a la *prestina*, como la proteína responsable de acoplar los cambios en el potencial de membrana de la célula con los cambios en la forma de las mismas (Zheng et al., 2000). La *prestina* es una proteína de la familia de los transportadores de sulfato que se encuentra muy enriquecida en la membrana lateral de las CCEs. Esta proteína es capaz de cambiar su conformación en respuesta a cambios en el potencial de membrana, aumentando o disminuyendo el área que ocupa. La alta densidad que presenta esta molécula en la membrana (Yu et al., 2006) hace que los cambios de área observados macroscópicamente en las CCEs no afecten el volumen celular (Fig. 3).

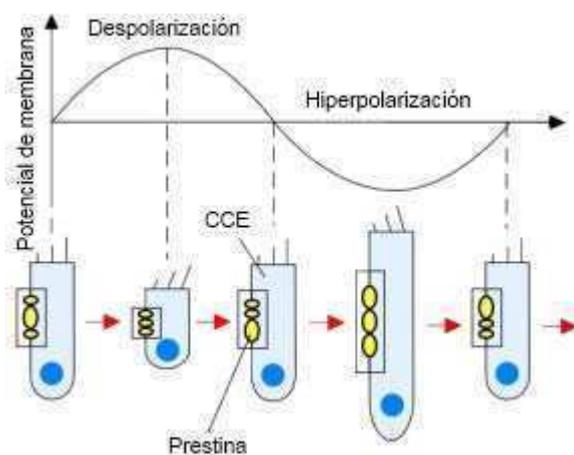


Figura 3. **La electromotilidad.** Esquema que muestra los cambios en la longitud de las CCEs producidos por los cambios conformacionales de la proteína *prestina*. Estos cambios en la *prestina* se producen debido a los cambios en el potencial de membrana de las CCEs al moverse los cilios.

La existencia de un mecanismo activo de amplificación coclear no es exclusiva de los mamíferos, sino que se ha evidenciado en diversos vertebrados no mamíferos, a pesar de que estos últimos no presentan motilidad somática (Manley, 2000). En estas especies se ha demostrado que los mismos estereocilios son capaces de generar fuerza que no sólo retroalimenta mecánicamente la entrada auditiva, sino que produce movimientos espontáneos (Crawford y Fettiplace, 1985). La generación

de fuerzas por parte de los estereocilios se basa en la interacción entre los cambios de tensión del *Tip-link* y la apertura de los canales mecanotransductores (Vollrath et al., 2007). Según este modelo, cada vez que se abre un canal mecanotransductor se produce la relajación de la tensión en un *Tip-link*, lo que implica un aumento en la tensión detectada por el resto de los *Tip-Links* y que genera a su vez la apertura de más canales mecanotransductores (Hudspeth, 2008). Esta reacción en cadena amplificaría el efecto inicial de la deflexión de los estereocilios. Estudios tanto teóricos como experimentales sugieren que este mecanismo de amplificación permite explicar todas las características previamente descritas del amplificador coclear. Aunque este fenómeno fue descrito inicialmente en vertebrados no mamíferos, estudios recientes demuestran que se encuentra conservado en mamíferos y contribuye a la amplificación del sonido (Kennedy et al., 2005).

Si bien el campo de la audición estuvo dividido durante años entre estos dos mecanismos de amplificación, dada la abundante evidencia experimental favoreciendo ambos mecanismos, en los últimos años se han propuesto mecanismos mixtos en los que tanto la electromotilidad como la fuerza generada por los estereocilios contribuyen a la amplificación (Ashmore et al., 2010). Uno de los modelos de funcionamiento que presenta actualmente mayor consenso, plantea la posibilidad de que los estereocilios actúen como pre-filtros, determinando la sintonización de los receptores, mientras que la electromotilidad somática sería la principal responsable de la amplificación (Dallos et al., 2008; Hudspeth, 2008; Maoileidigh y Julicher, 2010).

Innervación del Órgano de Corti

La división de funciones que presentan los dos tipos de células ciliadas presentes en los mamíferos, se encuentra acompañada por patrones de innervación bien diferenciados (Fig. 4).

Innervación aferente: codificación de estructura temporal e intensidad

Las CCI, conforme con su función de receptor sonoro propiamente dicho, se encuentran innervadas exclusivamente por terminales aferentes que conforman las fibras del nervio auditivo (Fig. 4A y B). Cada fibra aferente contacta una única CCI y cada CCI está innervada por 5 a 30 fibras aferentes. Las fibras aferentes que inervan a una misma CCI, responden en forma máxima a una frecuencia específica (Galambos y Davis, 1943; Kiang et al., 1962), de acuerdo con su posición tonotópica (Lieberman, 1982). Como se mencionó anteriormente, por su naturaleza los estímulos sonoros presentan variaciones temporales muy rápidas y parte de las adaptaciones que poseen las células ciliadas, que permiten la codificación de dichos estímulos, es la velocidad de la cinética de los mecanotransductores. Sorprendentemente, se ha demostrado que también las fibras aferentes son

capaces de seguir las respuestas de las CCI en fase con el estímulo hasta frecuencias de 5 kHz (Matthews y Fuchs, 2010). Esto implica que las CCI deben poseer la capacidad de liberar neurotransmisor a las dendritas aferentes en forma extremadamente rápida. Esta capacidad se la confiere una estructura particular llamada *sinapsis en cinta* (Fig. 4B) que consiste en una estructura proteica a la que se adosan numerosas vesículas sinápticas. Esta estructura se encuentra en diversas células sensoriales que comparten la función de regular la liberación en forma graduada, a saber, los fotorreceptores, las células bipolares de la retina, los electroreceptores y las células ciliadas del sistema vestibular y de la línea lateral (Matthews y Fuchs, 2010). Se ha demostrado en diversos modelos animales que su integridad es fundamental para sostener una alta velocidad de liberación (Matthews y Fuchs, 2010). Mediante esta sinapsis especializada, las fibras auditivas son capaces de mantener la estructura temporal de los estímulos, lo que permite al SNC llevar a cabo tareas tan diversas como la localización del origen espacial de los estímulos o la comprensión del lenguaje. Las distintas fibras aferentes que inervan una misma CCI también difieren en su umbral de respuesta, de manera que algunas son activadas con intensidades de estímulo muy bajas y saturan rápidamente, mientras que otras son activadas a mayores intensidades (Liberman y Kiang, 1978; Winter et al., 1990). Esto indica que existe un mecanismo de codificación según el cual una mayor intensidad de estímulo estaría asociada a un mayor reclutamiento de fibras aferentes por CCI (Meyer y Moser, 2010). Diversos estudios sugieren que estas diferencias de sensibilidad se encuentran determinadas presinápticamente por diferencias en la estructura de la *sinapsis en cinta* (Merchan-Perez y Liberman, 1996) y por la cantidad de canales de calcio asociados a la misma (Frank et al., 2009).

Innervación eferente a las CCEs: control del amplificador coclear

Las CCEs, cuya función principal es la de amplificar los movimientos de la membrana basilar, si bien reciben una innervación aferente de tipo II (Weisz et al., 2009) están mayoritariamente inervadas por fibras eferentes (Fig. 4A). Los cuerpos neuronales de estas fibras eferentes se encuentran en la región media de la oliva superior en el tallo encefálico y son por tanto llamadas fibras mediales olivococleares (MOC) (Warr y Guinan, 1979). Desde este sitio las neuronas MOC envían fibras que se denominan no-cruzadas o cruzadas según si cruzan o no el tallo cerebral a la altura del cuarto ventrículo inervando la cóclea ipsilateral o contralateral. A su vez, un subgrupo de estas neuronas envía fibras colaterales hacia el núcleo coclear (Brown et al., 1991). Las fibras MOC se encuentran recubiertas de mielina en la mayor parte de su trayecto hacia la cóclea (primero formando parte del nervio vestibular y luego del nervio auditivo), pero pierden esta mielinización dentro de la cóclea a la altura del canal de Rosenthal (Fig. 1BC) (Raphael y Altschuler, 2003). Estas fibras pueden sufrir

ramificaciones en distintos puntos de su recorrido dentro de la cóclea (a la altura del ganglio espiral, de las IHC y del túnel de Corti), de manera que una única fibra puede inervar numerosas CCEs (Warr y Boche, 2003). Este grado de ramificación es variable según las especies. Por ejemplo, en la rata se encontraron fibras MOC únicas con contactos en 80 CCEs (Warr y Boche, 2003) mientras que en los ratones el número más alto encontrado fue de 9, debido al bajo grado de ramificación de fibras MOC en esta especie (Wilson et al., 1991).

La innervación eferente de las células ciliadas no es exclusiva de los mamíferos, sino que es común a todos los vertebrados. Esto se cumple no sólo en las células ciliadas del epitelio auditivo sino también en otros órganos sensoriales que poseen células ciliadas como receptores sensoriales, a saber, el aparato vestibular y la línea lateral en peces y anfibios (Manley y Koppl, 1998; Simmons, 2002).

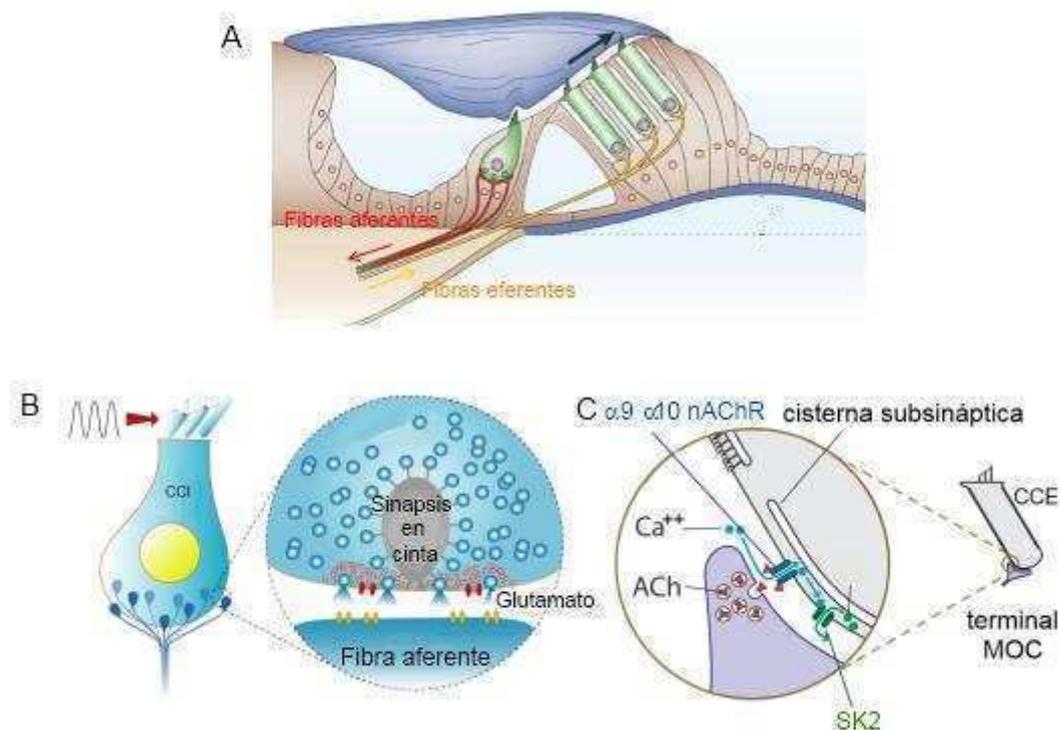


Figura 4. **Inervación de las células ciliadas.** A. Patrón de innervación de las CCI y las CCEs. Las CCI están inervadas por un gran número de fibras aferentes que conforman el nervio auditivo (rojo), las CCEs, en cambio, se encuentran inervadas principalmente por fibras eferentes del sistema MOC (amarillo). En B se muestran las especializaciones sinápticas de la sinapsis entre las CCI y las dendritas de las neuronas aferentes, llamada 'Ribbon synapse' o sinapsis en cinta. En C se muestra un esquema de las especializaciones de los contactos sinápticos entre las fibras MOC y las CCEs. En la misma se muestra la ubicación sináptica del nAChR $\alpha 9 \alpha 10$ y del canal SK2 y se indican también las cisternas subsinápticas.

Función del sistema MOC

Los primeros indicios respecto a la función que cumple esta inervación eferente en la función auditiva provienen de experimentos en los cuales se activan eléctricamente las fibras MOC mientras se monitorea la respuesta del nervio auditivo a estímulos sonoros. De esta manera se demostró que existe una disminución en la respuesta del nervio auditivo producido por la activación de las fibras MOC (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970). Es decir que el sistema MOC ejerce un control inhibitorio de la respuesta auditiva codificada por la cóclea. Estudios posteriores demostraron que esta inhibición de la respuesta aferente producida por las fibras MOC se encuentra a su vez asociada a una disminución del potencial receptor de las CCI (Brown y Nuttall, 1984), en el movimiento de la membrana basilar (Cooper y Guinan, 2006) y en la magnitud de las emisiones otoacústicas (Mountain, 1980; Siegel y Kim, 1982). Todos estos resultados indican que la activación de las fibras MOC resulta en una inhibición del efecto amplificador de las CCEs reduciendo así la ganancia de la cóclea.

Control periférico del amplificador coclear: el reflejo MOC

Las fibras MOC son la instancia final de diversos circuitos reflejos del sistema auditivo que provienen tanto de la periferia como del SNC. Las conexiones provenientes de la periferia son las que componen el llamado *Reflejo MOC* (Fig. 5). Este reflejo se inicia con la llegada de un estímulo sonoro y la consecuente activación de las fibras aferentes. Las fibras aferentes contactan a interneuronas del núcleo coclear (de Venecia et al., 2005) que a su vez proyectan contralateralmente hacia los cuerpos neuronales de las fibras MOC. Las neuronas MOC a su vez envían sus axones hacia las CCEs en forma contralateral (Reflejo MOC ipsilateral) o ipsilateral (Reflejo MOC contralateral) (Fig. 5, Guinan, 2006). La activación de este reflejo puede medirse experimentalmente como una disminución tanto en la tasa de disparo de las fibras aferentes (Warren y Liberman, 1989a) como en las emisiones otoacústicas (Liberman et al., 1996; Kujawa y Liberman, 2001) en respuesta a un estímulo sonoro prolongado ipsilateral o contralateral.

El efecto inhibitorio contralateral es frecuencia-específico (Warren y Liberman, 1989b; Kujawa y Liberman, 2001), es decir, que la mayor magnitud de inhibición se da para la misma frecuencia del tono utilizado para activar el reflejo. De esta manera, este reflejo permite un control de la ganancia acoplado a un estímulo de entrada en forma frecuencia-específica.

Se ha observado que la magnitud de la inhibición es mayor a medida que aumenta la intensidad del sonido contralateral (Rajan, 2000). Esto ha llevado a proponer que es un mecanismo de protección

contra el trauma acústico. Por otro lado, el reflejo MOC tiene un mayor efecto cuando es evocado con ruido que con tonos puros (Liberman, 1989; Warren y Liberman, 1989b). Esta propiedad explica una función paradójica del sistema MOC: el *desenmascaramiento*. En un contexto ruidoso, la respuesta del nervio auditivo a un estímulo puro se ve limitado por dos razones. Por un lado, hay una activación constante del nervio auditivo lo que impide la codificación de intensidades bajas del estímulo. Por otro lado, esta misma activación constante genera un efecto de fatiga de la liberación por parte de las CCIs, disminuyendo así la respuesta máxima alcanzada por las fibras aferentes. Estos dos efectos disminuyen el rango dinámico de las fibras aferentes. La inhibición general del sistema mediante el reflejo MOC permite recuperar el rango dinámico “desenmascarando” los tonos únicos en ambientes ruidosos (Nieder y Nieder, 1970; Dolan y Nuttall, 1988; Winslow y Sachs, 1988; Kawase et al., 1993).

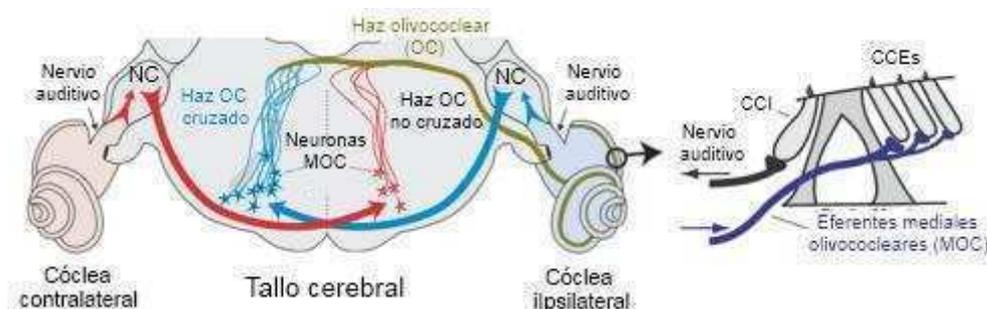


Figura 5. **El reflejo MOC.** Esquema anatómico de la activación del reflejo MOC en la cóclea derecha. La activación del nervio auditivo en la cóclea derecha genera, vía las interneuronas del núcleo coclear (NC), la activación de las neuronas MOC contralaterales cuyas fibras vuelven a cruzar tallo para inervar la cóclea derecha (reflejo ipsilateral, celeste). En forma análoga, la activación del nervio auditivo en la cóclea izquierda produce la activación de las neuronas MOC contralaterales que luego inervan en forma ipsilateral la cóclea derecha (reflejo MOC contralateral, rojo). (Adaptado de Guinan, 2006)

Propiedades de las fibras MOC

La activación del sistema eferente mediante el reflejo MOC ha sido utilizado extensamente para estudiar las respuestas electrofisiológicas de las fibras eferentes olivococleares. Los registros de estas fibras se realizan en el animal entero en la zona del ganglio espiral de una cóclea mientras se les presentan los estímulos acústicos. Estos estudios demuestran que muchas de las propiedades de la fisiología del reflejo MOC que han sido descritas anteriormente, tienen un fuerte correlato neuronal. Las fibras MOC responden a la estimulación auditiva con disparos regulares que se mantienen mientras el estímulo auditivo está presente (Brown et al., 1998). Existen distintos tipos de fibras MOC que responden en forma específica a sonidos presentados en el oído que inervan, en el oído contrario, o en ambos oídos indistintamente. En forma coincidente con lo que ocurre con el

reflejo MOC, las fibras eferentes responden preferentemente a una frecuencia característica (FC) presentando curvas de ajuste muy agudas (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989). Por otro lado, cuando una fibra es estimulada a su FC la tasa de disparo en respuesta a un estímulo aumenta monotónicamente con la intensidad del estímulo (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989; Brown et al., 1998). A su vez, la tasa de disparo evocada por estimulación con tonos puros resulta menor a la evocada con ruido blanco (Brown et al., 1998). Las fibras MOC responden a su vez diferencialmente a estímulos presentados sólo en su oído de preferencia o en ambos oídos (Brown et al., 1998). Este fenómeno coincide a su vez con un mayor efecto de inhibición de emisiones otoacústicas y de protección contra el trauma acústico cuando se activa el sistema olivococlear estimulando ambos oídos (Cody y Johnstone, 1982; Liberman et al., 1996).

Todas estas observaciones indican que el patrón de disparo de las fibras MOC refleja diversas características de los estímulos sonoros que las activan y que a su vez, estos distintos patrones de disparo regulan la intensidad del efecto inhibitorio sobre la función auditiva.

Control central del amplificador coclear

Las neuronas MOC no reciben inervación proveniente solo de la periferia sino que son contactadas por vías provenientes de diversos centros de procesamiento superior como el colículo inferior (Thompson y Thompson, 1993; Vetter et al., 1993), el locus coeruleus (Mulders y Robertson, 2001) y la corteza auditiva (Mulders y Robertson, 2000a; Horvath et al., 2003). A su vez, se ha demostrado que la estimulación eléctrica del colículo inferior produce efectos similares a la activación de las fibras eferentes, como la disminución de la tasa de disparo y el aumento en las corrientes de las CCEs (Mulders y Robertson, 2000b; Ota et al., 2004). Estas vías descendentes están probablemente relacionadas con el control cognitivo de la entrada auditiva mediado por el sistema eferente. Este tipo de controles incluyen la detección de señales auditivas de relevancia (Maison et al., 2001; Tan et al., 2008) y procesos de atención selectiva (Oatman, 1976; Delano et al., 2007).

La sinapsis eferente a las CCEs.

El control inhibitorio de la actividad de las CCEs se lleva a cabo mediante una sinapsis muy particular. Las CCEs poseen contactos sinápticos con 1 a 3 botones eferentes cuya característica estructural más notable es la presencia de una cisterna subsináptica muy desarrollada en aposición a la membrana

postsináptica (Fig. 4D). El principal neurotransmisor liberado por las fibras MOC es la acetilcolina (ACh) (Eybalin, 1993). Tanto la aplicación exógena de ACh (Housley y Ashmore, 1991; Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Nenov et al., 1996b, a) como la liberación de neurotransmisor desde los terminales eferentes (Oliver et al., 2000) producen respuestas bifásicas compuestas por una depolarización rápida inicial seguida de una gran corriente hiperpolarizante lenta que le confiere a esta sinapsis un carácter inhibitorio. Esta respuesta se produce por la activación de dos tipos de canales iónicos.

El receptor nicotínico

La identificación del receptor colinérgico que media esta sinapsis fue posible tras el clonado de dos nuevas subunidades de los receptores nicotínicos: la subunidad $\alpha 9$ (Elgoyhen et al., 1994) y la subunidad $\alpha 10$ (Elgoyhen et al., 2001; Sgard et al., 2002).

Los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) son canales catiónicos inespecíficos activados por ligando y pertenecen a la superfamilia de los canales *Cys-Loop* junto con los receptores ionotrópicos de GABA, Glicina y Serotonina (Dani y Bertrand, 2007). Como todos los receptores de esta superfamilia, los receptores nicotínicos están formados por cinco subunidades de idéntica topología: cada una posee cuatro pasos transmembrana, el segundo de los cuales constituye el poro de permeación (Fig. 6).

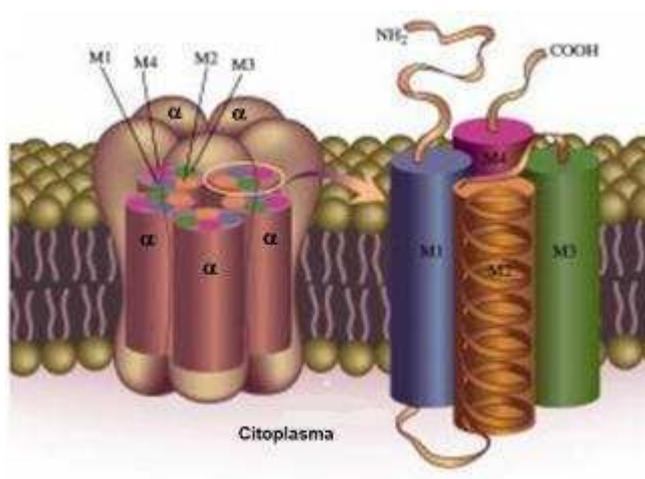


Figura 6. Estructura de los receptores nicotínicos. Los receptores nicotínicos son canales iónicos formados por cinco subunidades (izquierda). Cada una de ellas está formada por cuatro pasos transmembrana (TM1-TM4), el segundo de los cuales tapiza el poro del canal.

La subunidad $\alpha 9$ forma canales homoméricos funcionales al ser expresada en un sistema heterólogo (Elgoyhen et al., 1994) mientras que la subunidad $\alpha 10$ sólo es funcional cuando se expresa en conjunto con la subunidad $\alpha 9$ (Elgoyhen et al., 2001), formando receptores con una estequiometría propuesta de 2 subunidades $\alpha 9$ y 3 subunidades $\alpha 10$ (Plazas et al., 2005a).

Si bien las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ presentan un alto nivel de identidad de secuencia entre ellas (54%), poseen un bajo nivel de identidad con el resto de los nAChRs (< al 39%, Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001), considerándose como los miembros más alejados y ancestrales de la familia (Le Novère et al., 2002; Franchini y Elgoyhen, 2006). Estas diferencias de identidad aminoacídica se correlacionan con el perfil farmacológico atípico de este receptor, que presenta similitudes con otros miembros de la superfamilia Cys-Loop (Rothlin et al., 1999; Elgoyhen et al., 2001; Rothlin et al., 2003). Además, este receptor presenta una farmacología mixta que comparte características de los receptores colinérgicos tanto nicotínicos como muscarínicos (receptores de ACh acoplados a proteína G) (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001). Este perfil farmacológico peculiar es compartido por los canales homoméricos $\alpha 9$, los heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$ y por los receptores colinérgicos nativos de las células ciliadas de la cóclea (Gomez-Casati et al., 2005).

Por el contrario, los receptores $\alpha 9$ y los $\alpha 9\alpha 10$ presentan varias diferencias en cuanto a sus propiedades biofísicas. Los nAChRs $\alpha 9$ no se desensibilizan en presencia del agonista mientras que los receptores $\alpha 9\alpha 10$ presentan una desensibilización significativa. Por otro lado, la actividad del receptor $\alpha 9\alpha 10$ es modulada por Ca^{2+} en forma bifásica: bajas concentraciones de este ion (< 0.5 mM) potencian su actividad mientras que concentraciones mayores, dentro del rango fisiológico (> 0.5 mM), ejercen un bloqueo de la respuesta. Los receptores $\alpha 9$, por el contrario, son bloqueados por el Ca^{2+} extracelular (IC_{50} 100 μM) y no presentan potenciación por este catión (Katz et al., 2000; Weisstaub et al., 2002). Por otro lado, ambos receptores presentan una alta permeabilidad al Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 9-16$) (Katz et al., 2000; Sgard et al., 2002; Weisstaub et al., 2002). Las corrientes colinérgicas observadas en las células ciliadas presentan un perfil biofísico similar al descrito para el receptor recombinante $\alpha 9\alpha 10$, indicando que este es el receptor que media las respuestas colinérgicas en estas células (Gomez-Casati et al., 2005). En línea con esta hipótesis, las células ciliadas de los ratones con una mutación nula en el gen que codifica para la subunidad $\alpha 9$ no responden a la ACh (Vetter et al., 1999). Asimismo, estos ratones carecen de modulación eferente de la función auditiva, es decir que están funcionalmente de-eferentados (Vetter et al., 1999).

El canal SK2

La activación del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ explica la fase depolarizante de la respuesta de colinérgica de las células ciliadas. Sin embargo, es la fase lenta, hiperpolarizante, la que confiere el signo inhibitorio a las respuestas colinérgicas. Esta fase se debe a la activación secundaria de una corriente de K^+ conducida por un canal del tipo SK2 (Dulon y Lenoir, 1996; Nenov et al., 1996b; Glowatzki y Fuchs,

2000; Oliver et al., 2000; Marcotti et al., 2004; Gomez-Casati et al., 2005; Goutman et al., 2005). Este tipo de canales de K^+ son de baja conductancia, insensibles al voltaje y se activan por la presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Cl_{50} : 0.3-0.7 μM) (Stocker, 2004). Esta activación está mediada por interacción de estos canales con calmodulina (Xia et al., 1998). El modelo de activación de esta corriente en las células ciliadas es que dada la alta permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores $\alpha 9\alpha 10$, su apertura produce un rápido aumento del Ca^{2+} intracelular que activa los canales SK2. La eficiencia de este complejo de señalización depende de un ajustado acople entre estos dos canales. En este sentido, basándose en que el curso temporal de las respuestas sinápticas de las CCEs está dominado por la cinética de canal SK2, y que son necesarias altas concentraciones del quelante rápido de Ca^{2+} , BAPTA, para desacoplar la respuesta, se ha estimado que estos dos canales se encuentran en microdominios a una distancia aproximada de 10 nm (Oliver et al., 2000).

Asimismo, se ha propuesto que las cisternas subsinápticas de las CCEs podrían estar contribuyendo a la activación de los canales SK2. En este caso, el modelo propuesto es que la entrada de Ca^{2+} por los nAChRs promovería la liberación de Ca^{2+} de las cisternas a través de canales de ryanodina del tipo I (RyR I) y que esta salida de Ca^{2+} hacia el citosol contribuiría a la activación de los canales SK2. La activación de los canales SK2 mediante este mecanismo ha sido descrito en neuronas simpáticas de rana (Akita y Kuba, 2000). La presencia de RyR I ha sido demostrada en las cisternas de las CCEs (Lioudyno et al., 2004) y existen evidencias farmacológicas que sustentarían una participación de estas estructuras en la respuesta colinérgica de estas células (Shigemoto y Ohmori, 1991; Yoshida et al., 1994; Lioudyno et al., 2004).

Innervación eferente durante el desarrollo.

La descripción anatómica y funcional del sistema eferente hasta aquí realizada corresponde a mamíferos adultos. Existe sin embargo un periodo durante el desarrollo temprano del sistema auditivo en el cual el patrón de innervación del sistema eferente es distinto al del adulto y, presumiblemente, también difiere su función (Fig. 7).

Este proceso se encuentra especialmente estudiado en roedores en los cuales el desarrollo final de la función auditiva se da en forma postnatal como es el caso de las ratas, los ratones y los hamsters. En estas especies las fibras MOC ingresan a la cóclea en periodos embrionarios (Fritzsche y Nichols, 1993) y al momento del nacimiento forman contactos transitorios con las CCl (Simmons et al., 1996; Pujol et al., 1998; Bruce et al., 2000). A partir del día postnatal (P) 6, aproximadamente, las CCEs reciben los primeros contactos eferentes y la innervación a las CCl comienza a retraerse. En estas

especies el comienzo de la audición se produce alrededor de P12 (Puel y Uziel, 1987; Geal-Dor et al., 1993), momento en cual el patrón de innervación eferente adopta su estructura adulta, exclusiva en las CCEs (Lenoir et al., 1980).

En paralelo con esta remodelación sináptica, se producen en las CCI's cambios en la expresión de genes involucrados con esta sinapsis. Las CCI's expresan el ARN mensajero que codifica para las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ desde estadios embrionarios. Sin embargo, mientras la expresión del mensajero de la subunidad $\alpha 9$ se mantiene hasta el estadio adulto (Elgoyhen et al., 1994; Luo et al., 1998; Simmons y Morley, 1998), el mensajero de la subunidad $\alpha 10$ deja de detectarse en P15 (Elgoyhen et al., 2001; Morley y Simmons, 2002). Asimismo, utilizando técnicas de inmunocitoquímica se demostró que tanto la subunidad $\alpha 10$ como el canal SK2 dejan también de expresarse en las CCI's luego de P15 (Katz et al., 2004), coincidiendo con la retracción de las fibras eferentes (Simmons et al., 1996).

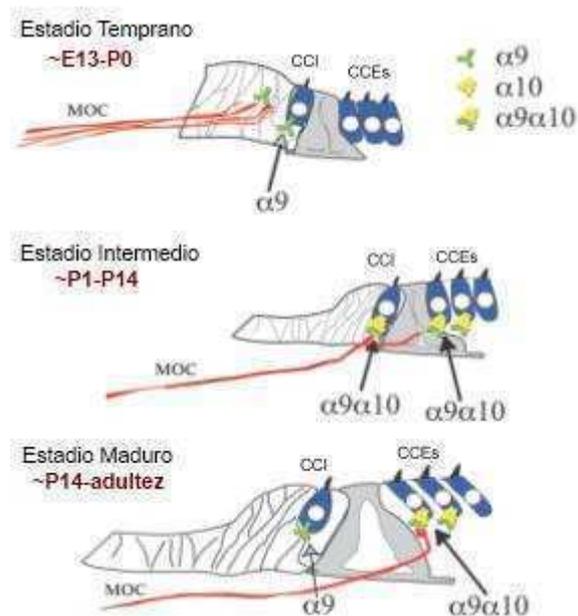


Figura 7. **Expresión de las subunidades nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$ durante el desarrollo.** En el esquema se muestran tres períodos de la sinaptogénesis de las fibras MOC en paralelo con la expresión de las subunidades nicotínicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$. En cada período se indica en color bordó la edad correspondiente en los roedores altrícios. En períodos tempranos, antes de que las fibras MOC hagan contacto con las CCI's, éstas expresan la subunidad nicotínica $\alpha 9$. En estadios intermedios en los cuales tanto las CCI's como las CCEs reciben contactos sinápticos, ambos tipos celulares expresan las dos subunidades nicotínicas ($\alpha 9$ y $\alpha 10$). En las CCI's, luego de la retracción de las fibras eferentes (alrededor de P12) aún puede detectarse la presencia de transcritos para la subunidad $\alpha 9$ pero no para la $\alpha 10$. (Adaptado de Simmons, 2002)

La participación del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ y del canal SK2 en esta sinapsis fue confirmada mediante registros en CCI's neonatales (Glowatzki y Fuchs, 2000). Además, en forma consistente con los cambios en la expresión génica y en la innervación, las CCI's presentan sensibilidad a la ACh entre P0-P14 y respuestas sinápticas entre P1-P14 (Katz et al., 2004; Roux et al., 2011).

Las CCI's neonatales son capaces de generar potenciales de acción cálcicos repetitivos que desaparecen al comienzo de la audición debido a la expresión de canales rápidos de K^+ activados por Ca^{2+} del tipo BK (Kros et al., 1998). Esta actividad eléctrica de las CCI's inmaduras es capaz de

provocar la liberación de glutamato que activa a los receptores glutamatérgicos presentes en las dendritas de las neuronas aferentes que forman el nervio auditivo (Beutner y Moser, 2001).

Si bien se propone que la generación de estos potenciales de acción es espontánea (Kros et al., 1998; Johnson et al., 2011), algunos estudios sugieren que durante periodos tempranos del desarrollo, ATP liberado desde las células de soporte que produce despolarizaciones en las CCIs serían responsables de provocar la generación de potenciales de acción (Tritsch et al., 2007).

Las vías auditivas aferentes presentan actividad espontánea antes del inicio de la transducción de estímulos sonoros (Carlier et al., 1975; Gummer y Mark, 1994; Lippe, 1994; Jones et al., 2001; Jones et al., 2007). Esta actividad espontánea es característica de los circuitos neuronales en desarrollo (Blankenship y Feller, 2010) y se propone que es esencial para su correcto establecimiento, estando involucrada en procesos de diferenciación neuronal, proliferación y migración (Spitzer, 2006). En el sistema auditivo, la anulación de esta actividad resulta en alteraciones del correcto establecimiento de distintos circuitos del procesamiento auditivo (Friauf y Lohmann, 1999; Gabriele et al., 2000; Rubel y Fritsch, 2002; Kandler, 2004; Leake et al., 2006; Leao et al., 2006). Estudios recientes han demostrado que los patrones de actividad espontánea en las vías auditivas superiores durante el desarrollo conservan la estructura de la actividad generada en las CCIs, confirmando su origen periférico (Tritsch et al., 2010).

La generación de potenciales de acción en las CCIs puede ser inhibida tanto por aplicación exógena de ACh (Glowatzki y Fuchs, 2000) como por activación eléctrica de las fibras MOC que las contactan (Goutman et al., 2005; Johnson et al., 2011). Estos resultados sugieren que la inervación eferente olivococlear podría tener un rol modulador de la actividad espontánea de la vía auditiva durante el desarrollo, ejerciendo un control sobre el correcto establecimiento de las vías auditivas. En línea con esta propuesta, se observó que el patrón de disparo rítmico de las neuronas aferentes inmaduras se vuelve continuo luego de cortar los terminales eferentes (Walsh et al., 1998).

Transmisión sináptica y plasticidad de corto término

La forma principal de comunicación entre neuronas es la sinapsis química rápida. En este tipo de sinapsis, un potencial de acción generado en la célula presináptica genera la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCVD) en los terminales sinápticos. Esta entrada de Ca^{2+} provoca una liberación rápida del neurotransmisor que es finalmente detectada por receptores en la célula postsináptica. La liberación del neurotransmisor se produce por la fusión de vesículas que lo contienen en la membrana presináptica en zonas especializadas llamadas sitios activos. Este

fenómeno fue evidenciado por primera vez a través de la observación de que la amplitud de las respuestas postsinápticas no se distribuyen continuamente, sino que representan múltiplos de un mismo valor correspondiente a la amplitud producida por la liberación de una única vesícula (Del Castillo y Katz, 1954b). A partir de este tipo de observaciones experimentales se elaboraron los primeros modelos 'cuánticos' que describen la funcionalidad de las sinapsis, cuya validez general se mantiene hasta la actualidad. Los parámetros fundamentales que definen a una sinapsis son i) la amplitud de la respuesta producida por una única vesícula (tamaño cuántico), ii) el número de sitios activos independientes (N) y la probabilidad de liberación en cada sitio (P). A partir de estos parámetros se puede definir el promedio de vesículas que se libera en cada potencial de acción como $P \times N$. Este valor se conoce como '*contenido cuántico*' (m) y es un indicio de la fuerza o capacidad de transmitir información de una sinapsis.

En condiciones de baja probabilidad de liberación (bajo P) la liberación de vesículas puede modelarse con una distribución de Poisson. La ventaja de este modelo es que por la simpleza de sus expresiones permite estimar m sin necesidad de estimar los valores de N o P (ver *Materiales y Métodos*), parámetros poco accesibles en la mayoría de los sistemas experimentales. Cuando cualquiera de los supuestos anteriormente mencionados no se cumplen (bajo P, N no independientes, P no homogéneas entre sitios) son necesarios modelos más complejos para describir el funcionamiento de las sinapsis (Silver, 2003).

Es importante considerar que si bien todos estos parámetros nos permiten caracterizar una sinapsis en un momento particular, las sinapsis no son estáticas sino que pueden cambiar sus propiedades de acuerdo a su historia. Dependiendo de sus características intrínsecas y de la naturaleza de la actividad a la que está sujeta, una sinapsis puede aumentar o disminuir su fuerza. Estos cambios en la fuerza de las sinapsis dependientes de la actividad se definen genéricamente como *plasticidad sináptica* y se distinguen entre procesos de corto término cuando su efecto decae en segundos, o de largo término cuando este efecto decae en el orden de minutos u horas. Existen dos procesos de plasticidad de largo término denominados potenciación de largo término (LTP) y depresión de largo término (LTD), que producen un aumento o disminución de la fuerza sináptica, respectivamente (Malenka y Bear, 2004).

Dentro de los procesos de plasticidad de corto término se define una disminución de la fuerza sináptica como *depresión sináptica*. Para el caso del aumento de la respuesta sináptica se han descrito, sin embargo, múltiples componentes que pueden diferenciarse de acuerdo a su cinética de crecimiento y decrecimiento. De esta manera se conoce como *facilitación* a un proceso de aumento de la fuerza sináptica que se produce en el orden de ~ 100 ms. Este proceso es

generalmente evidenciado mediante la aplicación de pares de estímulos a la célula presináptica. En algunos sistemas se han descrito dos componentes de la facilitación, uno que se desarrolla en el orden de 10 ms (F1) y otro que persiste durante ~100 ms (F2). Cuando se aumenta el número de estímulos y se aplican trenes, se produce un aumento de la respuesta sináptica denominada *potenciación post-tetánica* (PTP) cuyo tiempo de crecimiento se encuentra en el orden de segundos y puede durar entre 30 s y unos minutos. En algunas sinapsis es posible hacer una disección de este último proceso en una fase rápida que crece y decrece en el orden de 5-10 s llamada *augmentación*, definiéndose el resto del efecto como PTP (Zucker y Regehr, 2002).

La estimación del cambio de los parámetros cuánticos antes descritos durante los procesos de plasticidad sináptica es la herramienta fundamental que se utiliza para determinar los fenómenos moleculares subyacentes. Por ejemplo, en numerosos sistemas se ha demostrado que los procesos de plasticidad de corto término que aumentan la fuerza sináptica están asociados a aumentos en el valor de m sin cambios en el valor del tamaño cuántico (Fisher et al., 1997). Esto permitió establecer que este tipo de procesos se deben a mecanismos presinápticos. Más aún, mediante la aplicación de modelos que permiten calcular P y N se ha demostrado que durante la facilitación el aumento en m no se debe exclusivamente a un aumento en la probabilidad de liberación, sino también a un aumento del número de sitios activos (Zucker y Regehr, 2002). La *augmentación*, sin embargo, se asocia sólo con cambios en P y no en N (Stevens y Wesseling, 1999). El consenso actual es que la facilitación, la *augmentación* y la PTP son procesos dependientes del Ca^{2+} , sin embargo los mecanismos moleculares involucrados se encuentran aún en debate.

La primera hipótesis que se elaboró, fue que el Ca^{2+} residual que permanece en el terminal presináptico luego de un potencial de acción aumenta la liberación del neurotransmisor por unión directa al sensor de Ca^{2+} que dispara la liberación del neurotransmisor (Katz y Miledi, 1968). Estudios más recientes, sin embargo, indican que el Ca^{2+} residual estaría actuando mediante otros mecanismos. Por un lado se ha propuesto que el Ca^{2+} residual se uniría a *buffers* en la presinapsis, saturándolos, de manera que la entrada de calcio producida por un segundo potencial de acción dejaría una mayor proporción de calcio libre, capaz de interactuar con los sensores de calcio que disparan la liberación (Blatow et al., 2003; Felmy et al., 2003; Muller et al., 2007). Alternativamente, se ha propuesto la existencia de un sensor específico '*facilitatorio*' que une Ca^{2+} y aumenta la eficacia sináptica por acción directa sobre la maquinaria de liberación (Dittman et al., 2000; Sippy et al., 2003) o promoviendo un mayor ingreso de Ca^{2+} (Tsujiimoto et al., 2002; Mochida et al., 2008), resultando en el fenómeno observable de facilitación.

La mayor duración del efecto mediado por la aumentación y la PTP están relacionados con una disminución de la extrusión de calcio. Esto se debe a que durante una activación presináptica repetitiva, hay un gran aumento tanto de Na^+ como de Ca^{2+} . Esta alteración del gradiente iónico para el Na^+ impide la extrusión de Ca^{2+} a través del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o puede incluso hacerlo trabajar en forma inversa (Mulkey y Zucker, 1992). Además, la expresión de PTP puede estar mediada por liberación de calcio desde reservorios intracelulares como las mitocondrias y el retículo endoplasmático (Tang y Zucker, 1997; Narita et al., 2000).

El análisis de los parámetros cuánticos de la depresión sináptica, demuestra que en la mayoría de los casos puede involucrar una reducción en P, en N o en ambos parámetros, es decir, es de origen presináptico. La hipótesis de mayor consenso respecto al mecanismo que subyace a este fenómeno es que durante la actividad repetitiva existe una disminución del conjunto o pool de vesículas que se encuentran asociadas a la membrana listas para ser liberadas. A partir de esta idea se desprende que el curso temporal de la depresión sináptica dependerá del tamaño inicial del pool de vesículas, la proporción que se libere por potencial de acción, y la velocidad con la cual este pool sea reemplazado (Zucker, 1989; Zucker y Regehr, 2002). Se han construido numerosos modelos basados en esta idea. Si bien estos modelos capturan gran parte del fenómeno, estos no explican la rápida depresión de la respuesta que se observa en diversos sistemas. Para explicar esta discrepancia, se han propuesto mecanismos alternativos como la disminución en la entrada de Ca^{2+} por inactivación de los CCVD (Forsythe et al., 1998; Xu y Wu, 2005).

En algunos casos, la depresión sináptica puede ser también generada por mecanismos de origen postináptico. Los receptores iónicos activados por ligando luego de ser activados por la unión a su agonista, pueden entrar en estados desensibilizados. En función de la cinética de desensibilización de un receptor y de su tasa de recuperación, es posible que este proceso se vuelva relevante durante la liberación presináptica de alta frecuencia (Jones y Westbrook, 1996). En este sentido se ha demostrado que la disminución de la tasa de desensibilización, mediante modulación farmacológica, de la actividad de los receptores del tipo AMPA en sinapsis glutamatérgicas, produce una disminución en la depresión sináptica (Mosbacher et al., 1994; Wong et al., 2003).

Todos estos procesos de plasticidad se producen simultáneamente de manera que el comportamiento final de una sinapsis dependerá del balance entre ellos (Fig. 8). Un conocimiento acabado de los procesos de plasticidad de corto término expresados por una sinapsis es fundamental ya que no representan solamente la confiabilidad con la que una neurona es capaz de transmitir información a otra, sino que limitan el ancho de banda en el cual la misma puede operar. Una sinapsis que presenta un alto grado de depresión, por ejemplo, será muy poco eficiente en

transmitir actividad de alta frecuencia, es decir que actuará como un filtro pasa bajos. En forma análoga, una sinapsis que muestra un alto grado de facilitación o potenciación funcionará como un filtro pasa altos. De esta manera, mediante la expresión de uno u otro tipo de plasticidad de corto término una sinapsis puede filtrar la información que es detectada por la célula postsináptica contribuyendo al procesamiento de la información (Fortune y Rose, 2001).

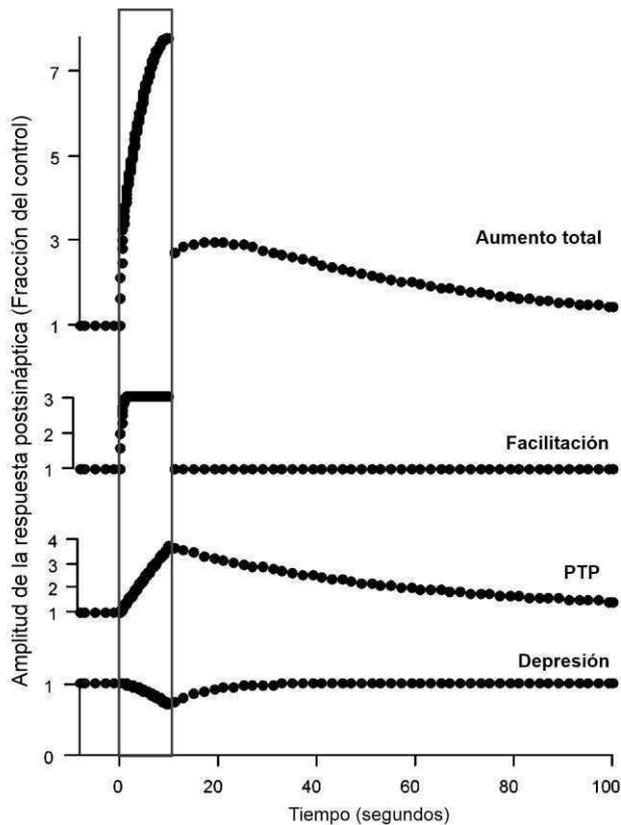


Figura 8. **Plasticidad de corto término.** En este experimento simulado se ilustran los distintos procesos de plasticidad de corto término que pueden producir cambios en una respuesta sináptica evocada a 0.5 Hz. Estos procesos se desencadenan por la aplicación de un tren de estimulación a una frecuencia de 10 Hz por 10 segundos (indicado por el recuadro gris). En el panel superior se observa el efecto total en la respuesta sináptica, mientras que en los tres paneles inferiores se muestra un detalle del curso temporal de los distintos fenómenos de plasticidad individualizados. Notar que la facilitación aumenta la amplitud de la respuesta rápidamente durante el tren y decae rápidamente una vez terminado el mismo. La PTP crece lentamente durante el tren y persiste luego de terminado el estímulo. En este caso el efecto de la depresión es menor, por lo que el efecto global de la estimulación de alta frecuencia en esta sinapsis es un aumento en la fuerza sináptica. (Adaptado de Zucker y Regehr, 2002)

Objetivos

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar, tanto desde el punto de vista fisiológico como molecular, los procesos sinápticos que subyacen a la modulación de la audición por el sistema eferente olivococlear en los mamíferos. En este contexto nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Estudiar el rol de la subunidad nicotínica $\alpha 10$ en la transmisión sináptica entre las fibras eferentes y las células ciliadas de la cóclea, durante el desarrollo postnatal del ratón, previo y posterior al comienzo de la audición.

Objetivo 2: Caracterizar las respuestas sinápticas de las CCEs ante la estimulación eléctrica de las fibras del sistema MOC y los fenómenos de plasticidad sináptica de corto término que presenta esta sinapsis.

Objetivo 3: Caracterizar el efecto de alterar la actividad del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ en la dinámica de la sinapsis MOC a las células ciliadas, en ratones con una modificación genética en la subunidad $\alpha 9$ que le confiere al receptor una ganancia de función.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Disección del órgano de Corti

Se utilizaron ratones Balb/c de diferentes edades postnatales. El día de nacimiento se consideró como día 0 (P0, postnatal 0). Los ratones fueron sacrificados por decapitación de acuerdo a los lineamientos de la *American Veterinary Medical Associations' AVMA Guidelines on Euthanasia* (June 2007).

Las disecciones del órgano de Corti se realizaron bajo lupa (Leica MZ75, Wetzlar, Alemania) en ratones de edades desde P6 hasta P21. Luego de extraer la cóclea, se escindió la vuelta apical y posteriormente se removió la estría vascularis, el modiollo y la membrana tectorial. Las preparaciones se colocaron sobre un cubreobjetos con hilo de nylon para inmovilizarlas y luego se montaron en una cámara para registros electrofisiológicos bajo un microscopio Leica LFS (Leica DMLFS, Wetzlar, Alemania). El seguimiento visual de las preparaciones se realizó con contraste de interferencia diferencial (DIC) utilizando un objetivo de inmersión en agua 40X y una cámara con aumento de contraste (Hamamatsu C275410, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan). Los registros electrofisiológicos se realizaron inmediatamente luego de la disección y los mismos se prolongaron hasta un máximo de tres horas.

Registros electrofisiológicos en las células ciliadas

Las células ciliadas fueron identificadas primero visualmente utilizando el objetivo 40X y luego por su capacitancia (de 7 a 12 pF) y por sus corrientes de Na⁺ y K⁺ características (Kros et al., 1998; Marcotti y Kros, 1999). Para realizar los registros electrofisiológicos en las CCI, luego de montar la preparación bajo el microscopio, se removieron algunas células de soporte que se encuentran por encima de ellas utilizando una pipeta de limpieza. Este paso es necesario para tener un mejor acceso a estas células. La pipeta de registro fue trasladada a través del tejido bajo presión positiva. Para realizar los registros en las CCEs no fue necesario este paso previo de limpieza. Además, se trabajó siempre con las CCEs de la primera fila (hay 1 fila de CCIs y tres filas de CCEs en cada Órgano de Corti, ver Fig. 2A y Fig. 19A).

Los registros electrofisiológicos en las CCIs y CCEs se realizaron mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* utilizando un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Las señales fueron filtradas a 2-10 kHz y digitalizadas a 5-20 kHz mediante una placa conversora analógico-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los

registros se realizaron a temperatura ambiente (22-25°C). Se utilizaron pipetas de vidrio de 1.2 mm de diámetro con resistencias de 6-8 MΩ estiradas con un estirador de pipetas modelo PC-10 (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA). Los registros en las CCI se realizaron a potenciales de sostén ($V_{\text{sostén}}$) de -90 mV, a menos que se indique lo contrario en la sección correspondiente, mientras que los registros en las CCEs se realizaron a un potencial de -40 mV.

Soluciones

La preparación de cóclea fue continuamente bañada con una solución extracelular compuesta por (en mM): NaCl 155, KCl 5.8, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 0.9, NaH₂PO₄ 0.7, D-glucosa 5.6, y HEPES 10; pH 7.4; 300-320 mosmol kg⁻¹. Esta solución tiene una composición iónica similar a la de la perilinfa, solución que baña la base de las células ciliadas. Dado que el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ es bloqueado por cationes divalentes (Weisstaub et al., 2002; Gomez-Casati et al., 2005), durante los experimentos se eliminó el Mg²⁺ de la solución extracelular. A su vez, cuando se estudiaron las corrientes colinérgicas se redujo la concentración de Ca²⁺ a 0.5 mM. Las soluciones de trabajo (K⁺ 40 mM, ACh y/o las distintas drogas o toxinas) fueron aplicadas a través de una pipeta (con un diámetro en la punta de ~150 μm), alimentada por un sistema de perfusión de seis vías operado por gravedad, ubicada aproximadamente a 300 μm de la célula en estudio.

Para registrar las corrientes combinadas *nAChR+SK* se utilizó la solución intracelular KCl-EGTA conteniendo (en mM): KCl 135, MgCl₂ 3.5, CaCl₂ 0.1, ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil ester)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5, HEPES 5 y Na₂ATP 2.5, pH 7.2. Para registrar las corrientes a través del $\alpha 9\alpha 10$ *nAChR* aisladas, en vez de utilizar EGTA en la solución intracelular, se utilizó el quelante rápido de calcio, ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), minimizando así la activación de los canales SK2 por el Ca²⁺ (composición de la solución KCl-BAPTA (en mM): KCl 135, MgCl₂ 3.5, CaCl₂ 0.1, BAPTA 10, HEPES 5 y Na₂ATP 2.5, pH 7.2). Además, a las soluciones de trabajo se les agregó apamina, un bloqueante específico de los canales SK2, a una concentración de 1-10 nM (Kohler et al., 1996). La osmolaridad de las soluciones intracelulares varió entre 270 y 290 mosmol kg⁻¹.

Estimulación eléctrica del los axones eferentes MOC

Para producir la liberación de neurotransmisor desde los terminales eferentes, se utilizó un electrodo bipolar ubicado a 20-60 μm en dirección hacia el modiolos de la CCI bajo estudio o de la CCI

alineada con la CCE en estudio (Fig. 17A). El estímulo eléctrico fue aplicado a través de una pipeta de vidrio de tipo theta de 20-80 μM de diámetro. La posición de la pipeta fue luego ajustada hasta que se observaron corrientes postsinápticas en forma consistente. Se utilizó una fuente de corriente constante aislada (modelo DS3, Digitimer Ltd, Welwyn Garden City, UK) que fue activada a través de la computadora de adquisición, utilizando la placa conversora analógico-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los estímulos generados fueron de hasta 30 mA de amplitud y de 200-1000 μs de duración.

Estimación del contenido cuántico

Para estimar el contenido cuántico (m) en las CCEs, se aplicaron protocolos en los cuales se estimuló con pulsos únicos a una frecuencia de 1 Hz con 200 repeticiones del estímulo. Cuando se realizó la estimación en animales L9'T/L9'T, la frecuencia de estimulación se redujo a 0.5 Hz debido al lento decaimiento de las corrientes postsinápticas en esta cepa. El valor de m fue estimado utilizando tres métodos. Según el 'método directo', m es calculado como la relación entre la amplitud promedio de las corrientes inhibitorias postsinápticas evocadas (eIPSCs) durante el protocolo de 200 repeticiones (considerando las fallas) y la amplitud promedio de las corrientes inhibitorias postsinápticas espontáneas (sIPSCs) (Del Castillo y Katz, 1954b). Cabe mencionar que en el caso de las CCEs, la frecuencia de liberación espontánea resultó muy baja en muchos casos y esto resultó en la exclusión de varias células del análisis. Bajo el supuesto de que la liberación de eventos sinápticos evocados sigue una distribución de Poisson, m pudo ser también calculado utilizando el 'método de las fallas' o el 'método del coeficiente de variación' (Del Castillo y Katz, 1954b) según:

$$P_x = \frac{m^x e^{-m}}{x!} \quad (\text{ec. 1}) \qquad \sigma^2 = \mu = m \quad (\text{ec. 4})$$

$$P_0 = e^{-m} = \frac{N_0}{N} \quad (\text{ec. 2}) \qquad CV = \frac{\sigma}{\mu} = \frac{\sqrt{m}}{m} \quad (\text{ec. 5})$$

$$m = \ln \left(\frac{N}{N_0} \right) \quad (\text{ec. 3}) \qquad m = \frac{1}{CV^2} \quad (\text{ec. 6})$$

Si la liberación de neurotransmisor sigue una distribución de Poisson, la probabilidad de que ocurra la liberación de x vesículas en un estímulo está dada por la ecuación 1, donde m es el número de vesículas promedio que se libera, es decir, el contenido cuántico. En el caso particular de que el número de vesículas liberadas sea cero (es decir, se produzca una falla), la ecuación 1 se reduce a la ecuación 2. A su vez, podemos estimar la probabilidad de ocurrencia de fallas como el número de

veces que se producen fallas dividido el número de veces que se estimuló (ecuación 2). Reordenando los dos último términos de la ecuación 2 se obtiene que la expresión de estimación de m definido como '*método de fallas*' (ecuación 3). Otra propiedad de la distribución de Poisson es que su media es igual a su varianza, es decir, es igual a m (ecuación 4). Considerando que el coeficiente de variación (CV) es la media dividida el desvío estándar (ecuación 5), se puede obtener una expresión de m en función de este valor (ecuación 6). Esta última expresión se conoce como '*método del coeficiente de variación*' para la estimación de m .

Protocolo de pulsos pareados

Se aplicaron dos pulsos consecutivos con intervalos entre estímulos (ISIs) que variaron entre 4 y 250 ms con 50-100 repeticiones a una frecuencia de 0.5 Hz. La detección de los eventos luego de cada pulso se llevó a cabo manualmente. La respuesta promedio (S) luego de cada pulso se calculó como la suma de todas las amplitudes de los eventos evocados dividida por el número de repeticiones del estímulo. La amplitud media de los eventos (A) fue obtenida promediando las amplitudes de los eventos evocados (sin incluir las fallas de liberación). La probabilidad de liberación (P) se calculó como el número de eIPSCs (eventos de liberación exitosos) dividido el número de repeticiones. Para los estímulos con ISIs de 4 y 10 ms, el pico de respuesta durante el primer pulso no pudo ser discriminado, por lo tanto, los valores de los tres parámetros (S , A y P) para el primer pulso fueron obtenidos utilizando un protocolo con un estímulo único previo al del pulso pareado. Los índices de facilitación fueron calculados como el valor de cada parámetro en el segundo pulso dividido su valor en el primero.

Protocolos de estimulación con trenes de alta frecuencia

Los trenes de estimulación utilizados para activar las respuestas postsinápticas en las CCEs (Capítulo 2) consistieron de 10 pulsos aplicados a frecuencias de entre 10 y 80 Hz, con intervalos entre estímulos de 2 segundos, repetidos entre 50 y 100 veces. Para cada pulso la amplitud de corriente (ΔI) fue calculada entre la línea de base y los 10 ms posteriores. La línea de base fue definida luego del estímulo y fue ajustada manualmente según el ancho del artefacto de estimulación. Se consideró un evento exitoso cuando el ΔI medido resultó mayor a 10 pA (ruido rms 2.8 ± 0.2 pA, $n=5$). Los valores de P , A y S se obtuvieron según se describió en la sección anterior. Para determinar el nivel de facilitación o de depresión de las respuestas sinápticas durante los trenes, se normalizó el valor de los parámetros S , P y A a su valor en el primer pulso. Para obtener el incremento de la respuesta

sináptica durante el tren, se calculó la corriente (I) en cada pulso como la diferencia entre el valor de base antes del tren y la corriente máxima luego de cada pulso. El incremento de la respuesta fue luego obtenido normalizando el valor de I en cada pulso a su valor en el primero (I_n/I_1).

Los trenes utilizados para estudiar la plasticidad sináptica de corto término en los animales L9'T/L9'T consistieron en: trenes de estímulos de 10 segundos de duración a 10, 50 y 80 Hz con una sola repetición por tren. Para caracterizar el curso temporal de la respuesta durante el tren se midió el ΔI en cada pulso y se promedió el valor obtenido en todos los pulsos producidos durante 1 s de estimulación. Cuando los registros se realizaron a -90 mV, la línea de base fue ubicada antes del estímulo.

Simulación de respuestas sinápticas ante la aplicación de trenes de estimulación de alta frecuencia

La simulación de las respuestas en las CCEs a la estimulación de alta frecuencia se realizó partiendo de una respuesta representativa a un estímulo único (a 1 Hz) cuya línea de base fue definida como cero. Para simular la sumación temporal, se construyeron trazos de 1.5 segundos. Las respuestas unitarias aparecieron a intervalos temporales definidos por la frecuencia simulada y la probabilidad de ocurrencia del evento se fijó con una probabilidad constante de 0.25. Esta es la probabilidad de éxito observada con una estimulación de pulso único a 1 Hz ('Sumación', Fig. 25A). Para agregar el efecto de la facilitación ('Sumación & Facilitación', Fig. 25A), la probabilidad de ocurrencia de los eventos fue multiplicada en cada pulso por el cambio en la probabilidad (P) obtenida experimentalmente (Fig. 21K). En cada caso se generaron 10 grupos de 100 trazos para obtener 10 respuestas promedio que representaran la medición en 10 CCEs individuales. Para cada grupo se calculó el incremento en la corriente como se explicó en la sección anterior.

Construcción de curvas concentración-respuesta a la ACh

Las respuestas a la ACh utilizadas para construir las curvas concentración-respuesta fueron realizadas en condiciones en las que se medía únicamente la corriente a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$. Las respuestas obtenidas a distintas concentraciones del agonista fueron relativizadas a la respuesta máxima a ACh 1 mM. Las curvas de concentración-respuesta para los agonistas se ajustaron con la ecuación logística de cuatro parámetros

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{I_{max}}{1 + 10^{(\log CE_{50} - \log A)^n}}$$

en forma iterada, donde I_{max} es la corriente entrante máxima producida por una concentración saturante del agonista, A es la concentración del agonista, CE_{50} es la concentración del agonista que produce una corriente del 50% de la máxima y n es el coeficiente de Hill.

Análisis de los datos

Las corrientes sinápticas espontáneas y las evocadas por uno o dos pulsos de estimulación, fueron identificadas visualmente y analizadas utilizando el programa Minianalysis 6.0.3 (Synptosoft, Decatur, GA, USA). Los tiempos de crecimiento y decaimiento ($\tau_{crecimiento}$ y $\tau_{decaimiento}$) de las corrientes se ajustaron a funciones monoexponenciales. Las respuestas a los trenes de estimulación fueron analizadas utilizando Clampfit 10.2 (MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA) o con rutinas hechas a medida con el programa Matlab R2008b (Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Se utilizó también el Matlab para la construcción de los trazos simulados. El análisis estadístico, el ajuste de las curvas concentración-respuesta para ACh y los gráficos fueron realizados con el programa Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Drogas y Toxinas

Las soluciones de stock de cloruro de ACh, di-*d*-tartrato de (-)-nicotina, clorhidrato de estricnina, clorhidrato de ICS-205930, apamina, iberiotoxina y tetrodotoxina fueron preparadas en agua destilada, almacenadas en alícuotas a -20°C y diluidas en la solución extracelular en forma previa al uso. Todas las drogas y sales utilizadas fueron compradas en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Resultados

Capítulo I

Participación de la subunidad $\alpha 10$ en la sinapsis entre las fibras del sistema MOC y las células ciliadas de la cóclea.

Introducción

Las características electrofisiológicas de las respuestas a la ACh de las células ciliadas cocleares y el patrón de expresión génica de las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$, indican que el receptor colinérgico de estas células está compuesto por ambas subunidades. Sin embargo, dado que la subunidad $\alpha 9$ es capaz de formar receptores recombinantes homoméricos en sistemas de expresión heteróloga (Elgoyhen et al., 1994), resultó de interés evaluar si se formaban canales $\alpha 9$ homoméricos funcionales nativos en las células ciliadas. Por otro lado, la desaparición tanto de la innervación eferente transitoria como la de las respuestas colinérgicas en las CCl, coincide temporalmente con la caída en la expresión de la subunidad $\alpha 10$, tanto a nivel del mensajero (Morley y Simmons, 2002) como de la proteína (Katz et al., 2004). Estos datos nos sugirieron que la presencia de esta subunidad podría estar relacionada con los procesos de armado y desarmado de la sinapsis transitoria a las CCl. Para poner a prueba estas hipótesis, se caracterizaron las corrientes colinérgicas en células ciliadas de animales que carecen de la subunidad $\alpha 10$ (KO $\alpha 10$) y en animales que expresan dicha subunidad en forma constitutiva (OE $\alpha 10$).

Resultados

1. Respuestas colinérgicas en CClIs neonatales que carecen de la subunidad $\alpha 10$.

En las células ciliadas del órgano de Corti la corriente mediada únicamente por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ posee una relación I-V lineal que revierte ~ -20 mV (Fig. 9). La corriente colinérgica mediada por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y el canal SK2, por otro lado, presenta una curva I-V en forma de campana que revierte alrededor de -82 mV, el potencial de reversión, E_{rev} , del K^+ , en nuestras condiciones experimentales (Fig. 9, Elgoyhen 2001, Gomez Casati 2005). Teniendo esto en cuenta se evaluó la actividad colinérgica en tres condiciones experimentales:

- i) En presencia de una solución extracelular fisiológica (ver Métodos) y a un $V_{sostén}$ de -90 mV, las respuestas acopladas evocadas por ACh son completamente entrantes y poseen una alta contribución de corriente a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$.
- ii) En la misma solución pero a un $V_{sostén}$ de -40 mV se produce una pequeña corriente entrante que es indetectable y la respuesta registrada está dominada por la corriente saliente a través del canal SK2. Esta condición de registro permite evaluar el correcto acople de la corriente del SK2 con el nAChR $\alpha 9\alpha 10$.
- iii) En presencia de una solución extracelular conteniendo 40 mM de K^+ , se genera un corrimiento del E_{rev} para K^+ a -32 mV lo que aumenta en forma considerable la amplitud de la corriente activada por ACh en las células ciliadas a un $V_{sostén}$ de -90 mV. Esto permite forzar el sistema para detectar las corrientes producidas por la aplicación de ACh exógena. A su vez, la aplicación de esta solución enriquecida en K^+ produce una despolarización de los terminales eferentes que produce un aumento en la frecuencia de liberación de vesículas sinápticas, que se detectan como corrientes sinápticas en la célula en estudio.

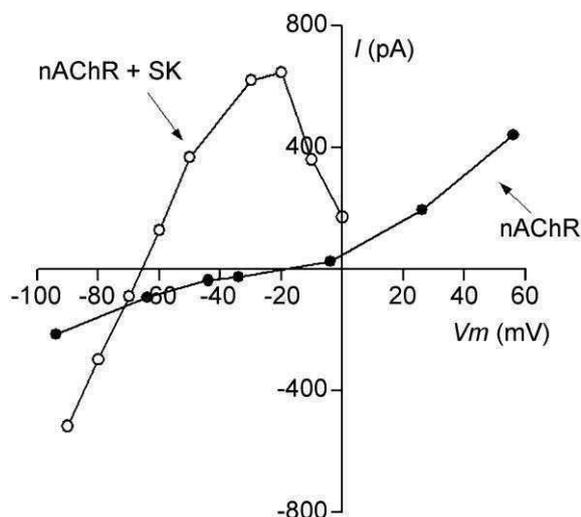


Figura 9. **Sensibilidad al voltaje de las corrientes colinérgicas en las CClIs de la rata.** En el gráfico se ilustran curvas de corriente en función del voltaje (I-V) para la corriente colinérgica de las CClIs mediada por la activación conjunta del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ y el canal SK2 (nAChR + SK2) o la corriente mediada solamente por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (nAChR). (Adaptado de Gomez-Casati et al., 2005).

Para evaluar la presencia de receptores $\alpha 9$ homoméricos, se caracterizaron las corrientes colinérgicas en CClIs neonatales (P8-9) en animales que poseen una delección en el gen que codifica para la subunidad $\alpha 10$ (*Chrna10*, (Vetter et al., 2007)). Tanto los animales salvajes ($\alpha 10^{+/+}$) como los que poseen la delección de la subunidad $\alpha 10$ en heterocigosis ($\alpha 10^{+/-}$) mostraron respuestas robustas a la ACh a $V_{\text{sostén}}$ de -90 y -40 mV, indicando tanto funcionalidad del receptor colinérgico como un correcto acople con el canal SK2 (Fig. 10A y B, Tabla I). En cambio las CClIs de los animales homocigotas para la subunidad $\alpha 10$ ($\alpha 10^{-/-}$) no presentaron corrientes colinérgicas detectables a ninguno de los $V_{\text{sostén}}$ estudiados (Fig. 10A-B panel derecho, Tabla I).

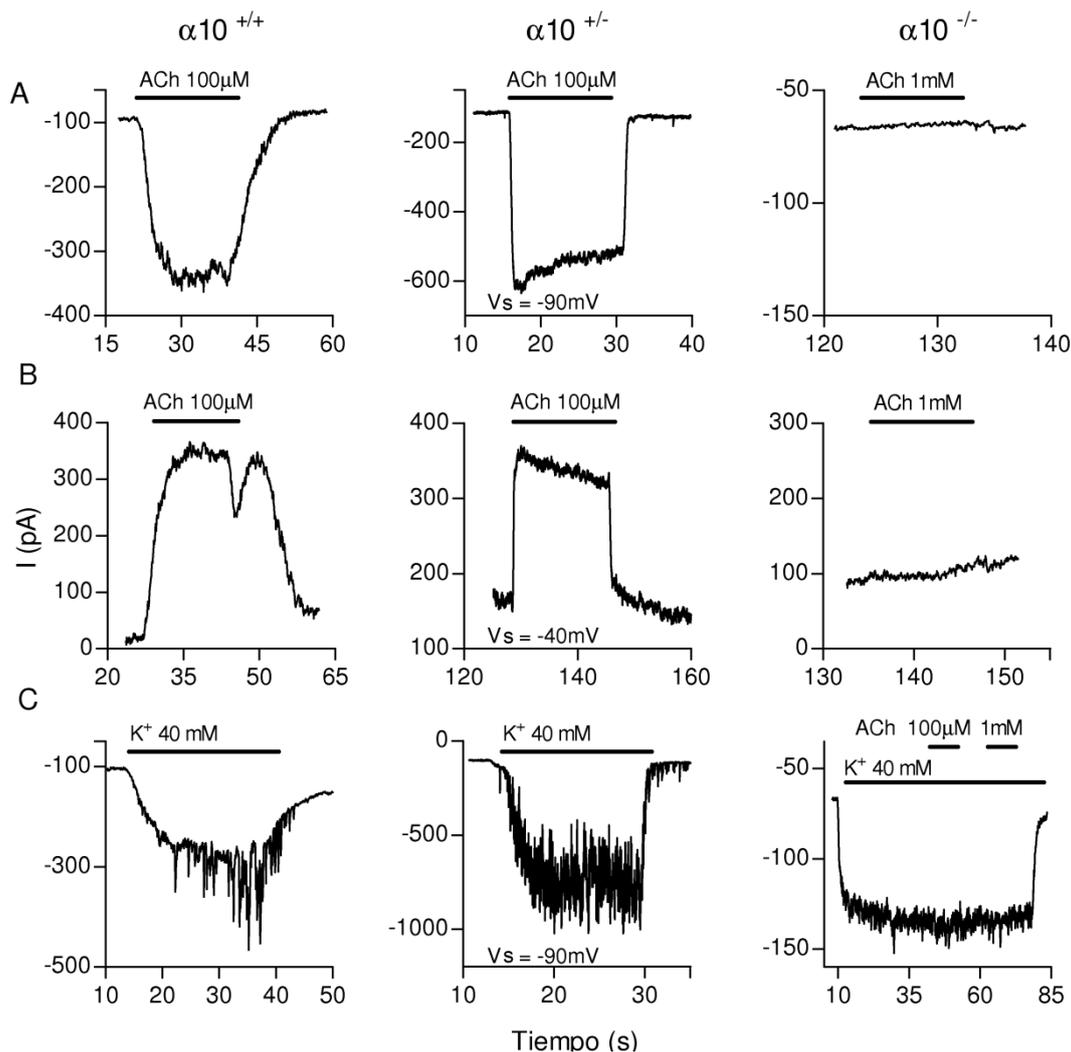


Figura 10. Respuesta colinérgica en las CClIs de los ratones que albergan una mutación que anula la expresión de la subunidad $\alpha 10$ (ratones $\alpha 10^{-/-}$). La sensibilidad a la ACh fue estudiada en ratones $\alpha 10^{+/+}$ (paneles izquierdos), $\alpha 10^{+/-}$ (paneles centrales) y $\alpha 10^{-/-}$ (paneles derechos) de edades P8-P9. Tanto a un V_s de -90 mV (A) como de -40 mV (B), los ratones salvajes y heterocigotas presentaron corrientes producidas por la aplicación de ACh 100 μ M. En los ratones $\alpha 10^{-/-}$, no se obtuvieron respuestas a la ACh, aún con una concentración de ACh 10 veces mayor (1 mM). C, La aplicación de una solución rica en K^+ (40 mM) aumentó la frecuencia de las corrientes sinápticas tanto en las CClIs de ratones $\alpha 10^{+/+}$ como en las de los $\alpha 10^{+/-}$. No se observaron corrientes sinápticas en respuesta a la aplicación de K^+ 40 mM en los ratones $\alpha 10^{-/-}$. En estos ratones, tampoco se obtuvieron respuestas ante la aplicación conjunta de ACh (0.1-1 mM) y K^+ 40 mM.

Por su parte, la perfusión de las CCl_s con una solución conteniendo una concentración de potasio elevada (40 mM) a un V_{sostén} de -90 mV produjo corrientes sinápticas tanto en las CCl_s $\alpha 10^{+/+}$ y $\alpha 10^{+/-}$, pero no en las CCl_s de los animales $\alpha 10^{-/-}$. Más aún, la aplicación de concentraciones saturantes de ACh (1 mM) en estas condiciones, no evocó corrientes colinérgicas en las CCl_s $\alpha 10^{-/-}$.

Tabla I. Corrientes colinérgicas en CCl_s de ratones $\alpha 10^{+/+}$, $\alpha 10^{+/-}$ y $\alpha 10^{-/-}$.

V _{sostén}	- 90 mV			- 40 mV		
Genotipo	$\alpha 10^{+/+}$	$\alpha 10^{+/-}$	$\alpha 10^{-/-}$	$\alpha 10^{+/+}$	$\alpha 10^{+/-}$	$\alpha 10^{-/-}$
I. Amplitud rta a ACh (pA)	200 ± 48	517 ± 50	----	236 ± 44	278 ± 80	----
II. Fracción de células sensibles a ACh	3/3	3/3	0/7	3/3	3/3	0/8
III. Fracción de células con I sináptica	3/3	3/3	0/8			

Resumen de las respuestas sinápticas medidas en las CCl_s de ratones $\alpha 10^{+/+}$, $\alpha 10^{+/-}$ y $\alpha 10^{-/-}$. En la tabla se indican la amplitud promedio de las corrientes producidas por la aplicación exógena de ACh 100 μ M a V_{sostén} de -90 y -40 mV (I). Además, se indica la fracción de CCl_s que presentaron respuestas a la ACh (II) y la fracción de CCl_s que presentaron actividad sináptica durante la aplicación de una solución de K⁺ 40 mM (III). Los valores se expresan como media ± S.E.M.

2. Respuestas colinérgicas en CCEs que carecen de la subunidad $\alpha 10$.

El mismo análisis de las respuestas colinérgicas fue llevado a cabo en las CCEs de animales entre P10-P13. Los animales salvajes y heterocigotas para la delección presentaron respuestas colinérgicas robustas activadas por la aplicación exógena de ACh, así como abundante actividad sináptica inducida por el aumento del potasio extracelular (Fig. 11, Tabla II). En los animales $\alpha 10^{-/-}$, a diferencia de lo encontrado en las CCl_s, fue posible evocar respuestas colinérgicas, pero en una proporción baja de las células (Fig. 11 Tabla II).

Tabla II. Corrientes colinérgicas en CCEs de ratones $\alpha 10^{+/+}$, $\alpha 10^{+/-}$ y $\alpha 10^{-/-}$.

V _{sostén}	- 90 mV			- 40 mV		
Genotipo	$\alpha 10^{+/+}$	$\alpha 10^{+/-}$	$\alpha 10^{-/-}$	$\alpha 10^{+/+}$	$\alpha 10^{+/-}$	$\alpha 10^{-/-}$
I. Amplitud (pA)	103 ± 24	76 ± 40	13	104 ± 46	171 ± 37	30 ; 58
II. Fracción de células sensibles a ACh	6/7	3/4	1/11	12/13	16/17	2/24
III. Fracción de células con I sináptica	8/13	15/16	0/24			
IV. Fracción de células sensibles a ACh (K ⁺ 40mM)	10/11	15/15	11/24			

Resumen de las respuestas sinápticas medidas en las CCEs de los ratones $\alpha 10^{+/+}$, $\alpha 10^{+/-}$ y $\alpha 10^{-/-}$. En la tabla se indican la amplitud promedio de las corrientes producidas por la aplicación exógena de ACh 1 mM a V_{sostén} de -90 y -40 mV (I). Además, se indica la fracción de CCEs que presentaron respuestas a la ACh (II), actividad sináptica (III) o respuesta a la ACh (IV) durante la aplicación de una solución de K⁺ 40 mM.

Si bien estos resultados sugieren que estas células expresan receptores $\alpha 9$ homoméricos funcionales, estas corrientes también podrían deberse a la expresión compensatoria de algún otro tipo de receptor colinérgico. Para descartar esta posibilidad, se estudió la capacidad de la nicotina para activar respuestas colinérgicas en estas células. Cabe mencionar que esta droga actúa como agonista de todos los nAChR con excepción de los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001). Como se observa en la figura 12, la nicotina, a una concentración de 300 μM , no fue capaz de activar respuestas en las CCEs de los animales $\alpha 10^{-/-}$ que sí respondían a la ACh. Además, no fue posible activar respuestas colinérgicas en las CCEs de los animales que carecen de la subunidad $\alpha 9$, sustentando la hipótesis de que las corrientes colinérgicas registradas en las CCEs se deben a la activación de nAChRs $\alpha 9$ homoméricos.

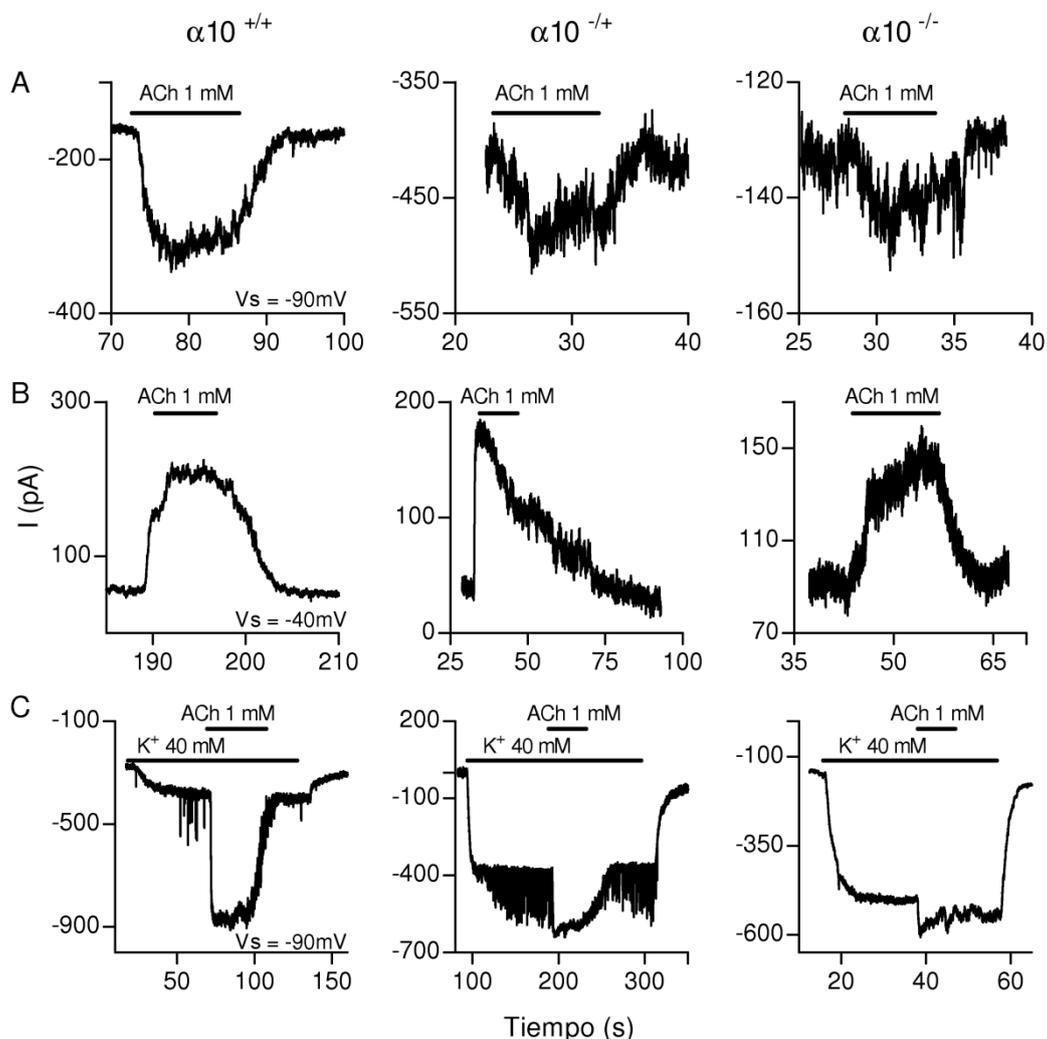


Figura 11. **Respuesta colinérgica en las CCEs de los ratones $\alpha 10^{-/-}$.** En A y B se muestran las respuestas producidas en las CCEs ante la aplicación de ACh 1 mM a $V_{\text{sostén}}$ de -90 y -40 mV, respectivamente, para ratones $\alpha 10^{+/+}$ (paneles izquierdos), $\alpha 10^{+/-}$ (paneles centrales) y $\alpha 10^{-/-}$ (paneles derechos) de edades P10-P13. Las corrientes colinérgicas resultaron de menor amplitud y más infrecuentes en los animales $\alpha 10^{-/-}$ (ver Tabla II). C, La aplicación de una solución rica en K^+ (40 mM) produjo actividad sináptica detectable en las CCEs de los ratones $\alpha 10^{+/+}$ y $\alpha 10^{+/-}$. Estas corrientes no se observaron en los ratones $\alpha 10^{-/-}$. En las CCEs de los ratones de los tres genotipos, la aplicación de ACh 1 mM conjuntamente con la solución rica en potasio, produjo corrientes colinérgicas de una magnitud mayor que las obtenidas con ACh 1 mM y KCl 5.8 mM.

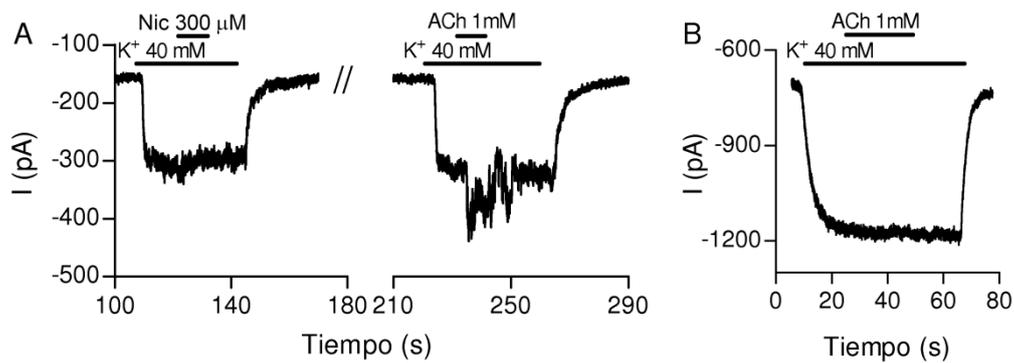


Figura 12. **Respuesta a la ACh y a la nicotina en las CCEs de los ratones $\alpha 10^{-/-}$** A, Las CCEs de los ratones que carecen de la subunidad $\alpha 10$ respondieron a la ACh 1 mM pero no respondieron a la aplicación de nicotina 300 μ M (n=3). B, La aplicación de ACh 1 mM no tuvo efecto en las CCEs de los ratones que carecen de la subunidad $\alpha 9$ (n=14 CCEs). El $V_{\text{sostén}}$ fue -90 mV en ambos casos.

3. Caracterización de un ratón transgénico para la subunidad $\alpha 10$.

Para evaluar la función de la subunidad $\alpha 10$ en el establecimiento y la desaparición de la modulación eferente transitoria a las CClis se utilizó un ratón transgénico para la subunidad $\alpha 10$. Dicho animal posee un transgen constituido por ADN copia de la subunidad $\alpha 10$ bajo el promotor del factor de transcripción *Pou4f3* (ratones O $\alpha 10$) (Taranda et al., 2009b). Este promotor activa la expresión de genes en las células ciliadas de ratones desde el día embrionario 13.5 hasta la adultez (Sage et al., 2006). Si bien la correcta expresión del mensajero para esta subunidad y su localización fueron verificadas mediante técnicas de RT-PCR e hibridaciones *in-situ* (apéndice 2), la falta de anticuerpos efectivos contra esta subunidad dificultó la confirmación de la correcta traducción de dicho transgen en una proteína funcional. Para abordar este problema, se eligió como estrategia el rescate del fenotipo de animales $\alpha 10^{-/-}$ mediante el cruzamiento con ratones O $\alpha 10$. Como se mostró en la sección anterior, las CClis neonatales de animales salvajes responden en forma robusta a la aplicación exógena de ACh (Fig. 13A, panel izquierdo), estas respuestas se encuentran acopladas al canal SK2 (Fig. 13B, panel izquierdo) y además presentan actividad sináptica en respuesta al aumento en el potasio extracelular (Fig. 13C-D, panel izquierdo). Como se demostró previamente, todo este tipo de respuestas se encuentran ausentes en las CClis de los animales $\alpha 10^{-/-}$ (Fig. 13 panel central). Sin embargo, la cruce de estos animales con animales O $\alpha 10$, y la consecuente incorporación del transgen para la subunidad $\alpha 10$, restauró completamente tanto la respuesta colinérgica como la actividad sináptica en las CClis (Fig. 13 panel derecho). Tanto la forma como la magnitud de todas las respuestas registradas en los animales $\alpha 10^{-/-}$ x OE $\alpha 10$ son similares a las de los animales salvajes (Fig. 13 y Tabla III). Se obtuvieron resultados similares en las CCEs (Fig. 14). Estos resultados demuestran que el transgen *Pou4f3- $\alpha 10$* es efectivamente traducido, conformando

una subunidad $\alpha 10$ funcional capaz de ensamblarse con subunidades $\alpha 9$ endógenas tanto en las CCl_s como en las CCEs.

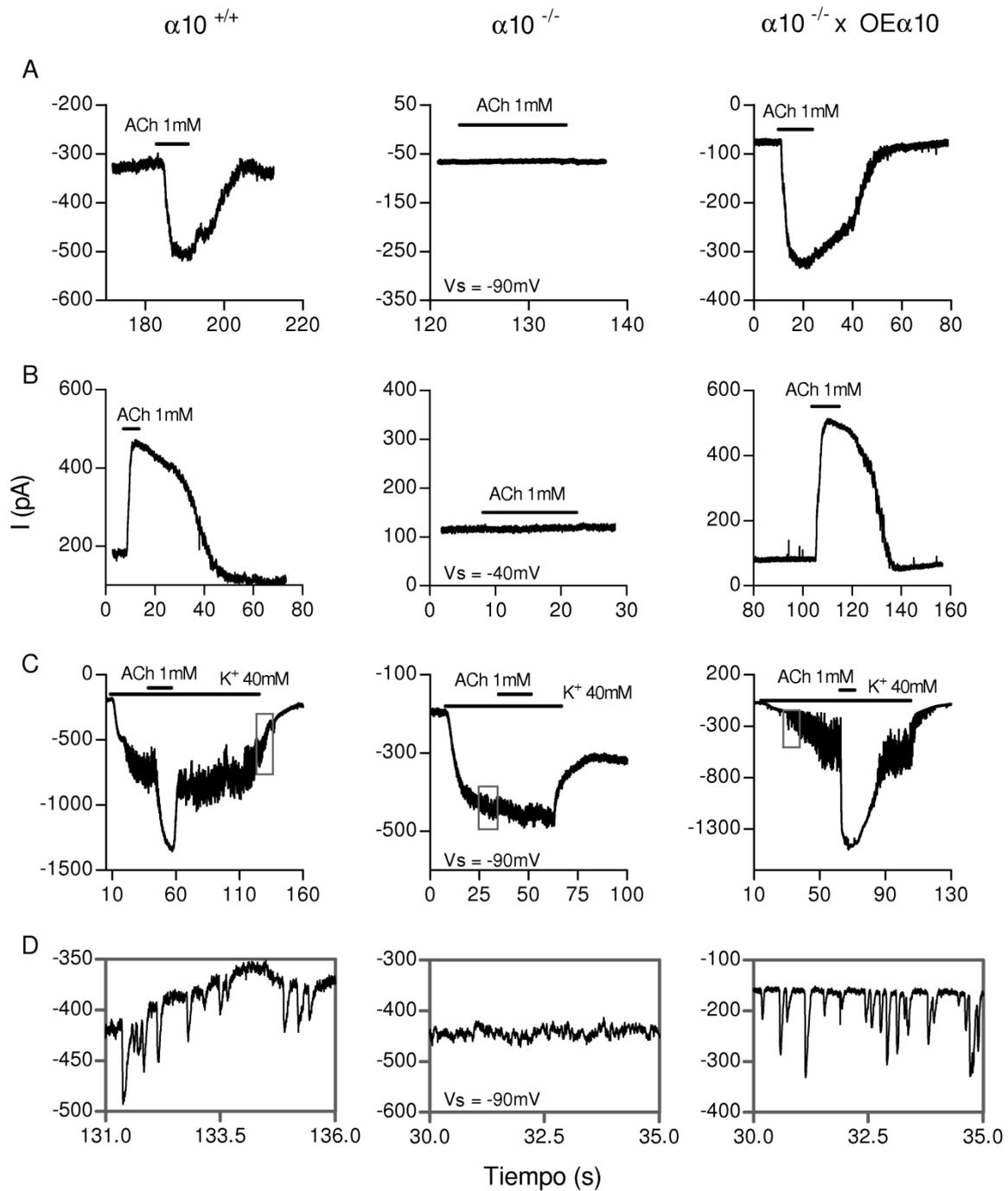


Figura 13. **Rescate de las respuestas colinérgicas en las CCl_s de los ratones $\alpha 10^{-/-}$ por retrocruza con los ratones OE $\alpha 10$.** Se evaluaron las respuestas a la aplicación de ACh 1 mM a $V_{\text{sostén}}$ de -90 (A) y de -40 mV (B). Notar la ausencia de respuestas colinérgicas en los ratones $\alpha 10^{-/-}$, las cuales se recuperaron al retrocruzar estos animales con los ratones transgénicos OE $\alpha 10$. C, Como consecuencia del aumento de potasio extracelular se produjo un aumento en la magnitud de las corrientes colinérgicas y en la frecuencia de liberación de vesículas sinápticas de los terminales eferentes. Se observaron respuestas colinérgicas y actividad sináptica en los ratones salvajes (panel izquierdo) pero en los $\alpha 10^{-/-}$ no se observaron respuestas colinérgicas ni actividad sináptica (panel central). Tanto la respuesta colinérgica como la actividad sináptica se recuperaron en los ratones $\alpha 10^{-/-} \times OE\alpha 10$. En D se muestra la actividad sináptica correspondiente al recuadro en C en una escala de tiempo expandida.

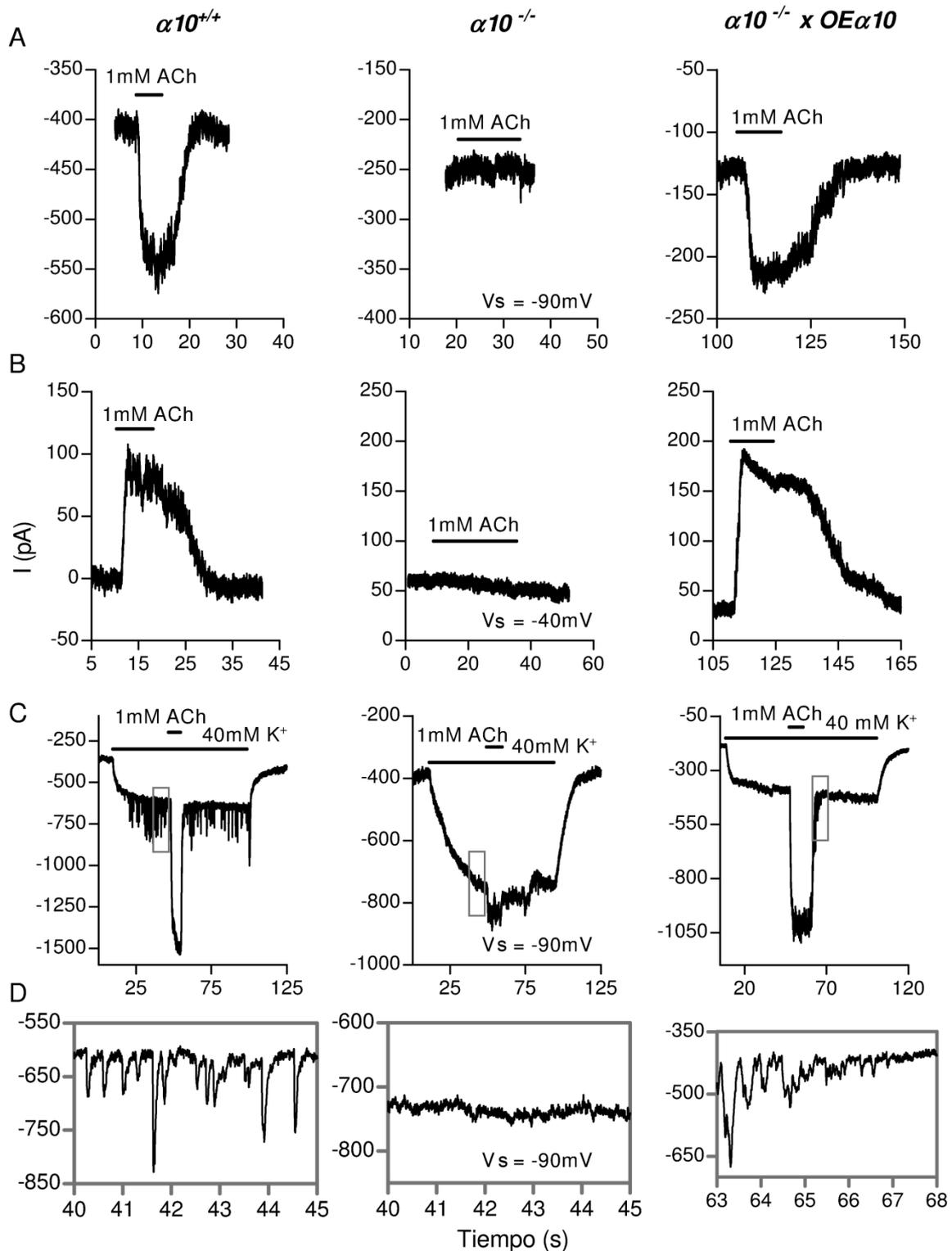


Figura 14. **Rescate de las respuestas colinérgicas en las CCEs de los ratones $\alpha10^{-/-}$ por retrocruza con los ratones $OE\alpha10$.** La aplicación de ACh 1 mM produjo corrientes a $V_{sostén}$ de -90 (A) y -40 mV (B) en las CCEs de los ratones salvajes (panel izquierdo). Estas corrientes no se observaron en los ratones $\alpha10^{-/-}$ (panel central) pero fueron recuperadas al retrocruzar estos animales con los ratones $OE\alpha10$ (panel derecho). C, La aplicación de una solución de K^+ 40 mM produjo actividad sináptica en los ratones $\alpha10^{+/+}$ y $\alpha10^{-/-} \times OE\alpha10$ pero no en los ratones $\alpha10^{-/-}$. Asimismo, la aplicación de ACh 1 mM en esta solución rica en K^+ , produjo un aumento en la magnitud de las corrientes colinérgicas en los ratones $\alpha10^{+/+}$ y $\alpha10^{-/-} \times OE\alpha10$ mientras que en los ratones $\alpha10^{-/-}$ se observó una pequeña respuesta ante la aplicación de ACh 1 mM. En D se muestra la actividad sináptica correspondiente al recuadro en C en una escala de tiempo expandida.

Tabla III. Corrientes colinérgicas en CCl's de ratones $\alpha 10^{+/+}$, $\alpha 10^{-/-}$, OE $\alpha 10$ y $\alpha 10^{-/-} \times OE \alpha 10$.

$V_{\text{sostén}}$	- 90 mV				- 40 mV		
	$\alpha 10^{+/+}$	OE $\alpha 10$	$\alpha 10^{-/-}$	$\alpha 10^{-/-} \times OE \alpha 10$	$\alpha 10^{+/+}$	$\alpha 10^{-/-}$	OE $\alpha 10$
Amplitud rta a ACh (pA)	250±57	367±43	---	298±24	281±47	---	411±67
Número de células	3	9	7	3	3	8	9

Resumen de las respuestas sinápticas obtenidas en las CCl's de los ratones $\alpha 10^{+/+}$, OE $\alpha 10$, $\alpha 10^{-/-}$ y $\alpha 10^{-/-} \times OE\alpha 10$. En la tabla se indican la amplitud promedio de las corrientes producidas por la aplicación exógena de ACh 1 mM a $V_{\text{sostén}}$ de -90 y -40 mV y el número de células incluidas en cada promedio.

4. Respuestas colinérgicas en las CCl's de ratones OE $\alpha 10$ luego del comienzo de la audición.

Dado que las CCl's continúan expresando el ARN mensajero de la subunidad $\alpha 9$ luego del comienzo de la audición, nos preguntamos si la presencia continua de la subunidad $\alpha 10$ en animales OE $\alpha 10$ podría prevenir la pérdida de la sensibilidad a la ACh en estas células. Para responder esta pregunta realizamos registros en las CCl's de animales OE $\alpha 10$ antes (P9-11) y después (P17-20) del comienzo de la audición.

En animales neonatos las CCl's respondieron a la ACh a $V_{\text{sostén}}$ de -90 mV y -40 mV, indicando tanto una efectiva activación del canal nicotínico como un correcto acople con el receptor SK2 (Fig. 15A-B, panel superior). La amplitud media de las corrientes medidas en los ratones OE $\alpha 10$ no difirieron significativamente ($p > 0.05$) de las reportadas para los animales salvajes (Tabla III). Además, se observó una importante actividad sináptica cuando se bañó la preparación con una solución rica en potasio (Fig. 15C-D, panel superior), así como un aumento en la magnitud de la respuesta evocada por la ACh (Fig. 15C, panel superior). Cuando las mismas mediciones fueron realizadas en animales de P17-20 no se observaron corrientes activadas por la aplicación de ACh exógena ni fue posible observar corrientes sinápticas (Fig. 15A-D, panel inferior). Este resultado indica que la expresión sostenida de la subunidad $\alpha 10$ no es suficiente para mantener la respuesta sináptica en las CCl's luego del comienzo de la audición.

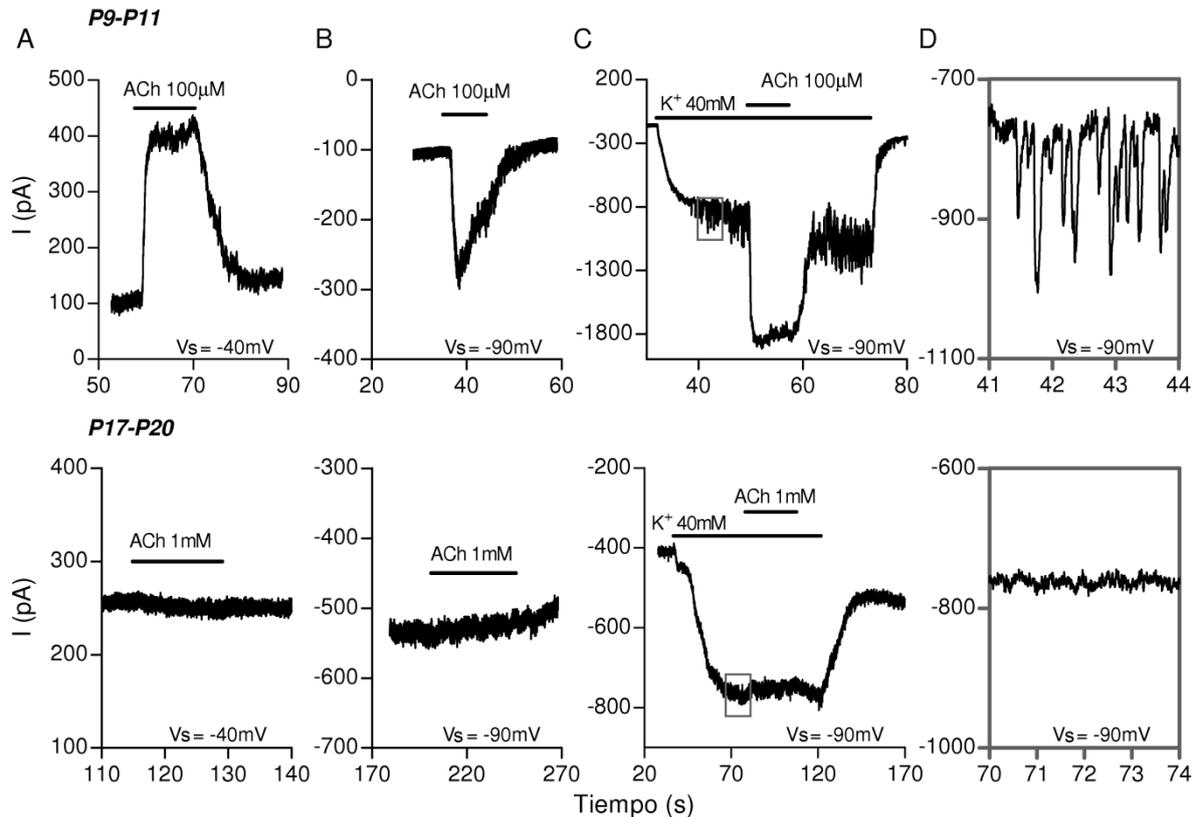


Figura 15. En los ratones OEt10 no se detectan respuestas colinérgicas en las CCI luego del comienzo de la audición. A y B, Registros representativos obtenidos en las CCI en respuesta a la aplicación de ACh en animales OEt10 a $V_{\text{sostén}}$ de -40 y -90 mV, respectivamente. Notar que las respuestas colinérgicas presentes en las CCI de los ratones en P9-11 (paneles superiores) desaparecieron luego del comienzo de la audición incluso aplicando ACh a una concentración 10 veces mayor (paneles inferiores). C, Antes del comienzo de la audición, el aumento del K^+ extracelular produjo un aumento en la frecuencia de las corrientes sinápticas y también un aumento en la amplitud de la respuesta colinérgica. Esto último se debe al cambio del potencial de equilibrio del K^+ (panel superior). Tanto la actividad sináptica como la respuesta colinérgica desaparecieron luego del comienzo de la audición (panel inferior). D, Se observan los trazos contenidos en los recuadros grises en C en una escala temporal expandida.

5. Actividad del canal SK2 luego del comienzo de la audición en animales OEt10.

El cambio fenotípico de las CCI luego del comienzo de la audición incluye, en paralelo con la desaparición de la subunidad $\alpha 10$, una disminución en la expresión de canales SK2 (Katz et al., 2004). Decidimos evaluar entonces si en las CCI de los ratones OEt10 se observaba este mismo cambio de expresión de los canales SK2 luego del comienzo de la audición. Dado que la falta de respuesta colinérgica no permite evaluar la actividad de los canales SK2 a través de la activación de los receptores colinérgicos, evaluamos la funcionalidad de estos canales mediante la activación de canales de calcio voltaje-dependientes (CCVD). Para esto se realizaron pulsos despolarizantes de 4 segundos a partir de un voltaje de sostén de -84 mV y se midieron las corrientes activadas a distintos

voltajes (ver protocolo en Fig. 16A). Para identificar el componente de las corrientes llevadas por el canal SK2, se compararon las corrientes producidas con (Fig 14B, trazos grises) y sin (Fig. 16B, trazos negros) aplicación de 300 nM de apamina, un bloqueante específico de los canales SK2 (Kohler et al., 1996). La corriente mediada exclusivamente por el canal SK2 se obtuvo por la sustracción entre las corrientes medidas en ambas condiciones (Fig. 16C). Para favorecer la activación de los canales SK2, se redujo la concentración de EGTA a 1 mM en la solución intracelular y se elevó la concentración de Ca^{2+} extracelular a 1.3 mM. Cuando se realizó este protocolo en animales salvajes de 9 días, se observó la activación de una corriente saliente lenta (Fig. 16B, panel izquierdo) que pudo ser bloqueada por la apamina, indicando la presencia de canales SK2 funcionales. En la figura 16 C se observa la corriente mediada exclusivamente por el canal SK2 ($n=9$ células, 9 animales). Como se esperaba, la aplicación de este protocolo en animales salvajes luego del comienzo de la audición resultó en la activación de corrientes que fueron completamente insensibles a la apamina (Fig. 16B-C, panel central, $n=5$ células, 5 animales), indicando la ausencia de canales SK2 funcionales. En forma similar, las CClIs de los ratones O α 10 no mostraron respuestas sensibles a la apamina luego del comienzo de la audición (Fig. 16B-C, panel derecho, $n=4$ células, 4 animales).

Para cuantificar estos resultados se midió la magnitud de las corrientes sensibles a la apamina activadas por el pulso despolarizante de +16 mV. Se midió tanto la amplitud máxima de las corrientes activadas (I_{max}) medida a los 2s del comienzo del pulso (indicado por la línea punteada en a, Fig. 16B) como la amplitud de las corrientes de cola (I_{cola}) medida 0.5 s luego de la terminación del mismo (indicado con b en la Fig. 16B). En las CClIs inmaduras de los ratones salvajes tanto la I_{max} como la I_{cola} de las componentes mediadas por SK2, resultaron significativamente distintas de cero (312 ± 72 y 72 ± 21 pA, respectivamente $p \leq 0.01$, test de Student de una muestra). En las CClIs luego del comienzo de la audición, tanto en los animales salvajes como en los O α 10, estas corrientes no difirieron significativamente de cero ($p \geq 0.3$), confirmando la ausencia de canales SK2 funcionales luego del comienzo de la audición en cualquiera de estos animales. Estos resultados indican que la expresión sostenida de la subunidad α 10 tampoco previene el decaimiento de la expresión de canales del tipo SK2 durante la maduración del órgano de Corti.

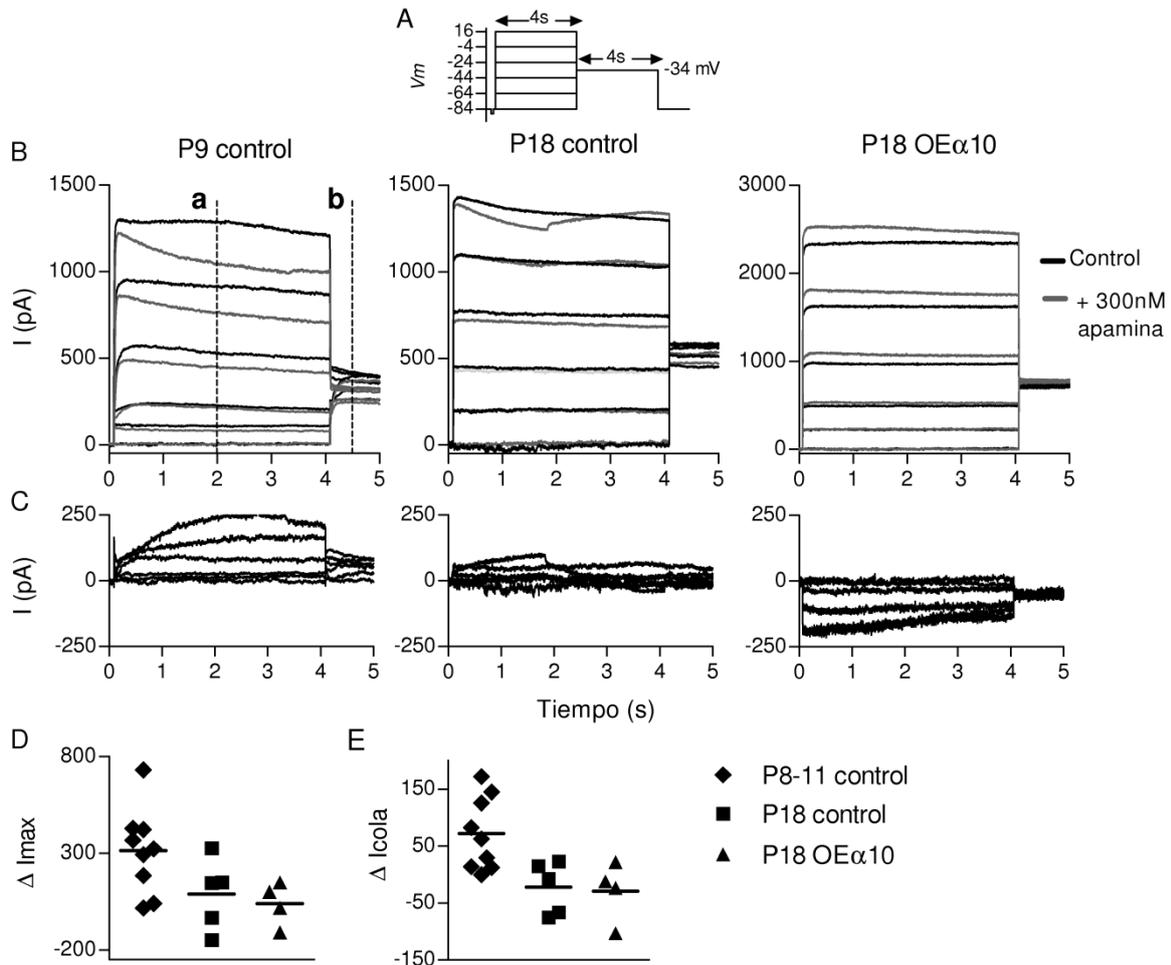


Figura 16. En los ratones OE α 10 no se detecta actividad de los canales SK2 luego del comienzo de la audición. A, Detalle del protocolo utilizado para medir las corrientes voltaje-dependientes de activación lenta en las CCI. Las corrientes fueron activadas mediante pulsos de voltaje de 4 segundos que variaron entre -84 y +16 mV, con incrementos de 20 mV desde un $V_{sostén}$ de -84 mV. B, Respuestas representativas de las corrientes activadas por este protocolo en las CCI en ausencia (trazos negros) o presencia (trazos grises) de apamina 300 nM en la solución extracelular. Se muestran respuestas representativas obtenidas en un ratón salvaje en P9 (panel izquierdo, n=9 CCI), en un ratón salvaje en P18 (n=5 CCI, panel central) y en un animal OE α 10 en P18 (n=4CCI, panel derecho). C, La corriente mediada por el canal SK2 obtenida como la resta entre las corrientes medidas en presencia de apamina y las corrientes totales, se encontró presente en animales salvajes en P9 pero no en los animales salvajes ni en los OE α 10 en P18. D y E Amplitud de las corrientes sensibles a la apamina obtenidas a +16 mV y medidas a los 2 segundos durante el pulso (a en B) y amplitud de las corrientes de cola para este voltaje, medidas a los 0.5 segundos luego de la terminación del pulso (b en B).

6. Efecto de la sobreexpresión conjunta de las subunidades α 9 y α 10 en el desarrollo de la respuesta colinérgica en las CCI.

Luego nos preguntamos si el hecho de que la sobreexpresión de α 10 no fuera suficiente para mantener la respuesta colinérgica no podría deberse a la expresión deficiente de la subunidad α 9 luego del comienzo de la audición. Para poner a prueba esta hipótesis utilizamos una línea de

ratones transgénicos para la subunidad $\alpha 9$ contruidos en forma análoga a los de la línea OE $\alpha 9$, es decir, compuesto de ADN copia de la subunidad $\alpha 9$ bajo el promotor *Pou4f3*.

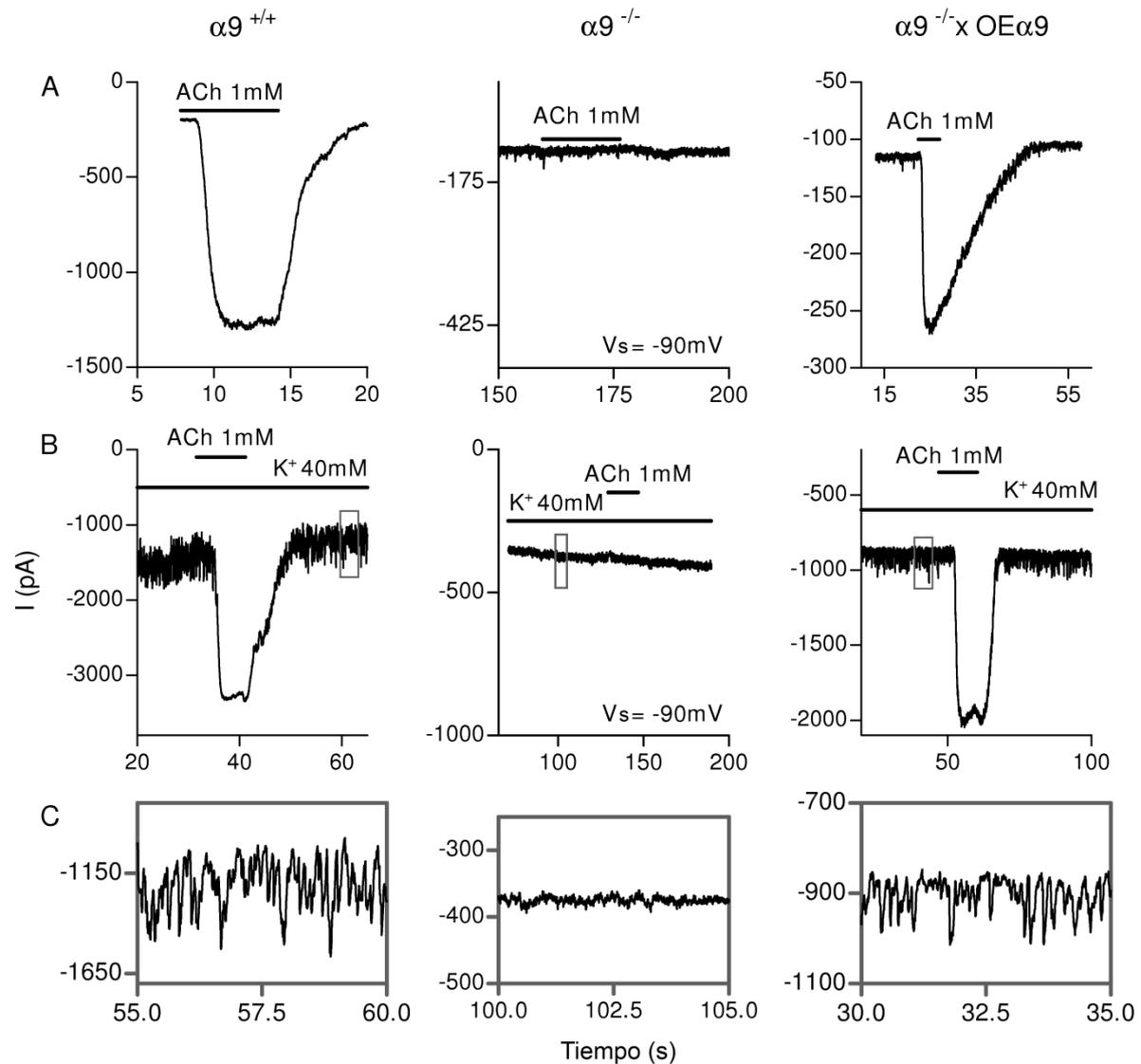


Figura 17. **Rescate de las respuestas colinérgicas en las CCl de los ratones $\alpha 9^{-/-}$ por retrocruza con los ratones OE $\alpha 9$.** Se evaluaron las respuestas a la ACh (1 mM) a un $V_{sostén}$ de -90 (A). Notar la ausencia de respuestas colinérgicas en los ratones $\alpha 9^{-/-}$ (P10-12) que se recuperaron cuando se los retrocruzó con los ratones transgénicos OE $\alpha 9$. B, En los ratones salvajes, en presencia de K^+ 40 mM se observaron corrientes sinápticas y también corrientes activadas por ACh 1 mM (panel izquierdo) mientras que en los ratones $\alpha 9^{-/-}$ no se observaron respuestas colinérgicas ni actividad sináptica (panel central). Tanto la respuesta colinérgica como la actividad sináptica se recuperó en los ratones $\alpha 9^{-/-} \times OE\alpha 9$. En C se muestra la actividad sináptica correspondiente al recuadro en C en una escala de tiempo expandida.

En primera instancia realizamos un control de la correcta traducción del transgen utilizando nuevamente la estrategia de rescate del fenotipo con una línea de ratones que carecen de la subunidad $\alpha 9$ ($\alpha 9^{-/-}$, (Vetter et al., 1999). Como se observa en la figura 17 las CCl neonatales de los ratones $\alpha 9^{-/-}$ carecen totalmente tanto de respuestas a la ACh como de actividad sináptica (Fig. 17, panel central). Esta actividad es restaurada a los niveles del control (Fig. 17, panel izquierdo) en

animales $\alpha 9^{-/-}$ que poseen la subunidad transgénica por cruzamiento con la cepa O α 9 (Fig. 17, panel derecho), indicando que el transgen de la subunidad $\alpha 9$ es correctamente traducida en las CClIs.

A continuación, realizamos cruzamientos entre los ratones O α 9 y los O α 10 y volvimos a evaluar la sensibilidad colinérgica en las CClIs en animales que expresaban ambas subunidades en forma constitutiva. Como era de esperarse, fue posible registrar tanto respuestas a la ACh como actividad sináptica en el 100% de las CClIs neonatales estudiadas (n=5, datos no mostrados). Sin embargo, al igual que sucedía con el animal O α 10, la respuesta colinérgica se perdió completamente luego del comienzo de la audición en los animales O α 9xO α 10 (Fig. 18, n=8). Estos resultados confirman que forzar la expresión de las subunidades nicotínicas no es suficiente para evitar la pérdida de la respuesta colinérgica en las CClIs luego del comienzo de la audición.

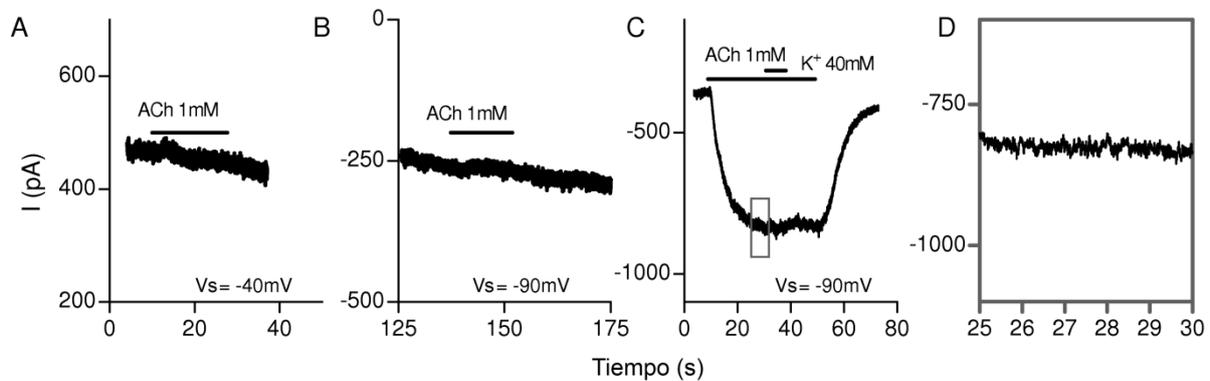


Figura 18. **Ausencia de respuestas colinérgicas en las CClIs de los ratones O α 9 x O α 10 luego del comienzo de la audición.** No se observaron respuestas ante la aplicación de ACh 1 mM en las CClIs de los ratones O α 9 x O α 10 en P19 a $V_{sostén}$ de -40 (A) y -90 mV (B), ni mediante la aplicación de ACh 1 mM en una solución extracelular con K^+ 40 mM (C). D, se ilustra la ausencia de actividad sináptica correspondiente al recuadro gris en C en una escala de tiempo expandida.

Discusión

Como describimos previamente, la sinapsis colinérgica entre las fibras eferentes del sistema MOC y las células ciliadas cocleares es altamente compleja y su funcionamiento depende del correcto acople funcional de varias proteínas. Además, la expresión de todas estas moléculas involucradas varía en forma concertada en el activo periodo de remodelación sináptica que acompaña el desarrollo final de órgano de Corti (Simmons, 2002; Katz et al., 2004; Murthy et al., 2009b). Los resultados presentados en este capítulo nos han permitido evaluar la participación de la subunidad $\alpha 10$ en este proceso mediante la utilización de distintas líneas de ratones modificados genéticamente.

Por un lado, si bien se demostró que en ausencia de la subunidad $\alpha 10$ la subunidad $\alpha 9$ es capaz de formar canales funcionales en las CCEs, las corrientes a través de estos canales resultaron muy infrecuentes y de amplitudes muchos menores a las obtenidas en los animales salvajes (Tabla II). El hecho de que las corrientes colinérgicas observadas en las CCEs de los animales KO $\alpha 10$ presentaran amplitudes menores que las de los animales salvajes, coincide con la observación de que las respuestas del receptor recombinante $\alpha 9$ son 100 veces menores que las del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyhen et al., 2001). Cuando estas respuestas fueron medidas a un $V_{\text{sostén}}$ de -40 mV se observó una corriente saliente mediada probablemente por el canal SK2. Esto indicaría que a pesar de la baja amplitud de las respuestas, la corriente de calcio entrante a través del receptor $\alpha 9$ es suficiente para lograr la activación de los canales SK2, sugiriendo que aún en ausencia de la subunidad $\alpha 10$, el nAChR $\alpha 9$ mantiene su ubicación cercana a los canales SK2 en la membrana (Oliver et al., 2000). Sin embargo, no fue posible observar actividad sináptica en las CCEs de los ratones KO $\alpha 10$. Esto podría deberse a una localización extrasináptica de los receptores $\alpha 9$ en los ratones KO $\alpha 10$ o simplemente a que dichas corrientes resulten demasiado pequeñas para ser detectadas con nuestro sistema de registro. Una causa alternativa de la falta de respuestas sinápticas en estos animales podría ser una disfunción de los terminales sinápticos eferentes. De hecho, un análisis inmunohistoquímico en los animales KO $\alpha 10$ mostró que los terminales eferentes contactando a las CCEs de animales adultos presentan un tamaño 20% mayor que los terminales sinápticos de los animales salvajes y un menor número de terminales sinápticos por célula (Vetter et al., 2007). Resultados similares pero más extremos se han descrito para los ratones mutantes nulos para la subunidad $\alpha 9$, sugiriendo que la actividad colinérgica en las células ciliadas cumple una función relevante en el correcto desarrollo de su inervación (Vetter et al., 1999). Más aún, se ha demostrado que en la cóclea de los ratones $\alpha 9^{-/-}$ hay una alteración en la expresión de las proteínas de adhesión necesarias para la formación de los contactos sinápticos (NCAM, N-caderina, β -catenina y neuroligina 1) y de las proteínas presinápticas

involucradas en la liberación del neurotransmisor (CSP, SNAP25, sinapsina 1 y sinaptofisina) (Murthy et al., 2009a).

En las CCI neonatales de los ratones KO α 10, sin embargo, no fue posible obtener respuestas ante la aplicación de ACh. La diferencia entre estos dos tipos celulares sugiere la existencia de un proceso diferente de ensamblado del sitio activo o, simplemente, que en las CCI el nivel de expresión de la subunidad α 9 no es suficientemente alto como para dar respuestas medibles con nuestro sistema de registro.

Estos resultados nos permiten concluir que la subunidad α 10 es un componente fundamental de los receptores colinérgicos de las células ciliadas de los mamíferos. Por otro lado, en los animales KO α 10 se estudió la inhibición de las emisiones otoacústicas por activación eléctrica de las fibras eferentes. Estos experimentos demostraron una total falta de efecto del sistema eferente sobre la actividad de las CCEs (Vetter et al., 2007), indicando que la pequeña respuesta colinérgica mediada por la subunidad α 9 no es suficiente para sostener su función fisiológica. A su vez, estos resultados sugieren que la disminución de la expresión de la subunidad α 10 en las CCI durante el desarrollo podría ser responsable de la desaparición de la respuesta colinérgica luego del comienzo de la audición. Según esta hipótesis el mantenimiento de la expresión de esta subunidad debería evitar la pérdida de la sensibilidad a la ACh en las CCI. Contrariamente a lo esperado, las CCI de ratones que expresaban la subunidad α 10 en forma constitutiva perdieron completamente la capacidad de responder a la ACh luego del comienzo de la audición al igual que los ratones salvajes. Asimismo, la regulación de la expresión del canal SK2 durante el desarrollo también se mantuvo en los ratones OE α 10. La posibilidad de que este resultado se debiera a una incorrecta expresión de la subunidad transgénica fue descartada mediante controles en los cuales se rescató el fenotipo de los animales KO α 10 mediante su cruzamiento con ratones OE α 10. Más aún, la sobreexpresión conjunta de la subunidad α 9 y la subunidad α 10 en las CCI no fue capaz de mantener las respuestas colinérgicas luego del comienzo de la audición en estas células. Todos estos resultados sugieren que la correcta expresión de estas subunidades se encuentra regulada por algún otro factor cuya expresión varía también a lo largo del desarrollo. Dado que en nuestro modelo experimental la expresión de las subunidades se encuentra forzada, se podría suponer que este factor regulatorio estaría controlando el correcto ensamblado, tráfico o anclado de estas subunidades. Se ha demostrado que el ensamblado en el retículo endoplasmático y la inserción en membrana de otros receptores nicotínicos, como el nAChR α 7, se encuentra regulada por una proteína chaperona llamada Ric-3 (Millar, 2008). Si bien no se han encontrado este tipo de proteínas accesorias que interactúen con el

nAChR $\alpha 9\alpha 10$, es esperable que también este receptor se encuentre sujeto a una regulación similar. En este sentido, el hecho de que la respuesta colinérgica en las células ciliadas dependa de la asociación cercana de este receptor con otras moléculas postsinápticas como el canal SK2 y, quizás, con proteínas asociadas a la cisterna, sugiere la existencia de un complejo macromolecular que podría estar regulado en forma conjunta. A favor de este modelo, se demostró que en ratones que carecen del gen que codifica para el canal SK2 no sólo se pierden las corrientes de potasio mediadas por este canal, sino que tanto las CCIs como las CCEs presentan una total ausencia de sensibilidad colinérgica a pesar de que los niveles del mensajero para las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ no se encuentran alteradas (Kong et al., 2008). Si el ensamblado de este complejo dependiera de la presencia del canal SK2 explicaría por qué luego del comienzo de la audición, cuando la expresión del SK2 ha cesado (Katz et al., 2004), la sobreexpresión de ambas subunidades nicotínicas no es efectiva para la restauración de la respuesta colinérgica.

Capítulo II

Propiedades funcionales de la sinapsis entre las fibras del sistema MOC y las CCEs.

Introducción

El sistema eferente olivococlear reduce la ganancia del sistema auditivo mediante una modulación directa sobre las CCEs. La mayor información respecto a cómo el sistema MOC ejerce dicha inhibición proviene de estudios en los cuales se activan eléctricamente las fibras MOC y se mide su efecto en distintos parámetros de la función auditiva. A partir de este tipo de estudios se ha determinado, por ejemplo, que el grado de inhibición de la ganancia coclear aumenta casi linealmente con la frecuencia de la estimulación de las fibras MOC (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan, 1987). Sin embargo, se desconocen aún cuáles son los eventos sinápticos y moleculares que subyacen a esta modulación.

La comprensión de este fenómeno implica entender cuál es el efecto de los distintos patrones de activación de las fibras MOC en las respuestas inhibitorias de las CCEs y, posteriormente, qué consecuencias tiene la activación de estas respuestas en la función de amplificación de las CCEs. Para investigar este tema, caracterizamos en primer lugar las propiedades de la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs. Si bien la respuesta de las células ciliadas ante la activación de las fibras eferentes ha sido previamente caracterizada en células ciliadas del sistema auditivo de la tortuga (Art et al., 1984) y en CCI neonatales de la rata (Goutman et al., 2005), estos resultados son el primer informe sobre este tipo de respuestas en las CCEs, el blanco final de las fibras eferentes en los mamíferos adultos.

Resultados

1. Características farmacológicas y biofísicas de las corrientes sinápticas en las CCEs en respuesta a la estimulación eléctrica de las fibras eferentes del sistema MOC.

Para estudiar las corrientes postsinápticas se realizaron registros de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* en CCEs de la vuelta apical del órgano de Corti provenientes de ratones de edades P11-P13. La estimulación eléctrica de las fibras MOC con un electrodo bipolar ubicado en la zona modiolar de la preparación (Fig. 19A) evocó corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSC) en las CCEs sostenidas a un voltaje de -40 mV (Fig. 19B). Estas corrientes fueron totalmente inhibidas cuando se aplicó a la preparación el bloqueante específico de los canales de sodio voltaje-dependientes, tetrodotoxina (TTX) 1 μ M (Fig. 19C). Esto confirma que las IPSC son consecuencia de la liberación de neurotransmisor producida por la generación de un potencial de acción en las fibras MOC. Las corrientes sinápticas evocadas en las CCEs fueron entrantes cuando las células fueron sostenidas a voltajes entre -100 y -80 mV, mientras que a $V_{\text{sostén}}$ más despolarizados, comenzaron a mostrar una segunda componente más lenta y saliente (Fig. 19D, Fig. 19F panel superior). Se observó un fenómeno similar al medir los potenciales postsinápticos evocados donde, partiendo de potenciales de membrana más despolarizados que -80 mV, la respuesta era bifásica, compuesta por un fase despolarizante rápida y una fase hiperpolarizante lenta cuya magnitud aumentó con el potencial de membrana (Fig. 19E y Fig. 19F panel inferior). La relación corriente-voltaje (I-V) del pico de la amplitud máxima de las eIPSCs resultó casi lineal entre -100 y -40 mV, presentando un potencial de reversión de -75 mV (Fig. 19G), un valor cercano al del potencial de reversión del potasio en nuestras condiciones de registro (-82 mV). Tanto el hecho de que estas corrientes sean bifásicas como su potencial de reversión, son consistentes con lo ya descrito para las corrientes activadas por la ACh en las células ciliadas bajas del sistema auditivo del pollo (Fuchs y Murrow, 1992) y en las CClIs (Glowatzki y Fuchs, 2000; Gomez-Casati et al., 2005) y las CCEs de los mamíferos (Housley y Ashmore, 1991; Dulong y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Nenov et al., 1996b, a; Oliver et al., 2000). Como se indicó en la introducción, en estos sistemas se ha determinado que la fase rápida de la respuesta nicotínica se debe a la apertura de canales nicotínicos $\alpha 9\alpha 10$ mientras que la fase hiperpolarizante depende de la activación de canales SK2 producida por el calcio que ingresa a través del nAChR $\alpha 9\alpha 10$. Para verificar si estos dos canales son los que median las eIPSCs en las CCEs, se estudió el efecto de dos antagonistas específicos del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ (estricnina e ICS-205930, (Rothlin et al., 1999; Elgoyhen et al., 2001; Rothlin et al., 2003) y el efecto del antagonista específico de los canales SK2, apamina (Kohler et al., 1996). Como se observa en la figura 20A-B tanto la estricnina como el ICS aplicados en una concentración de 300 nM, bloquearon completamente, y en

forma reversible, las corrientes sinápticas evocadas en las CCEs. La apamina por su parte, bloqueó en forma irreversible las corrientes salientes evocadas en las CCEs estudiadas a un $V_{\text{sostén}}$ de -40 mV, mientras que las corrientes entrantes, mediadas únicamente por el receptor nicotínico, pudieron aún observarse a un $V_{\text{sostén}}$ de -80 mV (Fig. 20C-D). Estos resultados confirman que las eIPSCs de las CCEs se encuentran mediadas por los mismos canales postsinápticos anteriormente descritos en las células ciliadas. Recientemente, se ha demostrado que en las vueltas basales de la cóclea, aparte del SK2, otro canal de potasio activado por calcio, el canal BK, estaría contribuyendo a la respuesta colinérgica de las células ciliadas (Wersinger et al., 2010). Para evaluar la contribución de este canal en nuestro sistema experimental, se registraron eIPSCs en las CCEs en presencia de iberiotoxina, un bloqueante específico de los canales BK (Galvez et al., 1990). La presencia de esta toxina no alteró la amplitud ni el curso temporal de las eIPSCs, confirmando que este canal de K^+ no contribuye a la respuesta colinérgica en las CCEs de la zona apical (Fig. 20E).

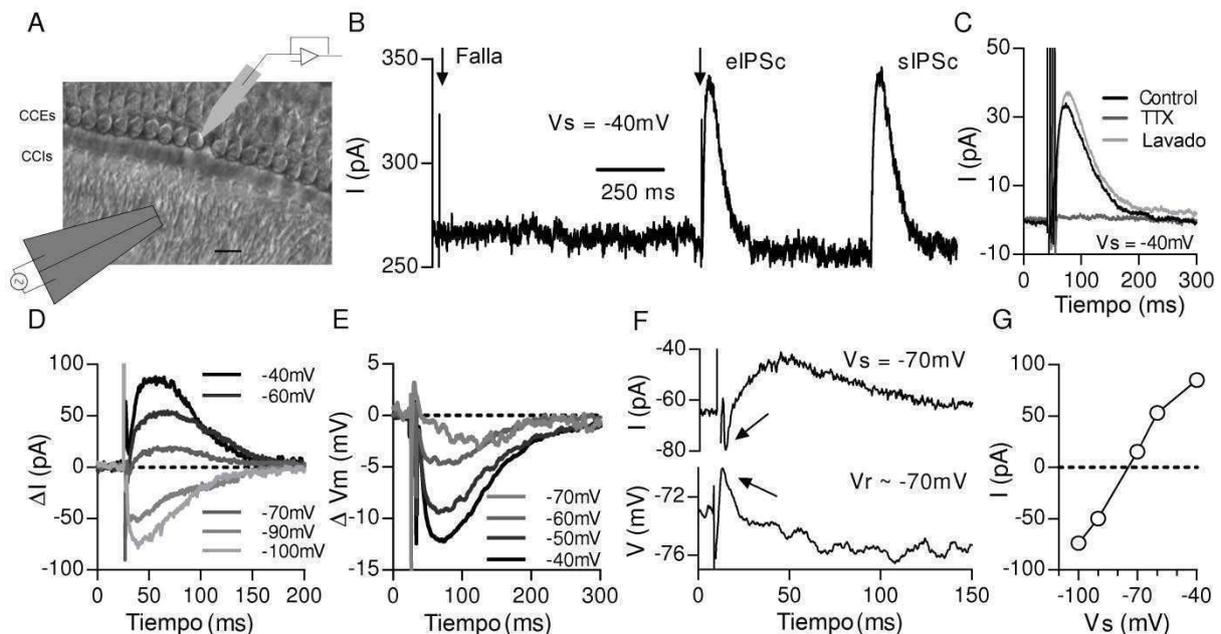


Figura 19 **Respuestas sinápticas producidas en las CCEs por estimulación eléctrica de las fibras MOC.** A, Esquema de la preparación experimental y de las pipetas de registro y estimulación. Los registros se realizaron en las CCEs de la primera fila con un electrodo de *patch-clamp*, mientras las fibras MOC eran estimuladas eléctricamente a través de un electrodo bipolar colocado a $\sim 10\text{-}20\ \mu\text{m}$ bajo las CClis. La escala representa $10\ \mu\text{m}$. B, Respuestas a dos estímulos eléctricos (flechas) medidas en una CCE. En la figura se indica una corriente postsináptica inhibitoria evocada eléctricamente (eIPSC), una espontánea (sIPSC) y una falla de estimulación. C, La inhibición de los potenciales de acción mediante la aplicación de TTX $1\ \mu\text{M}$ bloqueó reversiblemente la generación de respuestas sinápticas por aplicación de 4 pulsos a $250\ \text{Hz}$. D, Trazos representativos de IPSCs producidas a $V_{\text{sostén}}$ entre -40 y $-100\ \text{mV}$. E, Potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs) obtenidos en las mismas células a potenciales de membrana (V_m) entre -40 y $-70\ \text{mV}$. Los $V_{\text{sostén}}$ y V_m se indican en D y E, respectivamente. Notar que las IPSCs fueron completamente entrantes a $V_{\text{sostén}}$ más negativos que $-80\ \text{mV}$, mientras que a potenciales superiores a $-80\ \text{mV}$ se observó una corriente saliente lenta en conjunto con el componente rápido entrante (D). Estas corrientes salientes fueron reproducidas como una fase hiperpolarizante en la configuración de fijación de corriente (E). En F se muestran en detalle las respuestas bifásicas producidas en la configuración de fijación de voltaje a un $V_{\text{sostén}}$ de $-70\ \text{mV}$ (panel superior) y en la configuración de fijación de corriente partiendo de un V_m de $\sim -73\ \text{mV}$ (panel inferior). Las flechas indican el componente rápido entrante/depolarizante. G, Curva I-V obtenida graficando el pico de amplitud de las IPSCs en función del $V_{\text{sostén}}$ correspondiente a la célula ilustrada en D.

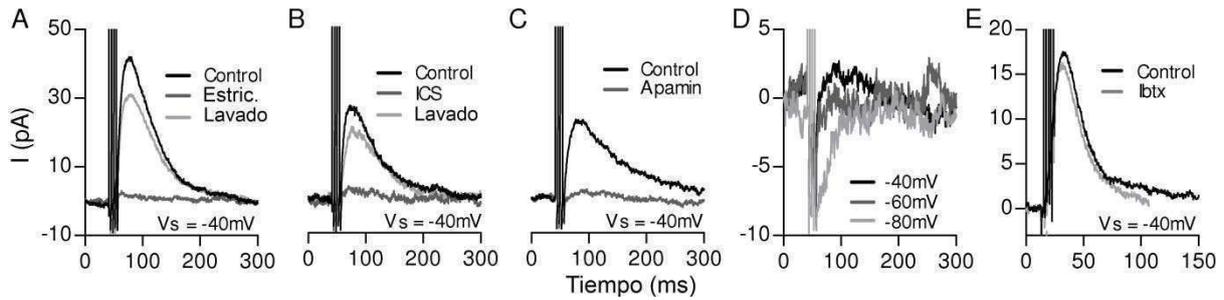


Figura 20. **Características farmacológicas de las IPSCs en las CCEs.** Las IPSCs de las CCEs fueron bloqueadas reversiblemente por los antagonistas específicos del nAChR $\alpha 9\alpha 10$ estriquina (300 nM) (A) e ICS-205930 (300 nM) (B). C, La aplicación del antagonista específico del canal SK2, apamina (100 nM), bloqueó irreversiblemente el componente saliente de la respuesta sináptica inhibitoria a -40 mV mientras que el componente entrante colinérgico pudo ser observado a un $V_{\text{sostén}}$ de -60 y -80 mV (D). E, El antagonista específico del canal BK, iberiotoxina (100 nM), no afectó las IPSCs evocadas a un $V_{\text{sostén}}$ de -40 mV. En todos los casos se muestran respuestas evocadas por 4 pulsos a 250 Hz. Los trazos representan un promedio de las respuestas a 20 estímulos consecutivos en cada condición: control, luego de la aplicación de la droga (con tiempos de aplicación que variaron entre 10 y 150 s, dependiendo de la droga) y luego de lavar la droga durante 200 s.

2. Eficacia de la sinapsis MOC-CCEs.

Las corrientes en las CCEs fueron registradas a un $V_{\text{sostén}}$ de -40 mV, valor cercano al potencial de reposo que presentaron las células ($51,5 \pm 10,2$ mV, media \pm SD, $n = 34$ CCEs). A este voltaje fue posible obtener registros estables de las corrientes sinápticas salientes (dependientes del canal SK2) y con una buena relación señal-ruido. En estas condiciones, las corrientes sinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSC) presentaron una constante de subida (τ 20-80%) de 12.6 ± 2.6 ms y una constante de decaimiento (τ 10-90%) de 51.2 ± 11.6 ms ($n = 8$ CCEs, Tabla I). Las eIPSCs presentaron cursos temporales similares (Fig. 21B). Las amplitudes de las corrientes sinápticas, tanto espontáneas como evocadas, resultaron variables con valores que oscilaron entre 10 y 250 pA, presentando valores medios de $46,1 \pm 10,8$ (sIPSCs) y $48,4 \pm 23,1$ pA (eIPSCs) ($n = 8$ CCEs, Tabla I).

Para verificar que las sIPSCs son efectivamente eventos espontáneos y no son producidos por el disparo espontáneo de potenciales de acción en las fibras MOC, se registraron corrientes sinápticas espontáneas en presencia o ausencia del TTX $1 \mu\text{M}$. No se encontraron diferencias en la amplitud de los eventos sinápticos entre estas dos condiciones (Fig. 17C), indicando que los eventos espontáneos se deben a la fusión de vesículas a la membrana plasmática presináptica independiente de la generación de un potencial de acción.

Cuando se activaron las respuestas sinápticas con pulsos únicos, a una frecuencia de 1 Hz, se observó una tasa de éxito baja en la generación de las eIPSCs ($P_{\text{éxito}} = 0.25 \pm 0.06$, $n = 18$ CCEs). Para cuantificar esta observación, se calculó el contenido cuántico (m) de esta sinapsis, es decir, el número promedio de vesículas liberado por cada potencial de acción presináptico (Del Castillo y Katz, 1954b). Se utilizaron tres métodos para obtener este parámetro. Mediante el método directo,

m fue obtenido dividiendo la media de las eIPSCs producidas durante un protocolo de 1 Hz y la media de las sIPSCs para cada célula (Tabla IV). Es importante tener en cuenta que dada la baja frecuencia de aparición de los eventos espontáneos, numerosas células debieron ser eliminadas de este análisis. Por otro lado, dada la baja probabilidad de liberación observada en la sinapsis MOC-CCE, podemos asumir que los eventos sinápticos siguen una distribución de Poisson. Bajo este supuesto, el contenido cuántico puede ser calculado mediante el método de las fallas ($m = \ln(N/N_0)$) o mediante el método del coeficiente de variación ($m = 1/CV^2$) (ver Métodos y Tabla IV). El valor de m fue estimado para 8 CCEs, obteniéndose valores que resultaron consistentes entre los distintos métodos y oscilaron entre 0.03 y 1.15.

Tabla IV. Contenido cuántico en la sinapsis MOC-CCE.

CCE	Constantes cinéticas			Amplitud media de IPSCs (pA)				Contenido cuántico (m)		
	τ crecimiento 20-80% (ms)	τ decaimiento 10-90% (ms)	n	sIPSCs	n	eIPSCs	n	(i) eIPSC medio/ sIPSC medio	(ii) $\ln(N/N_0)$	(iii) $1/CV^2$
1	11.8 ± 4.0	56.7 ± 21.3	238	58 ± 18	285	34 ± 16	48	0.05	0.07	0.06
2	14.4 ± 5.6	67.6 ± 22.1	35	59 ± 21	40	99 ± 48	276	1.15	1.17	1.25
3	14.1 ± 4.9	58.0 ± 21.8	173	52 ± 25	201	62 ± 38	188	0.48	0.51	0.41
4	9.2 ± 3.6	44.0 ± 14.3	88	47 ± 21	119	35 ± 21	103	0.14	0.21	0.16
5	10.3 ± 3.8	41.2 ± 12.2	48	48 ± 23	54	51 ± 30	116	0.11	0.14	0.11
6	12.3 ± 4.0	49.2 ± 14.8	57	35 ± 17	68	28 ± 14	40	0.03	0.05	0.04
7	11.2 ± 3.5	32.3 ± 8.7	31	28 ± 15	133	39 ± 25	285	0.31	0.23	0.17
8	17.2 ± 6.6	60.4 ± 22.6	70	42 ± 20	117	39 ± 23	68	0.21	0.26	0.20
media ± s.d.	12.6 ± 2.6	51.2 ± 11.6		46.1 ± 10.8		48.4 ± 23.1		0.31 ± 0.37	0.35 ± 0.37	0.31 ± 0.40

Los valores se expresan como la media ± s.d.

De acuerdo con el bajo contenido cuántico obtenido para esta sinapsis, la distribución de amplitudes de las corrientes sinápticas espontáneas y evocadas se superpusieron (Fig. 21E-F). Si uno considera que las corrientes espontáneas se deben a la liberación de una sola vesícula, estos resultados indican que la mayoría de los eventos evocados están compuestos de un solo cuanto. Consistentemente, los eventos más grandes, que podrían estar compuestos de dos o tres cuantos, resultaron poco frecuentes (Fig. 21). Una característica llamativa de los histogramas de amplitudes de las sIPSCs es que resultaron sesgados (Fig. 21C-D). De las 8 células analizadas 5 no presentaron distribuciones normales (D'Agostino & Pearson test de normalidad, $p < 0.01$) con un sesgo que osciló entre 0.6 y 1.4. El hecho de que la distribución de las amplitudes de las sIPSCs (monocuanticas) resultara en histogramas que se asemejan a distribuciones multicuánticas (Jonas et al., 1993), no permitió utilizar los histogramas de amplitudes de las eIPSCs para obtener un valor independiente del m . Este tipo de distribuciones han sido descritas previamente en varias sinapsis en el sistema nervioso central (Bekkers et al., 1990; Jonas et al., 1993; Bekkers, 1994) y son generalmente atribuidas a la variabilidad entre los distintos sitios de liberación (Auger y Marty, 2000). Independientemente de las particularidades de la distribución de amplitudes de las sIPSCs, estos resultados nos permiten

concluir que la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs tiene muy baja probabilidad de liberación con un régimen de estimulación de 1 Hz.

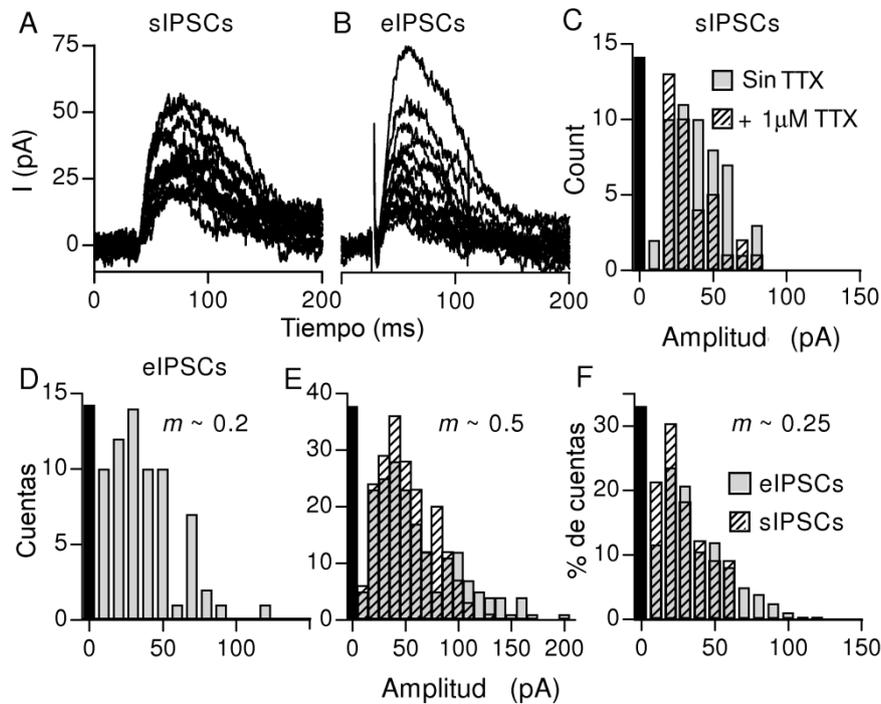


Figura 21. **Distribución de amplitudes de las IPSCs espontáneas y evocadas en las CCEs.** Trazos representativos de las corrientes sinápticas espontáneas (sIPSCs) en presencia de TTX 1 μM (15 eventos, A) y de las corrientes sinápticas producidas por un estímulo único (eIPSCs) (15 eventos, B). Los histogramas de amplitud de las sIPSCs y las eIPSCs correspondientes a las células registradas en A y B se muestran en C y D, respectivamente. Notar que no hubo diferencias en la distribución de amplitudes de las sIPSCs en presencia (barras grises) o ausencia (barras rayadas) de TTX 1 μM. E-F, Histogramas de amplitud de las eIPSCs (barras grises) y las sIPSCs (barras rayadas) correspondientes a dos CCEs. En C-F las barras negras indican el ruido de base.

3. Facilitación por pulsos pareados en la sinapsis MOC-CCEs.

Las sinapsis que presentan un bajo contenido cuántico tienden a facilitar cuando son estimuladas a altas frecuencias (Debanne et al., 1996; Murthy et al., 1997; Zucker y Regehr, 2002). Este comportamiento fue previamente observado en las sinapsis eferentes de las células ciliadas de la tortuga (Art et al., 1984) y en las CCIs neonatales de la rata (Goutman et al., 2005). Para caracterizar los procesos de plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCE, se midieron las respuestas promedio para pulsos pareados con intervalos entre estímulos (ISIs) de 4 a 250 ms (Fig. 22A-D). Se definió el índice de facilitación (FI) como la fracción S_2/S_1 , donde S es la respuesta promedio de las CCEs al primero o al segundo pulso, respectivamente. FIs mayores a 1, indican facilitación, mientras que FIs menores a 1, indican depresión. Para 8 CCEs se observó facilitación para ISIs de entre 10 y 25 ms (Del Castillo y Katz, 1954a; Mallart y Martin, 1967; Katz y Miledi, 1968; Goutman et al., 2005) ($FIs = 2.1 \pm 1.1$ a 10 ms y 1.6 ± 0.6 a 25 ms, respectivamente, $n = 8$ OHCs, $p < 0.05$, test de Student de una

muestra, Fig. 22E). Para ISIs menores a 10 ms o mayores a 25 ms, no se encontró facilitación ni depresión de las respuestas sinápticas.

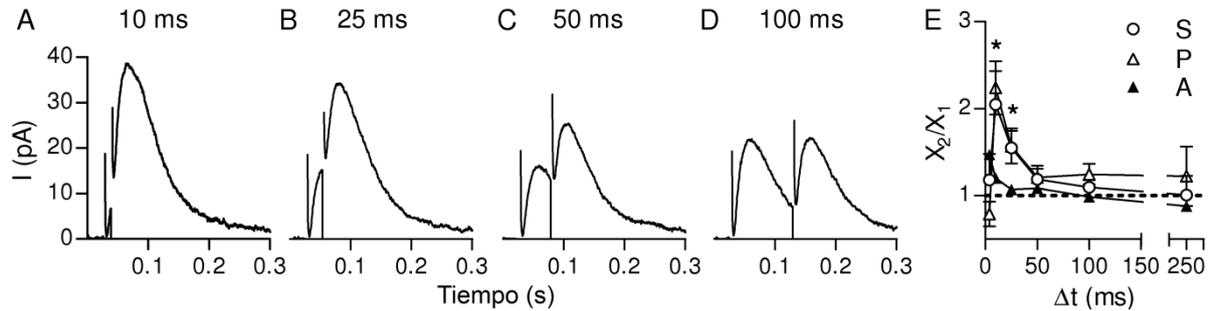


Figura 22 **Facilitación de las respuestas postsinápticas en las CCEs ante la estimulación de las fibras MOC con pulsos pareados.** A-D, Trazos representativos de las respuestas producidas por un par de pulsos con intervalos entre estímulos (ISI) que varían entre 4 y 100 ms (50-100 repeticiones). E, Índices de facilitación calculados para la corriente promedio (S_2/S_1), la probabilidad de aparición de un evento (P_2/P_1) y la amplitud promedio de los eventos exitosos (A_2/A_1) en función del ISI. Los índices de facilitación para cada parámetro fueron calculados como el valor obtenido en el segundo estímulo dividido el valor obtenido en el primero. Notar que los índices de facilitación calculados utilizando S o P se superpusieron en casi todos los ISIs estudiados. **Test de Student* de una muestra, $p < 0.05$.

En la mayoría de las sinapsis, la facilitación se debe a fenómenos presinápticos que causan un aumento en el número de cuantos liberados a medida que aumenta la concentración intraterminal de Ca^{2+} en pulsos consecutivos (Zucker y Regehr, 2002). Sin embargo, dado que en esta sinapsis y en nuestras condiciones de registro ($V_{sostén} -40$ mV), la respuesta se encuentra dominada por la activación secundaria del canal SK2 como consecuencia del aumento de los niveles de calcio en las CCE provenientes de la entrada de Ca^{2+} a través de receptor $\alpha 9\alpha 10$ y también, posiblemente, por liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares (Lioudyno et al., 2004), no puede descartarse *a priori* un efecto postsináptico. Si el aumento en la respuesta promedio se debiera solamente a un efecto postsináptico, se debería observar un aumento en la amplitud de los eventos postsinápticos exitosos (se computa la amplitud media de los eIPSCs sin tener en cuenta las fallas) pero no deberían observarse cambios en la probabilidad de liberación (se considera el porcentaje de fallas de liberación). Contrariamente, si el aumento en las respuestas postsinápticas se debiera a un aumento en el número de cuantos liberados en cada potencial de acción, debería haber una disminución en el número de fallas de liberación durante el segundo pulso. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se recalculó el índice de facilitación considerando la amplitud de los eventos sinápticos exitosos ($FI_A = A_2/A_1$) o la probabilidad de liberación ($FI_P = P_2/P_1$). El valor de FI_A no difirió significativamente de 1 para ninguno de los ISIs evaluados ($n = 8$ CCEs, $p > 0.5$, test de Student de una muestra Fig. 22E), mientras que se encontraron diferencias significativas para FI_P a ISIs de 10 y 25 ms ($FI_P = 2,2 \pm 0,9$ y $1,6 \pm 0,6$ para ISIs de 10 y 25 ms, respectivamente, $n = 8$ CCEs, $p < 0.05$, test de Student de una muestra, Fig. 22E). Más aún, si se grafican los índices de facilitación para los tres parámetros en función del ISI, se observa que la curva para la respuesta promedio (FI_S) y el aumento

de probabilidad (Fl_p) se superponen casi completamente, indicando que el aumento de la respuesta promedio puede explicarse completamente por un aumento en la probabilidad de liberación. Estos resultados nos permiten concluir que en la sinapsis MOC-CCE, la facilitación durante la estimulación de alta frecuencia es de origen presináptico.

4. Facilitación de las respuestas sinápticas en las CCEs durante la estimulación de alta frecuencia.

In-vivo, las fibras MOC disparan en forma regular y a frecuencias que oscilan entre 1 y 120 Hz (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989). Además, la inhibición coclear aumenta con la frecuencia de estimulación de las fibras MOC (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan, 1987). Es por esto que resultó de interés analizar el efecto que tiene la activación eferente repetitiva sobre las respuestas sinápticas en las CCEs. Para esto se aplicaron trenes de estimulación que consistieron en 10 pulsos a frecuencias entre 10 y 80 Hz (correspondiente a ISIs de 100 a 12.5 ms). En la figura 23 se muestran respuestas representativas de las CCEs a este tipo de estimulación. Cuando se estimuló con frecuencias de 10 Hz, se observaron eventos sinápticos dispersos que se volvieron más frecuentes a medida que se aumentó la frecuencia de estimulación. Además, se observó un aumento aparente en la amplitud total de las respuestas sinápticas a frecuencias de estimulación más altas (Fig. 23C-E). La combinación de estos dos efectos resultó en un aumento de la respuesta postsináptica promedio a medida que se aumentó la frecuencia de estimulación eferente (Fig. 23, trazos negros). Se observó el mismo fenómeno cuando se midieron potenciales sinápticos evocados por estimulación de alta frecuencia (Fig. 24).

Para cuantificar la facilitación durante la estimulación repetitiva, se midió la probabilidad de liberación (P) y la amplitud de los eventos evocados exitosamente (A) (Fig. 23K-L, $n=3-11$ CCEs) para cada estímulo consecutivo. La respuesta total promedio (S) fue obtenida como la suma de todos los eventos evocados dividida por el número de trenes de estimulación (Fig. 23M). En forma coincidente con el resultado de los experimentos de pulsos pareados, se encontró un aumento en la probabilidad de liberación cuando se aplicaron trenes de frecuencias de entre 50 y 80 Hz (ISIs de 20 a 12.5 ms). No se encontró ningún cambio en este parámetro a frecuencias de estimulación más bajas (10 o 25 Hz, ISIs de 100 y 40 ms, respectivamente). Este aumento en P fue máximo durante los primeros pulsos ($p < 0.001$, ANOVA de un factor para el 3^{er} pulso) y esto fue acompañado por un aumento en las corrientes postsinápticas promedio (Fig. 23M). Hacia el fin de los trenes no se encontraron diferencias significativas en P entre las frecuencias de estimulación ($p > 0.05$, ANOVA de un factor para el 10^{mo} pulso) (Fig. 23K). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas

en la amplitud de los eventos evocados para las distintas frecuencias a lo largo del tren, aunque se observó una aparente disminución de la amplitud hacia el final del tren en las frecuencias altas (Fig. 23L, $p > 0.05$, ANOVA de un factor para el 3^{ro} y 10^{mo} pulso). Estos resultados indican que existe un aumento de la eficacia sináptica como consecuencia de la activación repetitiva de las fibras eferentes. A su vez, el hecho de que este efecto se correlacione con un aumento de la probabilidad de liberación y no con un aumento de la amplitud de las respuestas postsinápticas, sugiere que la facilitación sería de origen presináptico.

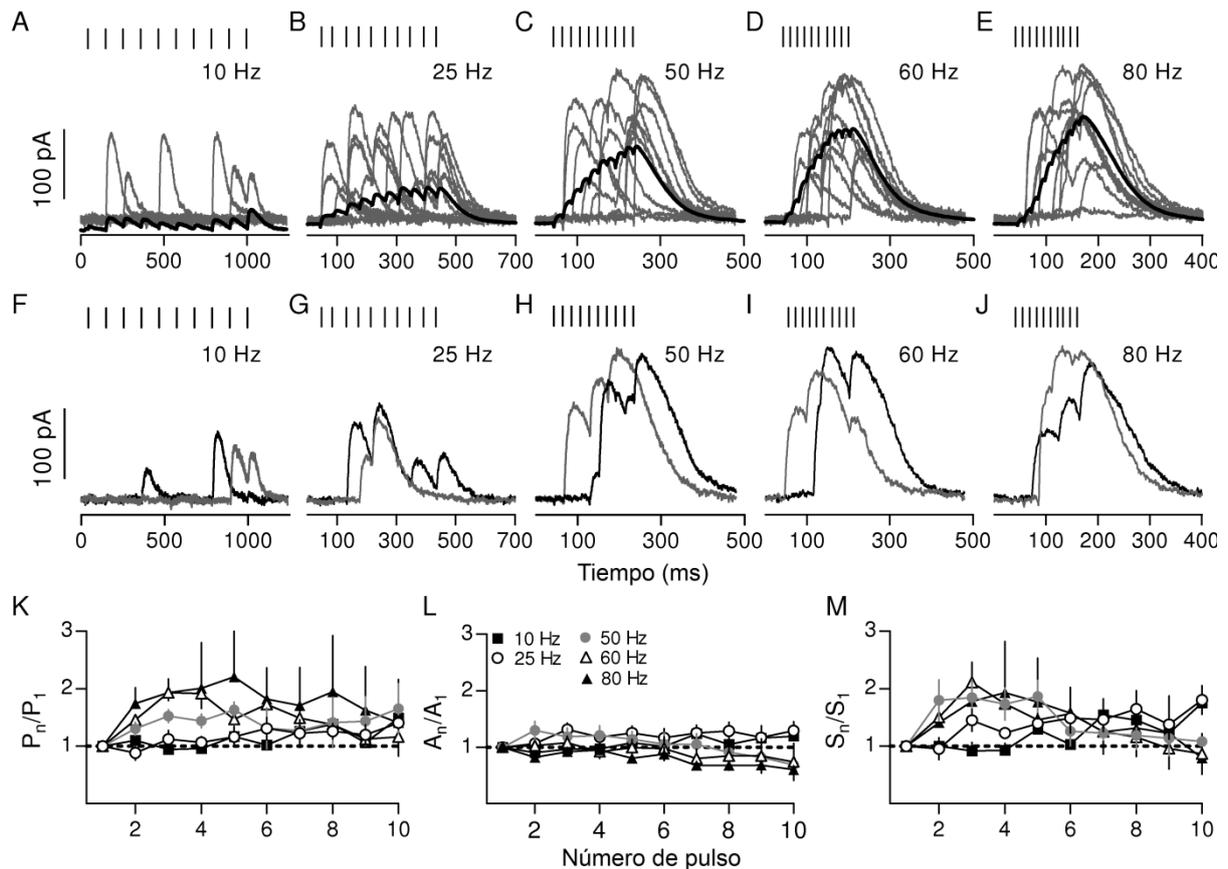


Figura 23 La facilitación de la liberación del neurotransmisor contribuye al aumento de la respuesta inhibitoria en las CCEs durante la estimulación de las fibras MOC a alta frecuencia. A-E, Trazos representativos de 10 respuestas individuales a trenes de 10 pulsos (trazos grises) aplicados a distintas frecuencias. El trazo negro representa la respuesta promedio de 100 repeticiones del estímulo a cada frecuencia. Notar que a frecuencias altas, las respuestas hacia el final del tren resultaron mayores. F-J, Trazos individuales de las respuestas a trenes de 10 pulsos en las cuales se observó sumación de respuestas consecutivas. En K-M se muestran los valores medios de estos parámetros normalizados a su valor en el primer pulso en función del número de pulso para cada frecuencia estudiada ($n = 3-11$ CCEs). Notar que a frecuencias altas, hubo un aumento de P en los primeros pulsos (K) mientras que la amplitud de las eIPSCs se mantuvo estable (L).

Sin embargo, como se comentó previamente, un aumento en los niveles de calcio en la postsinapsis y como consecuencia, una mayor activación de los canales SK2, podrían contribuir al aumento observado en la eficacia sináptica durante estímulos repetitivos. Para controlar este factor, se realizó un experimento en el cual el aumento de calcio en la postsinapsis y la consecuente activación de los canales SK2 fueron minimizados utilizando el quelante rápido de calcio BAPTA (10 mM) en vez de

EGTA en la solución intracelular. Dado que en estas condiciones las corrientes sinápticas están mediadas sólo por el receptor nicotínico ($E_{rev} \sim -14$ mV; Elgoyhen et al. 2001, Gómez-Casati et al., 2005), para obtener respuestas con una buena relación señal-ruido fue necesario realizar los registros a un $V_{sostén}$ de -90 mV. Las IPSCs registradas a este potencial presentaron amplitudes medias de -50 ± 3 pA (42 eventos, 2 CCEs) con una constante de decaimiento de 25 ± 8 ms (27 eventos, 2 CCEs). A este potencial de sostén, los registros resultaron muy inestables. Sin embargo, logramos obtener buenos registros de 2 CCEs a las que se aplicaron 25 repeticiones de trenes de 10 pulsos a 50 Hz (Fig. 25A). Para cada pulso se calcularon: la probabilidad de liberación (P), la amplitud media de los eventos evocados (A) y la respuesta promedio (S). Como se había observado para la respuesta compuesta (nAChR-SK2) a -40 mV, la estimulación de las fibras MOC a altas frecuencias produjo un aumento en las corrientes aisladas (nAChR) promedio que se correlacionó con un aumento en la probabilidad de liberación (P) pero no con cambios en la amplitud de las eIPSCs (A) (Fig. 25B-C). Estos resultados indican que la facilitación de la liberación de neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCE es independiente de los cambios en los niveles de Ca^{2+} en la postsinapsis.

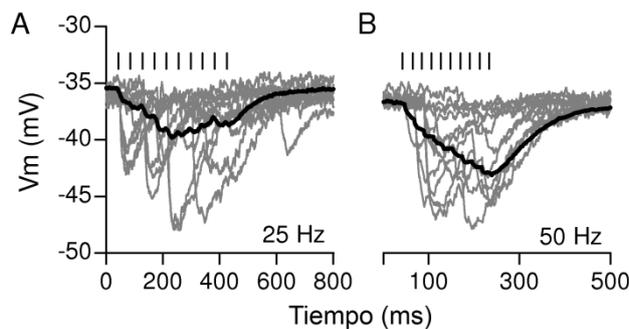


Figura 24 IPSPs en las CCEs en respuesta a trenes de estimulación de 25 y 50 Hz. A, Trazos representativos de 10 respuestas individuales (trazos grises) a trenes de 10 pulsos aplicados a 25 (A) y 50 Hz (B) obtenidos en CCEs en la configuración de fijación de corriente ('current clamp'). El trazo negro representa la respuesta media de 100 repeticiones del estímulo.

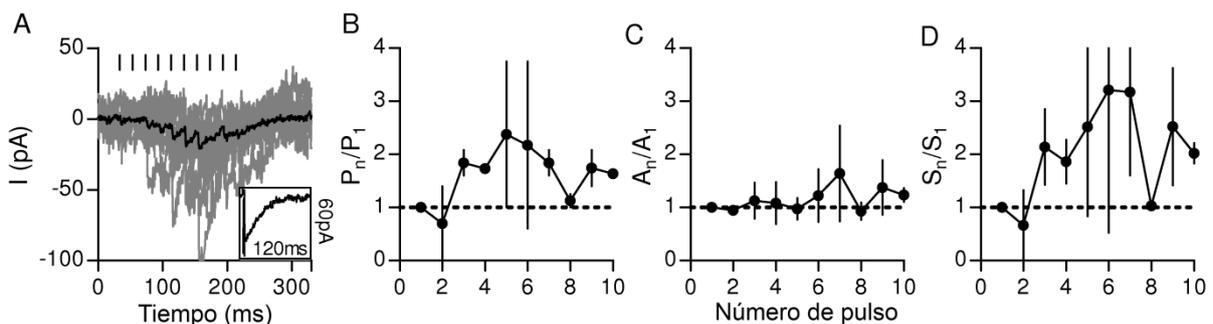


Figura 25. **Facilitación de la transmisión sináptica en ausencia de la activación del canal SK2.** Se registraron las respuestas sinápticas en las CCEs a un $V_{sostén}$ de -90 mV y utilizando BAPTA 10 mM en la solución de la pipeta. A, trazos representativos de 10 respuestas individuales a trenes de 10 pulsos aplicados a una frecuencia de 50 Hz (trazos grises). El trazo negro representa el promedio de 25 repeticiones del estímulo. Se muestra una respuesta promedio producida por un estímulo único a 1 Hz en el recuadro. La probabilidad de liberación (P), la amplitud promedio de las eIPSCs (A) y la respuesta promedio (S) fueron calculadas para cada pulso durante los trenes de 10 pulsos. El B-D se muestra el promedio de los valores de estos parámetros normalizados a su valor en el primer pulso en función del número de pulso.

En todos estos experimentos se aplicaron 50-100 trenes de 10 pulsos a cada frecuencia, con intervalos de 2 segundos entre los pulsos. Para verificar que este régimen de estimulación no

produjera efectos de largo término en la eficacia sináptica, realizamos un experimento control que consistió en la aplicación de 10 series de 10 trenes a 1 Hz, con intervalos de reposo entre series de 60 segundos (Fig. 26A). En la figura 26B-D se muestran las respuestas promedio para cada pulso del enésimo tren de cada serie en función del número de pulso para tres CCEs estimuladas a 50 Hz. En la figura 26E se grafica el valor promedio de la respuesta al primer pulso en función del número de tren en cada serie. Como puede observarse, no se encontraron cambios ni en el curso temporal ni en la amplitud inicial de las respuestas a medida que aumentó el número de tren en la serie, indicando que no hay efectos de largo término en la eficacia sináptica bajo nuestras condiciones experimentales. Utilizando el mismo tipo de análisis, se obtuvieron resultados similares en CCEs estimuladas a 100 Hz (Fig. 26F-I).

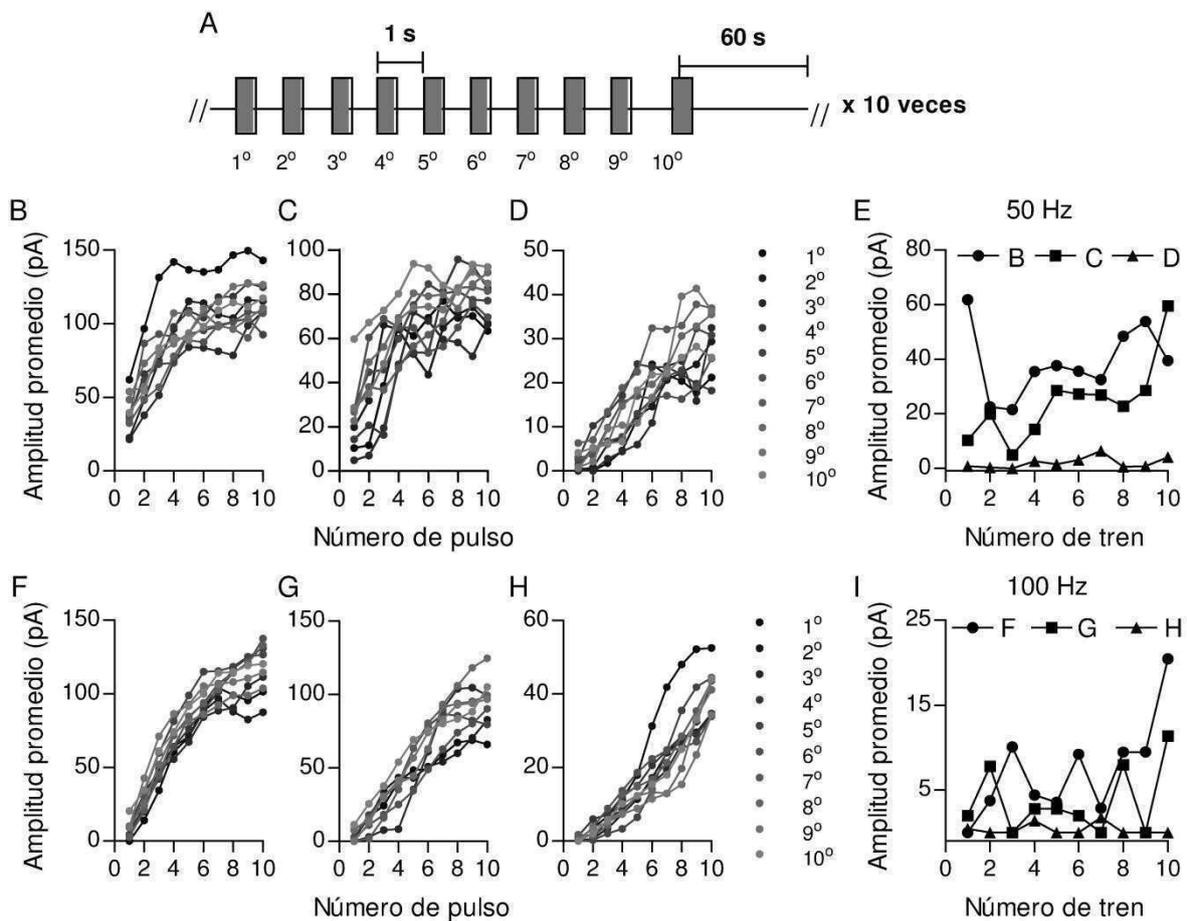


Figura 26. **La estimulación repetitiva de alta frecuencia no provoca cambios de largo término en la eficacia sináptica.** A, Esquema del protocolo utilizado para controlar la existencia de cambios de largo término en la eficacia sináptica durante la estimulación de alta frecuencia. En B-D se muestran las amplitudes promedio después de cada pulso para el enésimo tren de cada serie en función del número de pulso (frecuencia de estimulación 50 Hz, $n = 3$ CCEs). Notar que no hubo diferencias en el perfil de la respuesta obtenida con respecto al orden del tren (1° a 10°). E, para visualizar mejor la existencia de diferencias en la probabilidad inicial de liberación en los trenes sucesivos, se graficó la respuesta promedio del primer pulso del enésimo tren de cada serie en función del número de tren. F-I, se muestra el mismo análisis que en B-E para trenes de estimulación a 100 Hz.

5. Contribución relativa de los procesos de facilitación y sumación a las respuestas sinápticas en las CCEs durante la estimulación de alta frecuencia.

Las IPSCs evocadas en las CCEs presentaron un ancho medio de aproximadamente 50 ms y un tiempo de decaimiento total de más de 100 ms (Fig. 19B). Dado que la duración de las IPSCs resultó mayor que el ISI de los trenes (Tabla IV, Fig. 19B), es probable que la sumación de las corrientes evocadas contribuya con el aumento de las corrientes inhibitorias de las CCEs durante la actividad de las fibras MOC a alta frecuencia (Chen et al., 2002). De hecho, se pueden observar en trazos individuales la sumación de corrientes sinápticas consecutivas (Fig. 23F-J). Para evaluar cuan relevante es este proceso fisiológicamente, se identificaron visualmente, para distintos sets de experimentos, cuántos de los trenes presentaban sumación de al menos dos IPSCs. Si bien los porcentajes variaron según la probabilidad inicial de liberación y el curso temporal de las respuestas postsinápticas, los valores promedio fueron 9 ± 3 , 42 ± 11 , 53 ± 10 , 90 ± 13 y 91 ± 8 para 10, 25, 50, 60 y 80 Hz, respectivamente (Tabla V, $n=3-4$ CCEs). Esto indica que en las CCEs es frecuente la sumación de las respuestas postsinápticas durante la actividad de las fibras MOC a alta frecuencia.

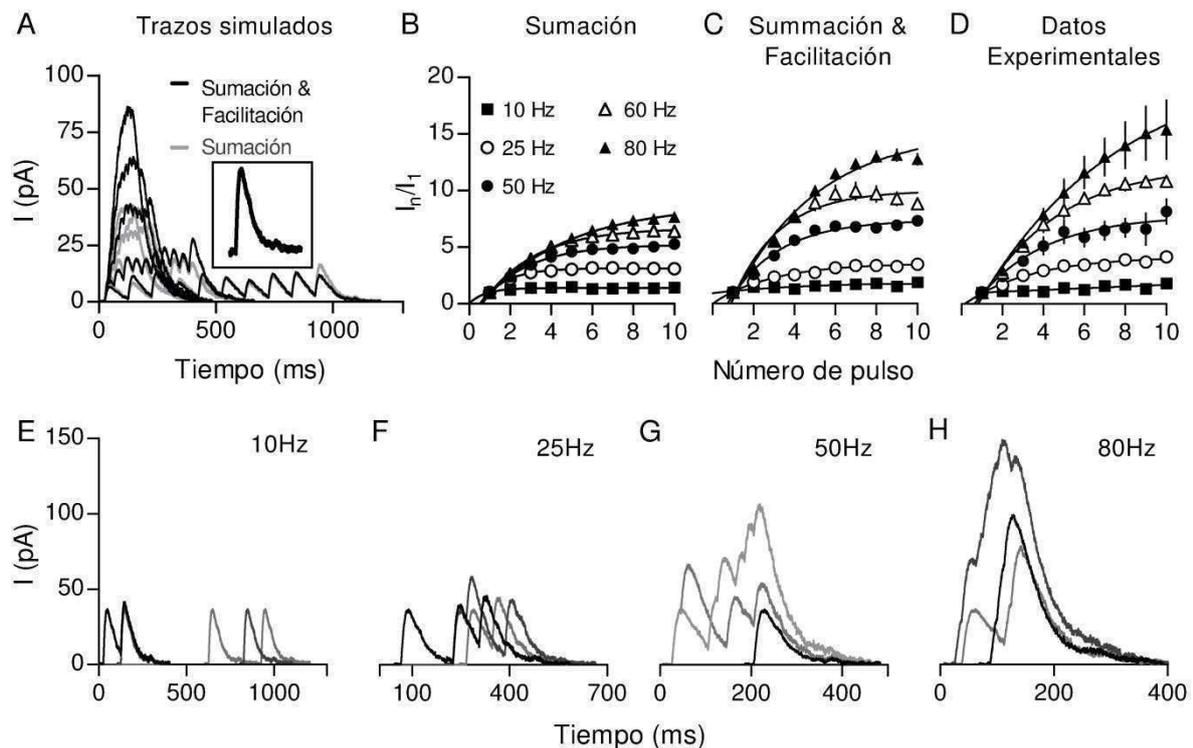


Figura 27. **La sumación también contribuye al incremento de la respuesta postsináptica durante la estimulación de alta frecuencia.** Se construyeron respuestas simuladas a partir de una respuesta sináptica unitaria (recuadro en A) considerando sólo sumación temporal (trazos grises) o considerando la facilitación (trazo negro) incorporando al modelo el cambio de probabilidad de liberación en cada pulso (obtenido de los experimentos ilustrados en la figura 23K). Se graficó la corriente normalizada al primer pulso, para cada pulso, en función del número de pulso, utilizando la simulación que considera sólo sumación (B) o sumación y facilitación (C). En D se muestra este mismo gráfico construido a partir de los datos experimentales indicados en la figura 23. E-H, Trazos representativos de respuestas individuales simuladas para distintas frecuencias de estimulación.

Con el fin de estimar la contribución relativa de los procesos de sumación y facilitación, se realizó una simulación de las respuestas producidas por trenes de distintas frecuencias (Ver Métodos). Se utilizó un trazo de una IPSC representativa producida por un solo pulso, aplicado a una frecuencia de un Hz, como base para la construcción de los trenes simulados (Fig. 27A inset). El efecto de sumación temporal fue simulado considerando una probabilidad constante de liberación de 0.25 para todos los pulsos del tren (Fig. 27A, trazos grises), mientras que la facilitación fue incorporada multiplicando este valor de P en cada pulso por un factor que contempla el cambio en cada pulso obtenido en el experimento ilustrado en la figura 23K (Fig. 27A, trazos negros). En la figura 27E-H se muestran trazos simulados representativos para diferentes frecuencias de estimulación. Se realizaron promedios de los trazos simulados con ambas estrategias y se graficó el incremento relativo de la respuesta acumulada en función del número de estímulo para frecuencias entre 10 y 80 Hz (Figura 27B-C para ‘Sumación’ y ‘Sumación y Facilitación’, respectivamente). Este mismo gráfico fue obtenido a partir de los datos experimentales graficados en la figura 23. El incremento de la corriente en cada pulso fue calculado como I/I_1 (ver Métodos). Para obtener el incremento máximo de la amplitud para cada frecuencia, se ajustaron, las curvas de I/I_1 vs. el número de pulso a una función exponencial y se midió valor de los *plateaus*. Los resultados obtenidos a partir de las respuestas medidas en las CCEs mostraron que existe un aumento en la corriente máxima acumulada en función de la frecuencia de la estimulación (*plateaus*: 4.2 ± 0.3 ; 7.5 ± 0.8 , 12.4 ± 0.7 , 21.6 ± 5.9 para 25, 50, 60 y 80 Hz, respectivamente ($n = 3-11$ CCEs, Fig. 27D). Cuando se compararon estos valores con los ajustes de las curvas obtenidas para las simulaciones se observó que si se considera el efecto conjunto de la sumación y la facilitación, los valores de los *plateaus* se ajustan mejor a los datos experimentales que si se considera solamente la sumación (*plateaus*: 3.1 ± 0.1 ; 5.2 ± 0.2 ; 6.7 ± 0.3 y 8.8 ± 0.5 para 25, 50, 60 y 80 Hz, respectivamente para “Sumación” y 3.6 ± 0.2 ; 7.4 ± 0.3 ; 10.0 ± 0.4 y 15.4 ± 0.7 para 25, 50, 60 y 80 Hz, respectivamente, “Sumación y Facilitación”, Fig. 27B-C). Estos resultados demuestran que tanto la sumación como la facilitación contribuyen a aumentar las corrientes inhibitorias en las CCEs durante la activación repetitiva de las fibras MOC. Finalmente, se decidió utilizar el modelo para evaluar cómo se afectaban los porcentajes de respuestas que presentaban sumación bajo las dos condiciones de prueba: “Sumación” o “Sumación & Facilitación”. Para esto se generaron 1000 trazos a cada frecuencia y se contó el número de trazos en los que se pudieron medir respuestas sumadas. Se consideró la presencia de sumación en un trazo cuando se pudo medir una respuesta cuya amplitud fuera dos veces la del templado. Como se muestra en la tabla V, considerando una probabilidad de liberación constante de 0.25 (“Sumación”), se encontró sumación en aproximadamente 50% de las respuestas a partir de 25 Hz. Sin embargo, el

agregado del efecto de facilitación aumentó notablemente la proporción de respuestas que presentaron sumación, llegando casi al 100% a 80 Hz como se observa experimentalmente.

En conjunto, estos resultados indican que la sumación de las respuestas postsinápticas es ciertamente relevante dado que aumenta la magnitud del tono inhibitorio en las CCEs. A su vez, el aumento de la eficacia sináptica producida por la facilitación produce un aumento en el grado de sumación de las corrientes postsinápticas.

Tabla V. Porcentaje de sumación durante trenes.

Frecuencia (Hz)	Sumación (%)	Sumación & Facilitación (%)	Experimentales (%)
10	0	0	9±3
25	41	49	42±11
50	54	77	53±10
60	58	87	90±13
80	69	96	91± 8

Se calculó el porcentaje de trazos que mostraban sumación temporal tanto en las respuestas simuladas como en las respuestas medidas en las CCEs. Para las respuestas simuladas, el porcentaje fue calculado sobre 1000 trazos generados. Se definió la existencia de sumación en un trazo cuando la amplitud de la respuesta duplicara la amplitud del trazo utilizado para construir el modelo. En el caso de las respuestas experimentales, los trazos que presentaban sumación fueron detectados visualmente.

6. Respuesta inhibitoria de las CCEs durante la actividad prolongada de las fibras MOC.

Otra de las características que se habían observado en experimentos de estimulación del sistema MOC *in-vivo* es que la inhibición de la respuesta auditiva se mantiene mientras las fibras MOC son estimuladas, para luego decaer en tiempos del orden de los 100 ms (Wiederhold y Kiang, 1970; Guinan, 1996). Decidimos entonces evaluar si la sinapsis MOC-CCE era capaz de mantener la liberación del neurotransmisor durante períodos prolongados de actividad. Para esto las fibras MOC fueron estimuladas a frecuencias de 50 Hz durante 1 segundo con períodos entre estímulos de 30 s. Las respuestas promedio activadas de esta manera, presentaron un tiempo de crecimiento hasta el máximo de la respuesta (τ) de 102 ± 10 ms ($n=3$ CCEs), llegando luego a un *plateau* cuya amplitud no decreció significativamente durante la duración del estímulo (Fig. 28A). Se observó, además, que al terminar el periodo de estimulación se produjo actividad sináptica espontánea (Fig. 28B) que prolongó las respuestas durante 200-500 ms (Fig. 28A). Estos resultados nos permiten concluir que la sinapsis MOC-CCE es capaz de sostener su actividad por períodos prolongados.

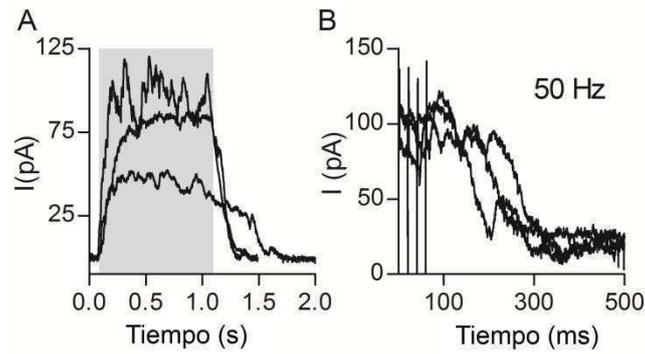


Figura 28. **Liberación sostenida del neurotransmisor en la sinapsis MOC-CCE durante trenes de estimulación prolongados.** A, Corriente promedio obtenida en tres CCEs en respuesta a trenes de 50 Hz aplicados durante 1 segundo (se promediaron 10-50 repeticiones en cada célula). Las regiones sombreadas indican el período de estimulación. Los artefactos de estimulación se eliminaron para mayor claridad. Notar que las corrientes promedio se mantuvieron casi constantes durante el período de estimulación y que la respuesta no retornó a los valores basales en forma inmediata luego de la terminación del estímulo. La constante de crecimiento de la respuesta fue de 101.9 ± 10.4 ms ($n=3$) y el tiempo de decaimiento fue variable, encontrándose entre 200 y 500 ms. B, trazo individual ilustrando la actividad remanente al terminar la estimulación.

Discusión

Estos resultados son la primera descripción de las características de la transmisión sináptica entre las fibras eferentes del sistema MOC, activadas por estimulación eléctrica, y las CCEs. El análisis de las propiedades biofísicas y farmacológicas de las respuestas postsinápticas de las CCEs resultaron similares a las anteriormente descritas tanto para las respuestas activadas por la ACh en CCEs aisladas (Dulon y Lenoir, 1996; Evans, 1996; Nenov et al., 1996b, a) como para las respuestas sinápticas espontáneas medidas en las CCEs presentes en preparaciones del órgano de Corti similares a las utilizadas en el presente trabajo (Oliver 2000). Esto confirma el modelo actual según el cual la respuesta inhibitoria de las CCEs está mediada por la entrada de Ca^{2+} a través del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$ y la subsiguiente activación del canal de potasio SK2 (Nenov et al., 1996b; Oliver et al., 2000).

La sinapsis MOC-CCE presenta una baja eficacia cuando es estimulada con pulsos únicos a una frecuencia de 1 Hz, lo cual se ve reflejado en un valor de contenido cuántico bajo ($m = 0.31 \pm 0.37$). La baja frecuencia de liberación registrada en nuestros experimentos incita a considerar la posibilidad de la existencia de fallas de conducción o de estimulación que pudieran llevar a subestimar el contenido cuántico. Sin embargo, dada la cercanía de la pipeta de estimulación a la célula registrada es poco probable que existan puntos de ramificación que generen fallas de conducción entre el punto de estimulación y el terminal sináptico. Además, se ha demostrado que la existencia de fallas de conducción resulta en depresión de la liberación durante la estimulación de alta frecuencia (Grossman et al., 1979) en lugar de facilitación, como se observa en esta sinapsis. Por otro lado, el hecho de que la distribución de amplitudes de los eventos evocados y espontáneos se superponga, indica que los eventos de liberación exitosos consisten en su mayoría de la liberación de una sola vesícula. Este resultado es coherente con una baja eficiencia de liberación. Asimismo, se ha reportado también una baja probabilidad de liberación en la sinapsis MOC-CCIs transitoria en ratas y ratones neonatales ($m \sim 1$) (Goutman et al., 2005; Zorrilla de San Martin et al., 2010) y en la sinapsis entre las fibras eferentes y las células ciliadas en el sistema auditivo de la tortuga (Art et al., 1984). Esto indica que esta baja tasa de liberación es una característica general de la sinapsis eferente a las células ciliadas en diversos organismos y períodos del desarrollo. Considerando estos datos, podemos postular que la baja eficacia de liberación de la sinapsis MOC-CCEs se debe a la naturaleza del proceso de liberación y no a cambios en el umbral de disparo de los axones o a fallas de conducción (Allen y Stevens, 1994).

Para entender qué implica esta baja tasa de liberación en términos de la estructura y funcionalidad de los terminales sinápticos eferentes, es necesario considerar que las CCEs de la zona apical de la cóclea están, mayoritariamente, invadidas por un único terminal sináptico (Maison et al., 2003). Además, un axón eferente raramente hace contacto más de una vez con una misma CCE (Wilson et al., 1991; Warr y Boche, 2003). De manera que cada vez que se aplica un pulso, la respuesta sináptica medida en una CCE resultaría de la liberación de neurotransmisor proveniente de un único botón sináptico. El contenido cuántico medido dependería entonces del número de sitios activos por botón y de la probabilidad de liberación de cada uno de esos sitios. Actualmente, no existen reportes de ninguno de estos dos parámetros para esta sinapsis. Sin embargo, si consideramos que la probabilidad de liberación de un sitio activo puede ser tan baja como 0.01 (Branco y Staras, 2009), un terminal sináptico con un número de aproximadamente 30 sitios activos podría explicar el valor de contenido cuántico descrito en el presente trabajo.

Existen diversos procesos presinápticos que podrían contribuir a esta baja tasa de liberación. En la sinapsis transitoria MOC-CCI del ratón, el acople entre los CCVD del tipo L y los canales de K^+ BK funciona como un circuito de retroalimentación negativa que reduce el contenido cuántico de la liberación del neurotransmisor (Zorrilla de San Martín et al., 2010). Más aún, en esta misma sinapsis se ha demostrado recientemente que el GABA, posiblemente co-liberado con la ACh desde los terminales MOC activa receptores $GABA_B$ presinápticos ejerciendo así un efecto inhibitorio sobre la liberación (Wedemeyer et al., 2010). Estos mismos fenómenos podrían estar involucrados en la baja probabilidad de liberación que presenta la sinapsis MOC-CCE.

El hecho de que los histogramas de distribución de amplitudes de las respuestas evocadas en las CCEs presentaran distribuciones sesgadas, podría indicar la existencia de variabilidad entre los sitios de liberación, como sucede en algunas sinapsis del SNC (Bekkers et al., 1990; Jonas et al., 1993; Bekkers, 1994; Auger y Marty, 2000). Por otro lado, la existencia de variabilidad en las IPSCs podría también explicarse por diferencias en el grado de acople entre el receptor $\alpha 9\alpha 10$ y el canal SK2 (Oliver et al., 2000; Katz et al., 2004) y por variaciones en la liberación de calcio desde las cisternas postsinápticas que contribuyen a la activación del canal SK2 (Shigemoto y Ohmori, 1991; Yoshida et al., 1994; Lioudyno et al., 2004).

Aunque no existe una descripción detallada de la ultraestructura de los botones sinápticos del sistema MOC de los mamíferos, hay micrografías electrónicas de sinapsis eferentes a las células ciliadas de diversas especies que muestran que estos botones presentan un gran número de

vesículas sinápticas (Lenoir et al., 1980; Nadol, 1988; Simmons et al., 1996; Bruce et al., 2000). Como se comentó anteriormente, no se sabe qué proporción de estas vesículas forman parte de sitios activos, sin embargo, estos resultados sugieren que la disponibilidad de vesículas no es limitante para la liberación (Harris y Sultan, 1995; Schikorski y Stevens, 1997; Xu-Friedman y Regehr, 2004). Los resultados aquí reportados sustentan esta observación. Por un lado, el hecho de que esta sinapsis sea capaz de sostener la liberación sináptica durante periodos prolongados de actividad es consistente con una alta disponibilidad de vesículas en los terminales sinápticos MOC. Más aún, el hecho de que se observe en esta sinapsis un aumento en la tasa de liberación durante la estimulación de alta frecuencia, es también un indicador de que la disponibilidad de vesículas no es limitante para la liberación del neurotransmisor en esta sinapsis.

El aumento de la respuesta postsináptica en las CCEs durante la actividad de las fibras MOC a alta frecuencia, se debe al efecto conjunto de la facilitación y la sumación de las corrientes postsinápticas. La facilitación de la respuesta observada se debe a un aumento de la probabilidad de liberación, es decir, es de origen presináptico. El efecto neto de este proceso es una disminución del número de fallas de liberación durante los períodos de actividad repetitiva. Esto a su vez, resulta en una mayor sumación de las corrientes postsinápticas que, en ausencia del efecto de facilitación, sólo explican la mitad del aumento en la magnitud de las respuestas. El significativo efecto de sumación, se debe a que las corrientes producidas por la activación conjunta del receptor $\alpha 9\alpha 10$ y el canal SK2, presentan una cinética muy lenta que está regida principalmente por las constantes de apertura y cierre del canal SK2 (Oliver et al., 2000; Katz et al., 2004).

Como se mencionó previamente, algunas características de la fisiología de la sinapsis MOC-CCEs son similares a las reportadas en las sinapsis entre fibras eferentes y las células ciliadas de otras especies. Por ejemplo, se han descrito tanto una baja tasa de liberación como la facilitación de las respuestas postsinápticas durante la actividad de alta frecuencia, en la sinapsis eferente a las CCI de la rata (Goutman et al., 2005) y en la sinapsis eferente a las células ciliadas en la papila auditiva de la tortuga (Art et al., 1984). En el presente trabajo demostramos que estas características se mantienen también en la sinapsis MOC a las CCE, el blanco final de estas fibras en los mamíferos adultos (Simmons, 2002). El hecho de que estos mecanismos sinápticos se encuentren conservados en distintas especies sugiere que podrían ser relevantes para el control de la respuesta auditiva.

En otros sistemas se ha propuesto que las sinapsis con una baja tasa de liberación inicial y que presentan facilitación ante la estimulación repetitiva de alta frecuencia, podrían funcionar como

filtros pasa-altos (Fortune y Rose, 2001), respondiendo preferentemente a actividad de altas frecuencias (Lisman, 1997). En el contexto del sistema auditivo, este tipo de sistema permitiría que las CCEs ignoraran la actividad esporádica o espontánea de las fibras MOC estableciendo un umbral para la inhibición coclear. Más aún, el efecto conjunto de la facilitación y la sumación proveen la ventaja adicional de escalar la inhibición de acuerdo a la frecuencia de la actividad MOC, generando un control fino de la función auditiva. Esta observación es particularmente relevante si se considera que, *in-vivo*, las fibras MOC disparan en forma regular y con frecuencias variables (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989). Además, cuando las fibras MOC son activadas por un sonido (*MOC reflex*), la frecuencia de su activación se encuentra modulada por distintas características del sonido como su intensidad, origen (monoaural o binaural) o tipo (ruido o tono) (Brown et al., 1998). De hecho, se ha demostrado que la tasa de disparo de las fibras MOC y la intensidad del sonido presentan una relación casi lineal (Robertson y Gummer, 1985; Liberman y Brown, 1986; Brown, 1989). Podemos entonces postular que, debido a los procesos de plasticidad sináptica de corto término que presenta esta sinapsis, los distintos niveles de activación de las fibras MOC van a resultar en una inhibición graduada de la actividad de las CCEs.

Asimismo, varias de las propiedades de las respuestas sinápticas de las CCEs ante la activación eferente presentan similitudes con la respuesta del sistema auditivo ante la activación del sistema MOC *in-vivo*. Por ejemplo, la inhibición de la función auditiva por medio de la activación eléctrica de las neuronas MOC en el tallo encefálico requiere de la aplicación de trenes de estimulación en vez de pulsos únicos (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Mountain, 1980; Gifford y Guinan, 1987). En forma similar, la activación de las fibras MOC a frecuencias bajas resultó en respuestas muy infrecuentes mientras que el efecto conjunto de la facilitación y la sumación resultó necesario para lograr niveles máximos de inhibición. Por otro lado, ha sido reportado que cuando se estimulan las neuronas MOC con trenes de alta frecuencia, la respuesta máxima no se alcanza hasta alrededor de 100 ms luego del inicio del tren y que además la respuesta tarda un tiempo similar en decaer una vez finalizado el estímulo (Wiederhold y Kiang, 1970). Consistentemente, en la sinapsis MOC-CCEs la sumación de las IPSCs resulta en un tiempo de crecimiento hasta la respuesta máxima del orden de los 100 ms, mientras que la presencia de liberación espontánea al finalizar los trenes da como resultado una prolongación de la respuesta. A su vez, se ha observado que la magnitud del efecto eferente en la función auditiva aumenta con la frecuencia de activación de las fibras eferentes no sólo en los mamíferos (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Brown y Nuttall, 1984; Gifford y Guinan, 1987) sino también en otros vertebrados (Flock y Russell, 1973; Art y Fettiplace, 1984) (Fig. 29A). De manera similar, en este estudio se encuentra que la magnitud de las corrientes inhibitorias

en las CCEs aumentan linealmente con la frecuencia de estimulación saturando alrededor de 100 Hz (Fig. 29B). En este contexto, una mayor frecuencia de disparo de las fibras MOC a medida que aumenta la intensidad de un estímulo sonoro (Robertson y Gummer, 1985; Brown, 1989; Brown et al., 1998) implicaría que la inhibición de la ganancia del sistema auditivo debería aumentar con la intensidad de los sonidos. Esto sería consistente con la hipótesis de que una de las funciones del sistema MOC es la protección contra el trauma acústico (Rajan, 2000; Taranda et al., 2009a). La concordancia entre los datos de fisiología auditiva *in-vivo* y los resultados aquí presentados, sugieren que la magnitud de la inhibición que ejerce el sistema eferente sobre la respuesta coclear está regulada por la dinámica de la sinapsis MOC-CCE.

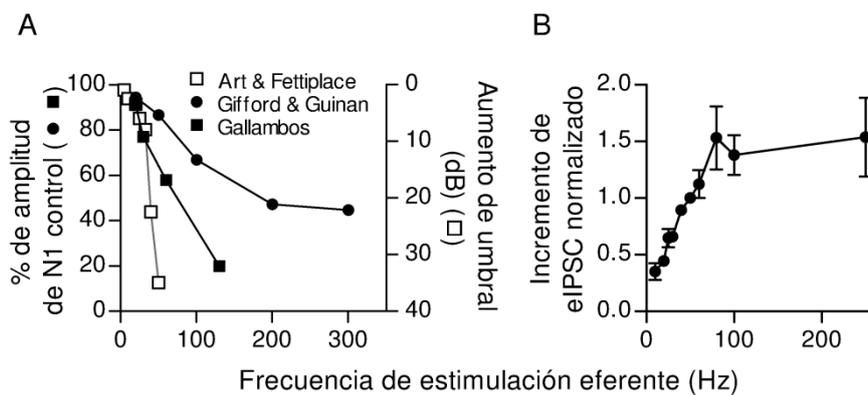


Figura 29 **La inhibición de la actividad del nervio auditivo y la respuesta inhibitoria en las CCEs dependen de la frecuencia de estimulación eferente.** A, Relación entre la frecuencia de activación de las fibras MOC y la inhibición de la actividad aferente en el gato (adaptado de (Galambos, 1956; Gifford and Guinan, 1987) y en la tortuga (adaptado de (Art and Fettiplace, 1984). En el eje y izquierdo el efecto del sistema eferente fue cuantificado como la relación entre la amplitud de la componente N1 del potencial de acción compuesto (CAP) del nervio auditivo, producido por una estimulación sonora moderada (10-25 dB sobre el umbral), con estimulación eferente y la amplitud obtenida sin estimulación ($(N1_{c/shock}/N1_{ctrl}) \times 100$, Galambos, 1956; Gifford and Guinan, 1987). En el eje y de la derecha, se indica el aumento en la intensidad del sonido necesario para evocar una descarga aferente en función la frecuencia de estimulación eferente (Art and Fettiplace, 1984). B, Aumento de la amplitud de las eIPSCs (media \pm SEM), luego de 10 estímulos, en función de la frecuencia de estimulación eferente. Debido a la variabilidad de los datos, los valores de amplitud máxima de las distintas células fueron normalizados al valor correspondiente a una frecuencia de estimulación de 50 Hz. Notar que tanto para la actividad aferente como para las eIPSCs de las CCEs existe un rango de frecuencias donde hay una relación lineal entre la frecuencia de la activación del sistema MOC y el incremento de la inhibición.

Capítulo III

Efecto de una mutación puntual en el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en las propiedades funcionales de la sinapsis entre las fibras del sistema MOC y las células ciliadas de la cóclea.

Introducción

En el capítulo anterior se propone que la respuesta coclear al sistema eferente está fuertemente determinada por las propiedades de la sinapsis entre las fibras eferentes y las CCEs. Una predicción de esta hipótesis es que un cambio en la dinámica de esta sinapsis debería impactar en la respuesta coclear ante la activación del sistema eferente. En el presente capítulo se describe un modelo animal que permite poner a prueba dicha predicción. Se trata de un ratón modificado genéticamente que posee una mutación puntual en la subunidad $\alpha 9$ del receptor nicotínico expresado por las células ciliadas de la cóclea. La mutación consiste en la sustitución de una leucina por una treonina en la posición 9' (L9'T) del segundo paso transmembranal (TM2) del la subunidad $\alpha 9$. Esta mutación fue previamente caracterizada en receptores recombinantes expresados en forma heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis*. La mutación L9'T produce un aumento en la tasa de apertura del canal que se ve traducido en un aumento en la afinidad aparente a la ACh y una disminución de la tasa de desensibilización que resulta en una prolongación de las respuestas macroscópicas mediadas por este canal (Plazas et al., 2005b). Estas propiedades sugieren que la incorporación de esta mutación en el receptor nicotínico coclear debería generar un aumento en la eficacia de la sinapsis entre las fibras MOC y las células ciliadas de la cóclea. Asimismo, en diversas sinapsis se ha demostrado que la tasa de desensibilización de los receptores postsinápticos afecta la plasticidad de corto término (Jones y Westbrook, 1996; Wong et al., 2003). Como se dijo antes, los cambios en la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCEs podrían generar alteraciones en la modulación de la función coclear por el sistema eferente.

En esta parte del trabajo, el primer objetivo fue caracterizar las respuestas colinérgicas de las células ciliadas de ratones que poseen la mutación L9'T para verificar si éstas presentaban las mismas propiedades biofísicas y farmacológicas reportadas para el receptor recombinante mutado expresado en un sistema heterólogo (Plazas et al., 2005b). Luego, se evaluó el efecto de la presencia del receptor $\alpha 9L9'T\alpha 10$ en la funcionalidad de la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs.

Resultados

1. Características de las corrientes colinérgicas aisladas en las células ciliadas de los ratones transgénicos $\alpha 9L9'T\alpha 10$.

Para verificar que la incorporación del receptor mutado no genera alteraciones en la integridad de las células ciliadas se estudiaron sus propiedades electrofisiológicas mediante la realización de registros de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell*. En la figura 30 se muestran corrientes activadas por voltaje en CCEs (B-C) y CClIs (E-G) de animales salvajes (wt/wt), heterocigotas (wt/L9'T) y homocigotas (L9'T/L9'T) para la mutación. En las figuras 28 E y H se muestran las curvas de corriente vs voltaje para las CCEs y las CClIs, respectivamente. Como se observa en dichos gráficos, no hubo diferencias en las corrientes promedio evocadas a distintos voltajes entre los distintos genotipos. Más aún, no se encontraron diferencias en los valores de capacitancia de las CCEs o CClIs entre genotipos (wt/wt : 8.3 ± 0.2 pF, n=19 animales, 41 CClIs; wt/L9'T : 8.4 ± 0.1 pF; n=14 animales, 41 CClIs; L9'T/L9'T : 8.6 ± 0.1 pF, n=26 animales, 79 CClIs, medidas a P9–P11; wt/wt : 8.0 ± 0.4 pF, n = 5 animales, 13 CCEs; y L9'T/L9'T : 8.1 ± 0.2 pF, n = 8 animales, 19 CCEs, registradas a P10–P11), indicando que no hay cambios en el tamaño de las células. Estos datos sugieren que la incorporación de la subunidad mutada no altera ni el tamaño ni el perfil electrofisiológico de las células ciliadas.

Como se mencionó anteriormente, las corrientes mediadas por los receptores recombinantes $\alpha 9\alpha 10$ que poseen la sustitución L9'T presentan una mayor afinidad aparente por la ACh y una disminución en la tasa de desensibilización de las corrientes colinérgicas (Plazas et al., 2005b). Con el objetivo de determinar si las corrientes colinérgicas de las células ciliadas que poseen el receptor mutado presentan las mismas alteraciones, se estudiaron las corrientes activadas por la aplicación exógena de ACh en CClIs de animales en edades previas al inicio de la audición (P6-P11). Para obtener la corriente activada por la ACh mediada exclusivamente por el receptor $\alpha 9\alpha 10$ (sin contribución de la corriente a través del canal SK2), los registros se realizaron en una solución intracelular que contenía BAPTA 10 mM más el agregado de apamina 5 nM en la solución extracelular. Para determinar la afinidad por la ACh del receptor colinérgico mutado, se construyeron curvas concentración-respuesta a la ACh para las CClIs de ratones salvajes, heterocigotas y homocigotas para la mutación L9'T (Fig. 31A). Como se esperaba, la incorporación de subunidades $\alpha 9$ mutantes produjo un corrimiento de la curva concentración-respuesta hacia la izquierda, con una disminución concomitante del valor de la concentración efectiva que produce el 50% de la respuesta (CE_{50}). El CE_{50} resultó significativamente diferente entre ratones mutantes homocigotas y salvajes ($p < 0.01$, ANOVA + test de Dunnett), mientras que los ratones heterocigotas presentaron valores intermedios (wt/wt : CE_{50} , 90.8 ± 18.2 μ M, n_{hill} 1.6 ± 0.1 , n = 4 animales, 7 CClIs; wt/L9'T: CE_{50} , 57.2 ± 6.5 μ M,

nHill 2.2 ± 0.1 , $n = 4$ animales, 9 CClis; y $L9'T/L9'T$: CE_{50} , $41.7 \pm 5.7 \mu M$, nHill 2.1 ± 0.2 , $n = 4$ animales, 7 CClis). Por otro lado, la aplicación de ACh durante un minuto produjo corrientes entrantes que mostraron una reducción en su amplitud ante la presencia prolongada del agonista debido a la desensibilización de los receptores nAChR. Como se muestra en los trazos representativos de la figura 31B, la reducción de la corriente fue menor en las CClis que poseían receptores mutados respecto a las salvajes. Para cuantificar estas diferencias, se calculó la fracción de corriente remanente 30s después del pico de la respuesta, respecto a la corriente en el pico de la respuesta (Fig. 31C). El valor de este parámetro difirió significativamente entre los ratones salvajes y los homocigotas ($p < 0.05$, ANOVA + test de Dunnett), mientras que los ratones heterocigotas mostraron valores intermedios (I_{30s}/I_{max} : 0.29 ± 0.04 en wt/wt , $n = 10$ animales, 15 CClis; 0.45 ± 0.05 en $wt/L9'T$, $n = 9$ animales, 12 CClis; y 0.48 ± 0.06 en $L9'T/L9'T$, $n = 6$ animales, 10 CClis). Estos resultados confirman que las corrientes llevadas por el receptor nAChR de las células ciliadas de los ratones mutantes para la subunidad $\alpha 9$ ($\alpha 9L9'T\alpha 10$) presentan las mismas alteraciones funcionales descritas para el receptor mutante recombinante expresado en oocitos de *Xenopus laevis* (Plazas et al., 2005b).

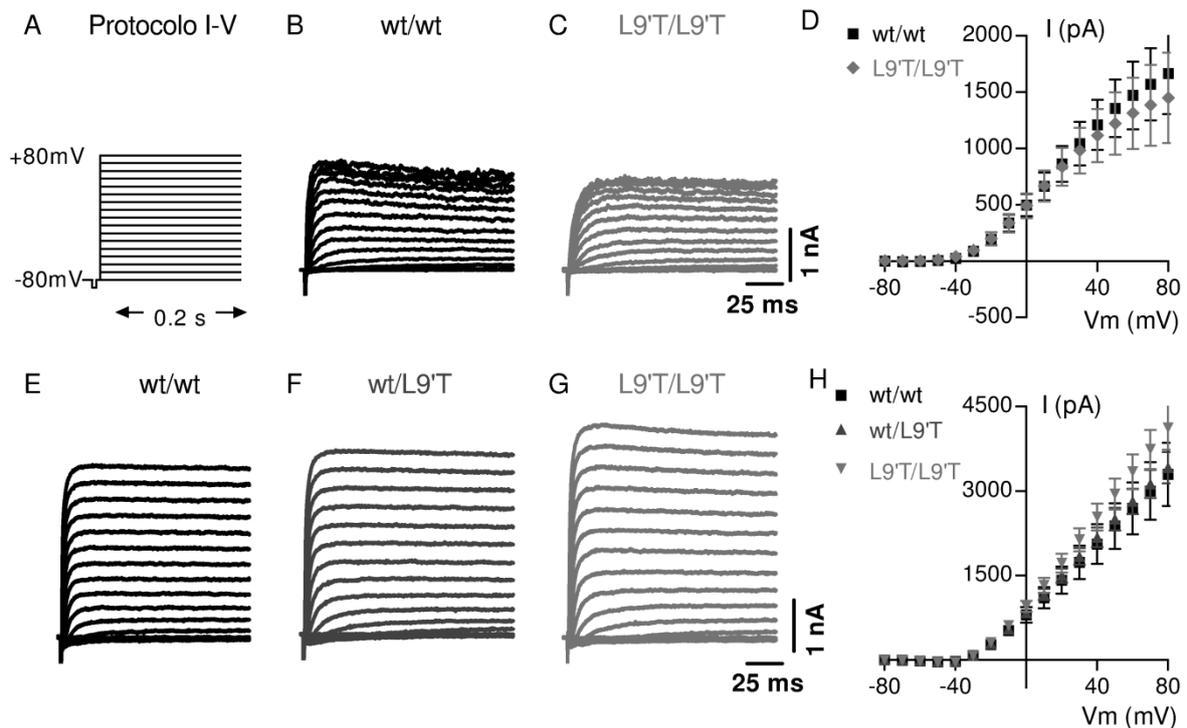


Figura 30 **Corrientes voltaje-dependientes en las células ciliadas de los ratones que poseen la mutación $\alpha 9L9'T$.** A, Detalle del protocolo utilizado para medir las corrientes voltaje-dependientes en las CClis. Se aplicaron pulsos despolarizantes de 200 ms que variaron entre -84 y 16 mV con incrementos de 20 mV desde un $V_{sostén}$ inicial de -84 mV. B-C, trazos representativos de las corrientes activadas en las CCEs de los ratones wt/wt y $L9'T/L9'T$ en P10-P14, respectivamente. D, curva I-V de las corrientes de estado estacionario en las CCEs. (wt/wt : $n = 2$ animales, 3 CCEs; y $L9'T/L9'T$: $n = 6$ animales, 8 CCEs). E-F, igual a B-C pero para CClis de los ratones wt/wt , $wt/L9'T$ y $L9'T/L9'T$ en P6-P10 (wt/wt : $n = 10$ animales, 13 CClis; $wt/L9'T$: $n = 9$ animales, 13 CClis; y $L9'T/L9'T$: $n = 14$ animales, 17 CClis).

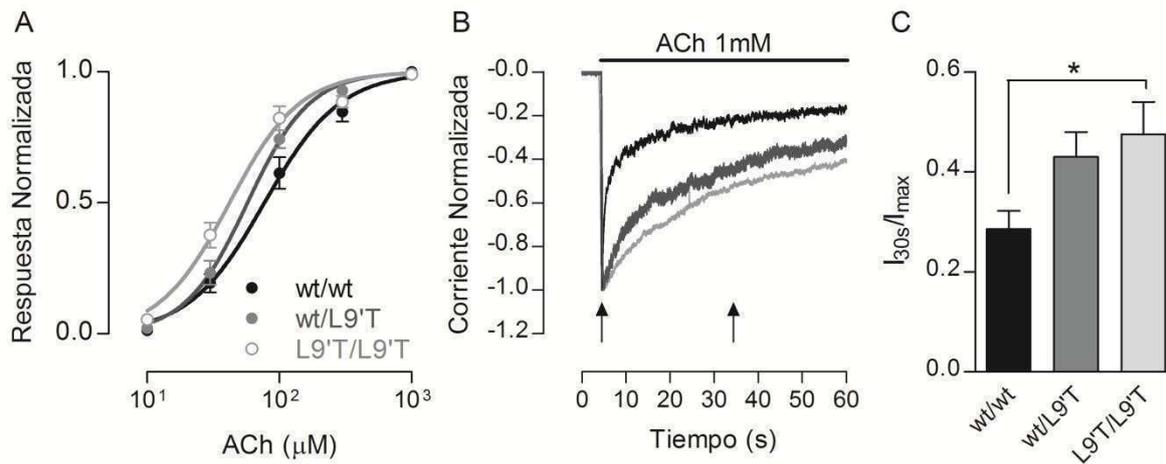


Figura 31. **Caracterización de las corrientes colinérgicas en las CChRs de los ratones L9'T/L9'T.** A, Curva concentración-respuesta a la ACh realizada en las CChRs en P9-P10. Las amplitudes de las corrientes obtenidas a cada concentración fueron normalizadas y referidas al valor máximo de la respuesta a la ACh. Se muestra la media \pm S.E.M. de 7 CChRs de los ratones wt/wt ($n = 4$ animales), 9 CChRs de los ratones wt/L9'T ($n = 4$ animales) y 7 CChRs de los ratones L9'T/L9'T ($n = 4$ animales). B, Trazos representativos de las respuestas obtenidas en las CChRs en P6-P10 ante la aplicación de ACh 1 mM durante 1 s a un $V_{\text{sostén}}$ de -90 mV. C, Gráfico de barras indicando la fracción de corriente remanente respecto a la corriente máxima luego de 30 s de aplicación continua de ACh 1 mM, para cada uno de los genotipos.

2. Efecto de la mutación L9'T en las respuestas sinápticas de las CChRs.

Durante un evento sináptico, a diferencia de lo que ocurre en los experimentos de aplicación exógena del agonista, la ACh está presente durante periodos breves, de manera que la cinética de las respuestas dependerá no sólo de su tasa de desensibilización, sino también de otros factores como la disociación de la ACh del sitio de unión y la velocidad de eliminación de la ACh de la brecha sináptica. Por otro lado, la respuesta sináptica de las células ciliadas está mediada no solo por el receptor $\alpha 9\alpha 10$, sino también por la activación secundaria del canal SK2 (Dulon y Lenoir, 1996; Nenov et al., 1996b; Glowatzki y Fuchs, 2000; Oliver et al., 2000; Marcotti et al., 2004; Gomez-Casati et al., 2005; Goutman et al., 2005). Por lo tanto, el perfil final de las respuestas sinápticas dependerá no solo de la cinética del nAChR, sino del impacto que tenga este cambio en su cinética para la activación del canal SK2. Nos propusimos entonces, evaluar el efecto de la alteración de la cinética del nAChR $\alpha 9L9'T\alpha 10$ en las respuestas sinápticas de CChRs neonatales. Para comparar el efecto de la mutación en las respuestas colinérgicas puras (nAChR) y en las respuestas compuestas (nAChR + SK), los registros de corrientes sinápticas fueron realizados aislando el componente colinérgico de la corriente (en presencia de BAPTA 10 mM en la solución intracelular y apamina 5 nM en la solución extracelular a un $V_{\text{sostén}}$ de -82 mV) y también midiendo la respuesta compuesta (en presencia de EGTA 5 mM en la solución intracelular a $V_{\text{sostén}}$ de -90 ó -40 mV). En la figura 32 se muestran registros representativos de las corrientes espontáneas (sIPSC) registradas en las CChRs en las tres condiciones

experimentales. En forma consistente con lo encontrado ante la aplicación exógena de ACh, las corrientes sinápticas colinérgicas aisladas resultaron mucho más prolongadas (Fig. 32 A). Esto se reflejó en un aumento significativo de alrededor de 6 veces en el tiempo de decaimiento y de 3 veces en el ancho medio de las respuestas en las CCl de los ratones *L9'T/L9'T* (Tabla VI, '*nAChR*'). Este cambio en la cinética del nAChR se vio también reflejado en un aumento en el tiempo de decaimiento y en el ancho medio de las corrientes sinápticas compuestas, tanto a -90 como a -40 mV (Tabla VI, '*nAChR + SK*'). Es interesante notar que las amplitudes de las corrientes sinápticas aisladas resultaron menores en los ratones *L9'T/L9'T* que en los salvajes. Sin embargo, el total de carga transferida, medida como el área de cada evento sináptico, resultó mayor debido a la prolongación de los eventos. Más aún, la reducción de la amplitud encontrada en el componente colinérgico de las sIPSCs, no se vio reflejada en las corrientes acopladas nAChR + SK, sugiriendo que la cantidad de Ca^{2+} que entra a la CCl fue suficiente para activar efectivamente los canales SK. Finalmente, se encontró que el tiempo de activación de las corrientes acopladas nAChR + SK era mayor en las CCl de los ratones *L9'T/L9'T* que en las CCl de los ratones salvajes. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los tiempos de activación de las corrientes aisladas entre ambos genotipos. Si bien estos cambios en la cinética de las IPSCs son consistentes con los cambios descritos para los receptores $\alpha 9\alpha 10$ recombinantes portadores de esta mutación (Plazas et al., 2005b), quisimos verificar si efectivamente estas sIPSCs estaban mediadas por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$. Con este fin, se aumentó la frecuencia de los eventos espontáneos mediante la aplicación de una solución extracelular rica en potasio (K^+ 40 mM) y se evaluó el efecto de la estricnina, un potente antagonista del receptor $\alpha 9\alpha 10$. La aplicación de estricnina inhibió completamente las corrientes sinápticas en las CCl (Fig. 32D), confirmando que éstas se encuentran mediadas por el receptor $\alpha 9\alpha 10$.

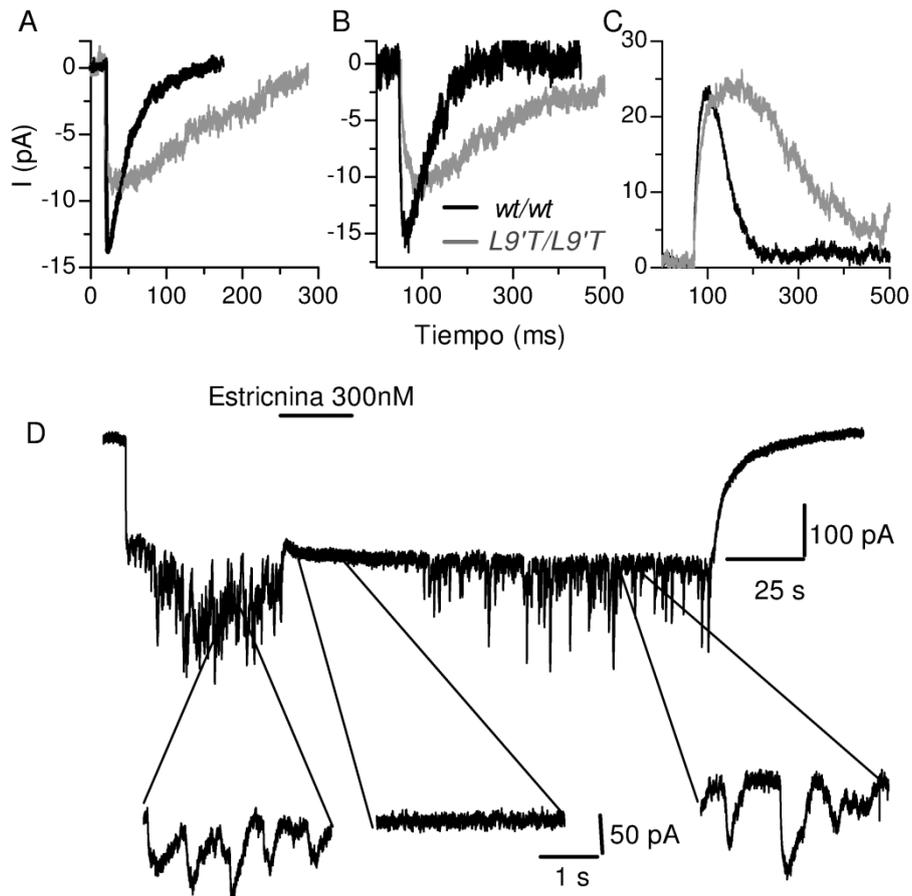


Figura 32. **La estricnina bloquea las corrientes sinápticas en las CCl_s de los ratones L9'T/L9'T.** A, respuestas sinápticas espontáneas (sIPSCs) mediadas sólo por el nAChR $\alpha 9\alpha 10$ en las CCl_s wt/wt (27 eventos, trazo negro) y L9'T/L9'T (27 eventos, trazo gris) a un $V_{sostén}$ de -82 mV. B, sIPSCs mediadas por el nAChR + SK2 a un $V_{sostén}$ de -90 para los ratones wt/wt (84 eventos) y L9'T/L9'T (16 eventos). C, igual a B pero a un $V_{sostén}$ de -40 mV (CCl_s wt/wt: 54 eventos y CCl_s L9'T/L9'T: 14 eventos). En todos los casos, las corrientes representativas corresponden al promedio de eventos registrados en una misma célula (el número de células evaluadas en cada condición se indica en la tabla VI). D, trazo representativo ($n=4$ CCl_s, 2 animales) de las corrientes sinápticas producidas por la aplicación de una solución con K^+ 40 mM. Los trazos expandidos muestran que la actividad sináptica se bloqueó completamente con estricnina 300 nM.

Tabla VI. Corrientes sinápticas en CCl de ratones wt/wt y L9'T/L9'T.

Corrientes	AChR		AChR + SK			
	- 82 mV		- 40 mV		- 90 mV	
Genotipo	wt/wt	L9'T/L9'T	wt/wt	L9'T/L9'T	wt/wt	L9'T/L9'T
Amplitud (pA)	18.4 ± 2.1	11.1 ± 1.0 ^a	28.2 ± 1.1	30.2 ± 3.3	20.9 ± 1.9	16.7 ± 0.9
τ crecimiento (ms)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	8.6 ± 1.1	18,6 ± 1,3 ^a	5.4 ± 1.0	9.3 ± 1.9
τ decaimiento (ms)	27.9 ± 1.0	186 ± 26 ^c	52.9 ± 10.1	170 ± 37 ^a	53.7 ± 5.4	222 ± 47 ^b
Ancho medio (ms)	25.0 ± 1.2	79.2 ± 10.3 ^b	66.5 ± 2.8	199 ± 23 ^b	70.3 ± 6.0	235 ± 51 ^b
Area (pC)	0.55 ± 0.09	1.1 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1	5.7 ± 1.4 ^a	1.4 ± 0.1	3.9 ± 1.0 ^a
Nro de animales	2	3	3	2	4	3
Nro de células	4	4	3	2	6	5
Nro de eventos	1125	141	83	55	277	141

^a $p < 0.05$

^b $p < 0.01$

^c $p < 0.001$

Características de las corrientes sinápticas espontáneas en las CCl de los ratones wt/wt y L9'T/L9'T. Para cada parámetro se indica el valor de significancia estadística al comparar los genotipos mediante el *Test de Student*. Los valores se expresan como la media ± S.E.M.

3. Efecto de la mutación L9'T en las respuestas sinápticas de las CCEs.

Dado que la frecuencia de liberación espontánea de vesículas en la sinapsis MOC-CCEs es muy baja, se aumentó la actividad sináptica mediante la aplicación de una solución extracelular conteniendo 40 mM de K⁺. En la figura 33A-B se muestran las respuestas sinápticas producidas en las CCEs. En la figura 33C se muestran trazos representativos de las respuestas promedio de una célula salvaje y de una homocigota para la mutación. En forma similar a lo observado en las CCl, se observó un aumento de entre 3.5 y 4 veces en el tiempo de decaimiento y en el ancho medio de las IPSCs. A su vez, a pesar de evidenciarse una disminución de 0.6 veces en la amplitud de las respuestas en los animales L9'T/L9'T, la transferencia total de carga durante los eventos, medida como el área de los mismos, resultó duplicada (Tabla VII). En estas condiciones de registro, el potencial de equilibrio para el potasio es de -32 mV, de manera que las corrientes sinápticas poseen una gran contribución tanto de corrientes a través del receptor $\alpha 9\alpha 10$ como a través del canal SK2. Por lo tanto, para verificar si en las CCEs de los ratones L9'T/L9'T la activación del nAChR y la del canal SK2 están acopladas, se aplicó ACh en forma exógena y se midió la respuesta evocada a un $V_{\text{sostén}}$ de -90 o de -40 mV. Se observó que la corriente entrante medida a -90 mV, se convirtió en una corriente saliente a -40 mV (Fig. 33 D). Este resultado confirma que existe un correcto acople del canal SK a la respuesta colinérgica en las CCEs de los ratones que albergan la mutación.

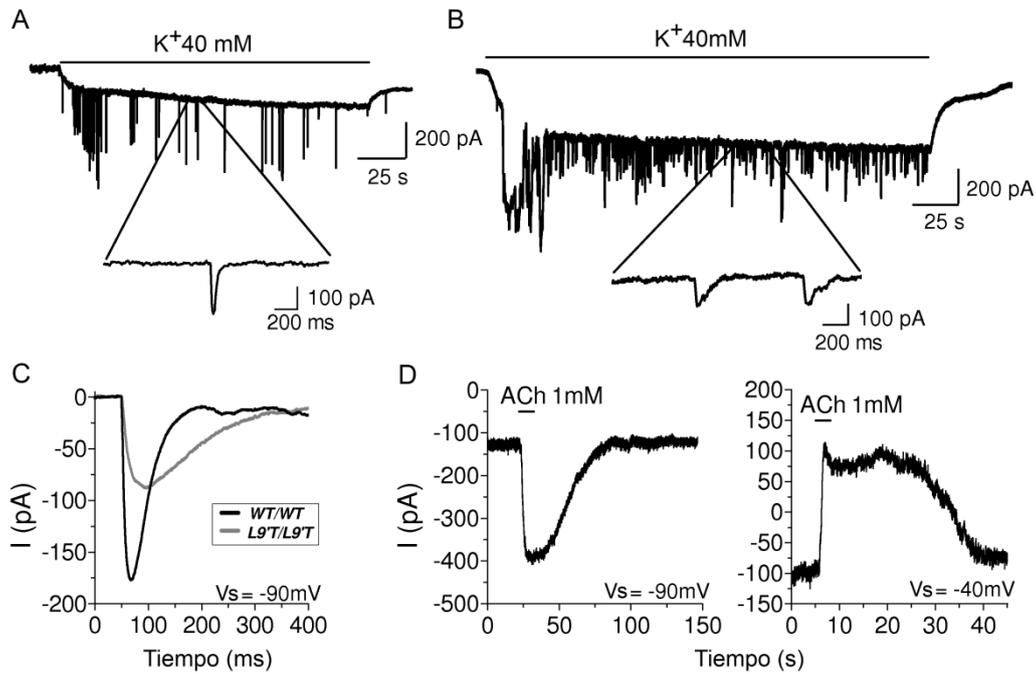


Figura 33. **Respuestas sinápticas prolongadas en las CCEs.** A-B, trazos representativos de las IPSCs producidas por la aplicación de una solución con K⁺ 40 mM en CCEs en P10-P11 a un V_{sostén} de -90 mV en los ratones wt/wt y L9'T/L9'T, respectivamente. En cada panel se muestran corrientes sinápticas individuales en una escala temporal expandida. C, trazos representativos superpuestos de las IPSCs ilustradas en A y B correspondientes a una CCE wt/wt (39 eventos, trazo negro) y a una L9'T/L9'T (77 eventos, trazo gris). Los trazos representativos corresponden al promedio de los eventos registrados en una misma célula (el número de células evaluadas en esta condición se indica en la tabla VII). D, respuestas evocadas por la aplicación exógena de ACh 1 mM en las CCEs a V_{sostén} de -90 y -40 mV.

Tabla VII. Corrientes sinápticas evocadas con 40mM K⁺ en CCEs de ratones wt/wt y L9'T/L9'T.

Corrientes	AChR + SK	
V _{sostén}	- 90 mV	
Genotipo	wt/wt	L9'T/L9'T
Amplitud (pA)	207 ± 25	129 ± 11 ^a
τ _{crecimiento} (ms)	4.7 ± 0.2	10.2 ± 0.4 ^c
τ _{decaimiento} (ms)	32.6 ± 1.7	124 ± 8 ^c
Ancho medio (ms)	47.2 ± 1.7	161 ± 13 ^c
Area (pC)	11.1 ± 1.6	20.6 ± 3.2 ^b
Nro de animales	2	3
Nro de células	6	3
Nro de eventos	780	208

^a p < 0.05

^b p < 0.01

^c p < 0.001

Características de las corrientes sinápticas producidas por la aplicación de una solución conteniendo K⁺ 40 mM en las CCEs de los ratones wt/wt y L9'T/L9'T. Para cada parámetro se indica el valor de significancia estadística al comparar los genotipos mediante el *Test de Student*. Los valores se expresan como la media ± S.E.M.

4. Eficacia de la sinapsis MOC-CCIs en los ratones L9'T/L9'T.

En trabajos previos se demostró que los terminales sinápticos de la sinapsis MOC-CCEs de ratones con mutaciones que anulan la expresión de las subunidades nAChR $\alpha 9$ o $\alpha 10$ (ratones *knock-out*), presentan alteraciones tanto en su arquitectura como en el patrón de expresión de proteínas (Vetter et al., 1999; Vetter et al., 2007; Murthy et al., 2009a). Por otro lado, experimentos de inmunohistoquímica demostraron que, al igual a lo que se observa en los ratones *knock-out* para las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$, los terminales eferentes de los ratones L9'T/L9'T presentan un tamaño mayor que sus pares salvajes. Sin embargo, en este caso se observó un aumento en el número de botones por célula (Murthy et al., 2009a) en lugar de la disminución observada en los ratones *knock-out* (Vetter et al., 1999, Vetter et al., 2007). Estos resultados indican que la presencia del receptor mutado podría tener consecuencias no sólo en la respuesta postsináptica de las células ciliadas, sino también en las propiedades funcionales de los terminales sinápticos MOC.

Tabla VIII. Contenido cuántico en la sinapsis MOC-CCI de ratones wt/wt y L9'T/L9'T.

CCI #	wt/wt			L9'T/L9'T		
	(i) Ampl eIPSC/Ampl sIPSC	(ii) ln (N/No)	(iii) 1/CV ²	(i) Ampl eIPSC/Ampl sIPSC	(ii) ln (N/No)	(iii) 1/CV ²
1	0.37	0.36	0.36	0.54	0.53	0.65
2	2.59	2.41	2.48	1.52	1.47	1.29
3	1.11	1.05	1.00	0.35	0.39	0.90
4	0.79	0.90	0.70	0.51	0.49	0.59
5	0.34	0.34	0.35	0.48	0.60	0.62
6	0.40	0.40	0.55	0.55	0.57	0.72
7	1.20	1.12	1.17	1.14	0.99	0.81
8	0.94	1.08	1.23	0.32	0.32	0.50
mean \pm s.d.	0.97 \pm 0.74	0.96 \pm 0.68	0.98 \pm 0.70	0.68 \pm 0.43	0.67 \pm 0.38	0.76 \pm 0.25

Los valores se presentan como la media \pm s.d.

Para poner a prueba esta hipótesis, evaluamos la eficacia sináptica de las fibras MOC en ratones salvajes y mutantes homocigotas L9'T/L9'T. Para este fin se indujo la liberación de vesículas sinápticas mediante la estimulación eléctrica de las fibras eferentes que inervan a las CCIs a una frecuencia de 1 Hz y se calculó el contenido cuántico (*m*). El contenido cuántico se estimó utilizando los tres métodos detallados en el capítulo anterior: el 'método directo', el 'método de las fallas' y el 'método del coeficiente de variación'. En la tabla VIII se muestran los valores de *m* calculados para 8 CCIs de ratones salvajes y 8 CCIs de ratones mutantes. Los valores obtenidos resultaron consistentes entre los distintos métodos y, si bien el valor promedio de *m* resultó menor para los animales L9'T/L9'T, esta diferencia no resultó significativa ($p > 0.2$, Test de Mann Whitney entre genotipos

para cada método). Este resultado nos indica que a pesar de las diferencias morfológicas entre los terminales sinápticos de los animales salvajes y mutantes, la capacidad de los mismos de liberar neurotransmisor ante la llegada de un potencial de acción no se ve afectada.

5. Cambios en la plasticidad de corto término en la sinapsis MOC-CCIs de los ratones L9'T/L9'T.

Si bien la eficacia sináptica no se encontró alterada en los animales que poseían el receptor mutado, se ha descrito en otros sistemas que los cambios en la cinética de los receptores postsinápticos pueden alterar los procesos de plasticidad de corto término como la depresión (Jones y Westbrook, 1996; Wong et al., 2003). A su vez, entre las proteínas cuya modificación se encuentra desregulada en los ratones $\alpha 9$ y $\alpha 10$ knock-out se cuentan diversas moléculas involucradas en la liberación del neurotransmisor y en el reciclado de vesículas sinápticas (Murthy et al., 2009a). Por lo tanto, decidimos evaluar si existían alteraciones en la plasticidad de corto término en el ratón L9'T/L9'T. Para esto, se estimularon las fibras eferentes con trenes de frecuencias de 10, 50 y 80 Hz de 10 segundos de duración y se midió la respuesta postsináptica en las CCIs. En la figura 34 se muestran registros representativos obtenidos en los animales salvajes (Fig. 34A) o mutantes nAChR $\alpha 9$ L9'T $\alpha 10$ (Fig. 34E). Como puede observarse, la presencia de la mutación generó cambios dramáticos en el perfil de la respuesta de las CCIs ante la estimulación eferente de alta frecuencia. Para analizar con más detalle estos cambios, se calculó el promedio de la amplitud de las respuestas evocadas durante 1 segundo y se graficó este valor normalizado a su valor máximo en función del tiempo de estimulación para las CCIs de los ratones salvajes (Fig. 34B-C) o mutantes (Fig. 34F-H).

En los animales salvajes, las respuestas a baja frecuencia de estimulación (< 50 Hz) no mostraron variaciones a lo largo del tren (Fig. 34B). Sin embargo, cuando las fibras eferentes fueron estimuladas a frecuencias mayores (50 y 80 Hz) se observó un gran aumento en la respuesta inicial (Fig. 34A), que resultó máxima durante el primer segundo de estimulación, y decayó luego rápidamente con constantes de tiempo (τ) en el orden de 2 y 3 s para 50 y 80 Hz, respectivamente (Fig. 34C-D), quedando hacia el final del tren sólo un 20% de la respuesta máxima.

En los ratones L9'T/L9'T, por el contrario, se observó un aumento en la respuesta durante los primeros segundos de la estimulación a todas las frecuencias empleadas, llegando al máximo de respuesta a los 4 segundos, cuando las fibras MOC fueron estimuladas a 10 Hz, y entre los 2 y 3 segundos para estimulaciones de 50 y 80 Hz. Por otro lado, se observó un menor decaimiento de la respuesta postsináptica a lo largo de la estimulación, quedando hacia el final del tren un 50% de la respuesta máxima.

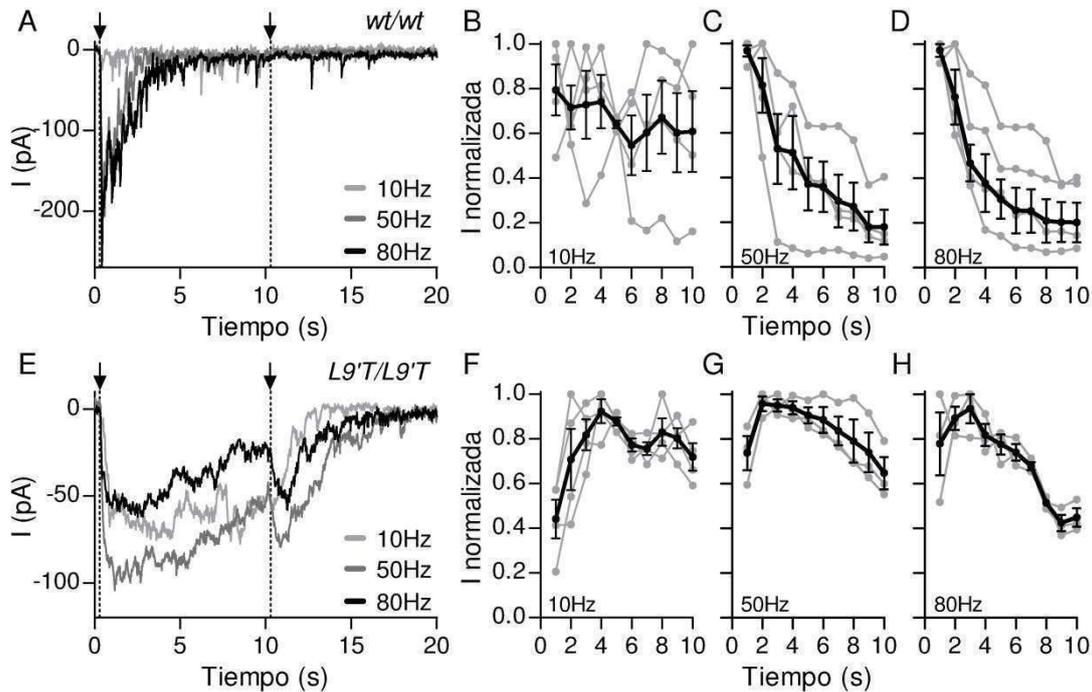


Figura 34. Respuestas sinápticas obtenidas en las CCl's de los ratones L9'T/L9'T ante la estimulación de las fibras MOC a alta frecuencia. A, trazo representativo de la respuesta de las CCl's de animales salvajes ante la estimulación repetitiva durante 10 segundos a 10, 50 y 80 Hz. Las flechas y las líneas punteadas indican el comienzo y el final de la estimulación. Para una mayor claridad, se eliminaron los artefactos de estimulación. Para cada registro se calculó la amplitud promedio de las corrientes evocadas durante 1 segundo y se normalizó el valor obtenido para cada segundo (1-10) al valor máximo de cada registro (I normalizada). En B-D se muestra la corriente (I) normalizada para cada registro individual (trazos grises) y el promedio de todas las células (trazo negro) en función de la duración del estímulo para 10, 50 y 80 Hz, respectivamente. E-H, igual a A-D pero en las CCl's de los ratones L9'T/L9'T.

Como se observó anteriormente en las CCEs (ver Capítulo II, Fig. 28B), luego de la terminación del período de estimulación, se observó en ambos casos un aumento en la liberación espontánea de neurotransmisor. Sin embargo, mientras en las CCl's de los ratones salvajes esto se evidenció como un aumento en la frecuencia de las corrientes sinápticas individuales, en los ratones L9'T/L9'T se observó una corriente entrante sostenida que se mantuvo varios segundos luego de la terminación del estímulo (Fig.32E). Estos resultados nos permiten concluir que el cambio de la cinética del receptor postsináptico de las CCl's resulta en un cambio drástico en las respuestas postsinápticas durante la activación repetitiva de las fibras eferentes. Estos cambios se reflejan en un aumento en el tiempo de crecimiento de las respuestas y en una menor depresión sináptica.

Discusión

Si bien el impacto de la cinética de los receptores postsinápticos en la transmisión sináptica es reconocido, ha sido difícil de estudiar debido a que depende por ejemplo de la existencia de herramientas farmacológicas que permitan modular la actividad de estos canales. En el presente trabajo se presenta la caracterización de un modelo animal que permite abordar este problema. Estos animales son portadores de una mutación puntual que le confiere una ganancia de función al receptor postsináptico de la sinapsis colinérgica entre las fibras MOC y las células ciliadas (Plazas et al., 2005b).

Como se esperaba, las corrientes colinérgicas producidas por la aplicación exógena de ACh en las CCI de los ratones que portan dicha mutación presentan características similares a las descritas para el receptor mutante expresado en forma heteróloga en oocitos de *Xenopus laevis* (Plazas et al., 2005b). Estas características incluyen: un aumento en la afinidad aparente del receptor por la ACh, y una disminución en la tasa de desensibilización ante la presencia continua del agonista. Este cambio en el comportamiento del nAChR de las células ciliadas se refleja en respuestas sinápticas que presentan una mayor duración que las producidas en los animales salvajes. Este efecto, a su vez, se traduce en un aumento significativo en la carga total transferida durante cada evento sináptico. Considerando que una gran fracción ($> 20\%$) de la corriente a través de los nAChR $\alpha 9\alpha 10$ es llevada por Ca^{2+} (Katz et al., 2000; Weisstaub et al., 2002; Gomez-Casati et al., 2005), resultó notable que este aumento de transferencia de carga en los animales L9'T/ L9'T no dañara a las células ciliadas por excitotoxicidad. De hecho, este efecto ha sido previamente reportado en otros modelos animales en los que se introdujeron mutaciones similares en otras subunidades nicotínicas como la $\alpha 4$ y la $\alpha 7$ (Orr-Urtreger et al., 2000; Labarca et al., 2001). Esta diferencia con el resto de los modelos animales se debe probablemente a que las células ciliadas de la cóclea poseen un sistema de control de la concentración intracelular de calcio muy eficiente que podría prevenir este tipo de daño (Hackney et al., 2005).

La activación de las corrientes colinérgicas tanto en las CCI como en las CCE de los ratones L9'T/ L9'T está acoplada a la activación de los canales SK2, confirmando el signo inhibitorio de la sinapsis MOC-células ciliadas en este modelo animal. Un parámetro que no varía entre genotipos cuando se miden las corrientes sinápticas llevadas solamente por el receptor nicotínico ('AChR'), es el tiempo de crecimiento. Sin embargo, cuando se compara este mismo parámetro en condiciones en las que se miden las corrientes mediadas por el nAChR acoplado al canal SK2 ('AChR + SK', $V_{\text{sostén}} = -40 \text{ mV}$) se observa una duplicación en este parámetro. Esta observación es coincidente con la observación de que el tiempo de crecimiento de las corrientes mediadas por el canal SK2 son moduladas por la

duración de la señal de calcio que lo activa mientras que el tiempo de decaimiento es independiente de este valor (Oliver et al., 2000). La duración de la señal de calcio que activa al canal SK2, en nuestras condiciones experimentales, estimada como el ancho medio de la corriente a través del nAChR, indica que hay una triplicación de este valor entre los dos genotipos. Además, el hecho de que el tiempo de decaimiento de las respuestas no presente variaciones tan marcadas entre las corrientes aisladas y acopladas en los ratones L9'T/L9'T podría sugerir que el decaimiento de las corrientes sinápticas pasaría de estar regido por la cinética del canal SK2 en los animales salvajes (Oliver et al., 2000; Gomez-Casati et al., 2005) a estar determinado por el nAChR en los animales mutantes.

Existen evidencias que sugieren que el nivel de actividad colinérgica en las células ciliadas afecta el desarrollo de los contactos sinápticos a estas células (Murthy et al., 2009a). En particular, se ha demostrado que en los animales L9'T/L9'T adultos el tamaño de los botones sinápticos es mayor y que también existe un mayor número de contactos sinápticos por CCE respecto al de sus pares salvajes. Sin embargo, cuando se evaluó la eficacia de la sinapsis colinérgica no se encontraron diferencias significativas entre los ratones salvajes y mutantes. El hecho de que en nuestras condiciones de estimulación se esté probablemente activando un único terminal sináptico (ver discusión Capítulo 2), podría explicar por qué la existencia de un mayor número de terminales no impacta en el valor estimado del contenido cuántico. Por otro lado, el hecho de que no haya cambios en el valor del contenido cuántico en los ratones L9'T/L9'T indica que si hubieran modificaciones en la expresión de proteínas relacionadas con la transmisión sináptica, como fue descrito para los ratones mutantes nulos para la subunidad $\alpha 9$ (Murthy et al., 2009a), éstas no afectan drásticamente la capacidad de liberación de esta sinapsis.

No ocurrió lo mismo, sin embargo, cuando se evaluó la respuesta de las CCI's ante la actividad repetitiva de las fibras MOC. La activación repetitiva de las fibras MOC en ratones que poseen la mutación L9'T produjo respuestas postsinápticas cuya amplitud aumentó durante el estímulo con tiempos de crecimiento (τ) significativamente más lentos que en los ratones salvajes. A su vez, se observó que este aumento de la respuesta durante la estimulación se observa incluso a bajas frecuencias (10 Hz) en los ratones L9'T/ L9'T, mientras que es necesaria una mayor frecuencia de estimulación para observar el mismo fenómeno en los ratones salvajes. Esta diferencia puede probablemente atribuirse al mayor grado de sumación de las respuestas postsinápticas debido al aumento del tiempo de decaimiento causado por la mutación. Es necesario, sin embargo, un análisis más detallado para determinar si además existen cambios en los procesos de plasticidad de corto

término que pudieran a su vez influenciar la velocidad de subida de las respuestas sinápticas en las CClIs ante los trenes de estimulación.

Por otro lado, se observó que en los animales salvajes existe una marcada depresión de la respuesta postsináptica durante los 10 segundos de estimulación y que esta depresión aumenta con la frecuencia del estímulo, llegándose a una disminución del 80% de la respuesta máxima a una frecuencia de estimulación de 80 Hz. En las CClIs de los ratones que poseen la mutación, sin embargo, las respuestas sinápticas resultan mucho más estables, registrándose una reducción de la respuesta máxima de alrededor del 50% a una frecuencia de estimulación de 80 Hz. Este resultado indica que en la sinapsis MOC-CClIs de los animales L9'T/L9'T existe una menor tasa de depresión sináptica, sugiriendo que la presencia de un receptor $\alpha 9\alpha 10$ mutado implicaría cambios a nivel presináptico. De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que la ausencia de actividad colinérgica en las células ciliadas de la cóclea induce cambios en la expresión de proteínas asociadas con el tráfico y la fusión de las vesículas sinápticas (Murthy et al., 2009a). Es razonable suponer que los cambios en la expresión de estas proteínas en los ratones L9'T/L9'T podrían estar implicados en la disminución de la depresión sináptica que presentan los estos animales. A su vez, no es posible descartar que el aumento en la carga de calcio entrante a través de los nAChR en los ratones que albergan una mutación en este receptor, podrían activar en mayor medida liberación de calcio desde las cisternas subsinápticas y que sea este efecto el que sostenga la respuesta postsináptica durante períodos prolongados (Shigemoto y Ohmori, 1991; Yoshida et al., 1994; Lioudyno et al., 2004). Más aún, un mecanismo de este tipo podría explicar la presencia de corrientes sostenidas que se prolongan hacia el final de los trenes de 10 segundos en la sinapsis MOC-CCI de los ratones mutantes.

Las consecuencias funcionales de la presencia de esta mutación han sido estudiadas mediante ensayos de fisiología auditiva (Taranda et al., 2009a). El efecto de la activación del sistema eferente en la amplificación coclear fue estudiado midiendo el cambio en el umbral del sonido necesario para producir los productos de distorsión de las emisiones otoacústicas (DPOAEs) (Fig. 35). Las DPOAEs son componentes de los sonidos emitidos por el oído en respuesta un estímulo sonoro particular y su amplitud es una medida indirecta del nivel de actividad de las CCEs. La estimulación eléctrica de las fibras eferentes a la altura del tallo encefálico, a 200 Hz durante 70 segundos, produce una disminución en la amplitud de las DPOAEs en los animales salvajes, heterocigotas u homocigotas para la mutación. Esto es consistente con la inhibición de la actividad de amplificación mediada por las CCEs. Notablemente, el curso temporal de esta inhibición resultó semejante al perfil de las respuestas postsinápticas observadas en las CClIs en respuesta a trenes de estimulación. En los

ratones salvajes se observa una rápida disminución de la amplitud de las DPOAEs durante la estimulación, que luego alcanza un nivel estable que se mantiene hasta el final del pulso. En los animales homocigotas para la mutación, por el contrario, la respuesta inhibitoria (disminución de la amplitud de las DPOAES) crece más lentamente, continuando su crecimiento hasta el final del pulso. Además, la inhibición de la respuesta se mantiene hasta 10 minutos luego de la finalización del estímulo (Taranda et al., 2009a). Estos resultados apoyan la idea de que la dinámica de la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs determinaría el efecto global del sistema eferente en la función auditiva. Es importante notar, sin embargo, que los cambios observados en la respuesta sináptica de las CCEs en los animales L9'T/L9'T, no explica el efecto sostenido de la inhibición una vez terminada la estimulación del sistema eferente. Este efecto se debe probablemente a alteraciones que ocurren río abajo del cambio de conductancia producido por la liberación de ACh desde las fibras MOC. Se ha propuesto que el efecto inicial de la activación de las corrientes colinérgicas es impedir la electromotilidad de las CCEs cambiando el estado funcional de la prestina (Frolenkov, 2006) o reduciendo el potencial receptor mediante el aumento de la corriente de fuga (Rabbitt et al., 2009). Sin embargo, se ha demostrado que la ACh es también capaz de cambiar la rigidez de la membrana modificando así la respuesta electromotil de las CCEs en el orden de segundos (Dallos et al., 1997; Batta et al., 2004). Este efecto es dependiente del calcio extracelular (Dallos et al., 1997) y puede involucrar tanto modificaciones del citoesqueleto como cambios en el funcionamiento de la prestina (Frolenkov et al., 2000; He et al., 2003). Más aún, algunos autores sugieren que es posible que la liberación de calcio desde las cisternas subsinápticas de las CCEs podría propagarse hacia la pared basolateral modulando así la electromotilidad (Frolenkov, 2006). Considerando el aumento de la corriente de calcio que experimentan las células ciliadas que poseen el receptor $\alpha 9\alpha 10$ mutado, es esperable que alguno de estos efectos se encuentre exacerbado, explicando así la inhibición sostenida del amplificador coclear.

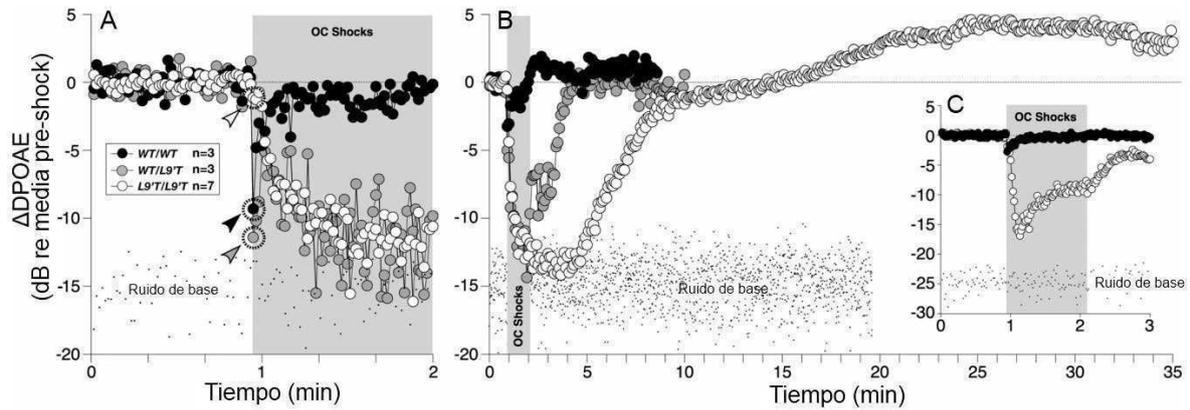


Figura 35. La inhibición de las DPOAEs mediada por el sistema MOC se encuentra enlentecida, aumentada y prolongada en los ratones mutantes. A-B, la amplitud de las DPOAEs medida antes, durante y luego de un tren de estimulación de 70s al haz olivococlear (recuadro gris) se muestra en dos escalas temporales para dar más detalle del inicio (A) y de la terminación (B) del efecto de la estimulación. Las DPOAEs de cada experimento fueron normalizadas al valor promedio medido previamente al estímulo y luego promediadas entre distintos animales de cada genotipo (el número de animales por genotipo se indica en el recuadro de A). Las puntas de flecha en A indican el primer punto medido luego del comienzo del estímulo. El tiempo de adquisición fue de aproximadamente 1 s por punto. Para A y B el estímulo sonoro fue de 22.6 kHz. La intensidad del estímulo sonoro fue ajustada para obtener DPOAEs pre-estímulo que se encontraran 15 dB por encima del ruido de base. La inhibición medida en los animales mutantes fue tan fuerte que los valores de amplitud de las DPOAEs quedaron en el ruido de base. En C se repitió este experimento partiendo de un estímulo que produjera DPOAEs de una amplitud pre-estímulo 25dB por encima del ruido de base para poder evaluar la magnitud de la inhibición en los animales salvajes y mutantes: ~5 dB para wt/wt y ~17 dB para L9'T/ L9'T. (Adaptado de Taranda et al., 2009a)

Conclusiones

Conclusiones

1. La sinapsis entre las fibras MOC y las células ciliadas como modelo de sinapsis colinérgica neuronal.

La sinapsis entre las fibras MOC y las células ciliadas del órgano de Corti constituye uno de los pocos ejemplos de sinapsis rápidas mediadas por receptores nicotínicos no ganglionares. Esto se debe a que en el sistema nervioso central la transmisión colinérgica es difusa y no es sencillo estudiar los sitios postsinápticos en forma aislada. A su vez, en los modelos conocidos de sinapsis colinérgicas la expresión de un gran número de subunidades dificulta la determinación de los receptores que median las respuestas medidas electrofisiológicamente (Dani y Bertrand, 2007). En el caso de las sinapsis MOC-CCI y MOC-CCE, trabajos anteriores habían demostrado que la subunidad $\alpha 9$ es necesaria para mantener la función eferente normal (Vetter et al., 1999). En este trabajo hemos demostrado que si bien la subunidad $\alpha 9$ es capaz de formar receptores funcionales en las CCEs en ausencia de la subunidad $\alpha 10$, las corrientes colinérgicas mediadas por el nAChR homomérico son muy pequeñas e infrecuentes. Además, en estos ratones con una mutación nula para la subunidad $\alpha 10$, la función fisiológica de la sinapsis MOC-CCEs, es decir la inhibición del amplificador coclear, está ausente (Vetter et al., 2007). De esta manera queda determinada inequívocamente la identidad molecular del receptor colinérgico de las células ciliadas de la cóclea, convirtiendo así a la sinapsis entre las fibras MOC y las células ciliadas en un modelo atractivo para estudiar la neurotransmisión colinérgica rápida mediada por un nAChR neuronal.

2. La sinapsis MOC-células ciliadas como modelo para el estudio del desarrollo de las sinapsis.

El proceso de armado (sinaptogénesis) y desarmado de los contactos sinápticos es un proceso fundamental tanto para el desarrollo del sistema nervioso como para la remodelación de circuitos neuronales durante el funcionamiento del sistema nervioso. El desarrollo de la inervación MOC al órgano de Corti es un sistema adecuado y de fácil abordaje para estudiar estos procesos. Esto se debe a que la maduración final del órgano de Corti involucra un activo proceso de remodelación sináptica que consta de: un establecimiento inicial de contactos sinápticos de las fibras MOC con las CCIs, un establecimiento más tardío de contactos sinápticos con las CCEs y una retracción final de las sinapsis formadas con las CCIs (Lenoir et al., 1980; Simmons, 2002). Todo este proceso se produce en forma postnatal en roedores altriciales y puede ser estudiado electrofisiológicamente utilizando la preparación del órgano de Corti descrita en este trabajo.

Si bien la sinaptogénesis y el desensamblado de las conexiones sinápticas dependen de la interacción entre las células presináptica y postsináptica, se ha demostrado en diversos sistemas que la célula postsináptica tiene un rol dominante en estos procesos (Goda y Davis, 2003). Por ejemplo, en la sinapsis neuromuscular existe una especialización de la membrana postsináptica que incluye la expresión de los nAChR que precede al arribo de los terminales sinápticos de los axones (Burden, 2002). En forma similar, el desarmado de sinapsis está asociado a una rápida disminución de la expresión de proteínas postsinápticas como los nAChR y la rapsina (Culican et al., 1998). El hecho de que el mantenimiento de las sinapsis sea altamente dependiente de la actividad postsináptica aboga también a favor de una dominancia postsináptica (Katz y Shatz, 1996; Sanes y Lichtman, 1999). Este paradigma es consistente con el hecho de que los periodos de inervación en las CCI y CCEs coincidan con la expresión de las subunidades del nAChR. El hecho de que se sepa la identidad molecular del receptor postsináptico en estas células (nAChR $\alpha 9\alpha 10$) y que la expresión de las subunidades que lo componen sea casi exclusiva del oído interno (Elgoyhen et al., 1994; Elgoyhen et al., 2001), permite la alteración genética de estas moléculas y la posterior evaluación del efecto de estas alteraciones en el patrón de inervación del epitelio sensorial del sistema auditivo en el desarrollo.

Una aproximación a este tipo de estudios se realizó en el presente trabajo mediante la expresión constante durante el desarrollo del mensajero de la subunidad $\alpha 10$. Sorprendentemente, encontramos que la expresión constitutiva del mensajero de la subunidad $\alpha 10$ no es suficiente para mantener la funcionalidad de la sinapsis MOC-células ciliadas. Más aún, el forzar el sistema mediante la expresión conjunta de las subunidades transgénicas $\alpha 9$ y $\alpha 10$ no fue capaz de desregular el curso temporal de la desaparición de las respuestas colinérgicas en las CCI luego del comienzo de la audición. Este resultado sugiere la existencia de un programa de armado y desarmado de esta sinapsis controlado por factores río arriba de la transcripción génica de estas dos subunidades. Estudios futuros son necesarios para determinar cuáles son los determinantes moleculares que conducen la expresión de estas dos subunidades durante el desarrollo.

3. Fisiología sináptica y control de la función sensorial por el SNC.

Si bien la plasticidad sináptica de corto término ha sido estudiada en numerosos sistemas, en muchos casos es difícil determinar la relevancia fisiológica de estos procesos (Fisher et al., 1997). En este sentido la sinapsis entre las fibras MOC y las CCEs es un modelo atractivo ya que el efecto de la activación de esta sinapsis resulta en cambios en la función auditiva que son medibles y que se

encuentran ampliamente caracterizados en diversos trabajos de fisiología auditiva (Galambos, 1956; Mountain, 1980; Guinan, 2006). En estos trabajos se ha demostrado desde hace años que la inhibición de la función auditiva es dependiente de la frecuencia de activación del sistema MOC (Galambos, 1956; Wiederhold y Kiang, 1970; Gifford y Guinan, 1987). En el presente trabajo se demuestra que existe una dependencia entre la magnitud de las corrientes inhibitorias producidas en las CCEs y la frecuencia de activación de las fibras MOC, y que esto ocurre debido a dos procesos: facilitación presináptica y sumación de las corrientes postsinápticas. Más aún, encontramos que el rango de frecuencias en el que se encuentra dicha dependencia coincide con el descrito en los experimentos de fisiología auditiva realizados *in-vivo* (Fig. 29). Esto nos permite proponer que los cambios de corto término en la eficacia sináptica a nivel de la sinapsis MOC-CCEs modulan la regulación de la audición por el sistema MOC.

Apoyando esta hipótesis, observamos que cuando se modifica la dinámica de la sinapsis MOC-CCIs mediante la introducción de una mutación puntual en la subunidad $\alpha 9$, se producen cambios fuertemente correlacionados con el efecto MOC sobre la función auditiva.

Si bien los datos presentados en este trabajo aportan información respecto a los procesos neuronales subyacentes a la inhibición de la audición por el sistema MOC, queda aún pendiente entender cuál es la relación entre la magnitud de las corrientes inhibitorias y la función del amplificador coclear que puedan explicar la fuerte correlación entre las respuestas sinápticas y las de fisiología auditiva obtenidas *in-vivo*. Para responder esta pregunta será de gran interés en el futuro utilizar los patrones de respuesta descritos en este trabajo y estudiar su impacto en procesos relacionados con la amplificación de las señales sonoras, como es el caso de la electromotilidad somática que presentan las CCEs.

Bibliografía

- Akita T, Kuba K (2000) Functional triads consisting of ryanodine receptors, Ca(2+) channels, and Ca(2+)-activated K(+) channels in bullfrog sympathetic neurons. Plastic modulation of action potential. *J Gen Physiol* 116:697-720.
- Allen C, Stevens CF (1994) An evaluation of causes for unreliability of synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10380-10383.
- Art JJ, Fettiplace R (1984) Efferent desensitization of auditory nerve fibre responses in the cochlea of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J Physiol* 356:507-523.
- Art JJ, Fettiplace R, Fuchs PA (1984) Synaptic hyperpolarization and inhibition of turtle cochlear hair cells. *J Physiol* 356:525-550.
- Ashmore J (2008) Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88:173-210.
- Ashmore J, Avan P, Brownell WE, Dallos P, Dierkes K, Fettiplace R, Grosh K, Hackney CM, Hudspeth AJ, Julicher F, Lindner B, Martin P, Meaud J, Petit C, Sacchi JR, Canlon B (2010) The remarkable cochlear amplifier. *Hear Res* 266:1-17.
- Ashmore JF (1987) A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol* 388:323-347.
- Auger C, Marty A (2000) Quantal currents at single-site central synapses. *J Physiol* 526 Pt 1:3-11.
- Batta TJ, Panyi G, Szucs A, Sziklai I (2004) Regulation of the lateral wall stiffness by acetylcholine and GABA in the outer hair cells of the guinea pig. *Eur J Neurosci* 20:3364-3370.
- Bekkers JM (1994) Quantal analysis of synaptic transmission in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 4:360-365.
- Bekkers JM, Richerson GB, Stevens CF (1990) Origin of variability in quantal size in cultured hippocampal neurons and hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5359-5362.
- Beutner D, Moser T (2001) The presynaptic function of mouse cochlear inner hair cells during development of hearing. *J Neurosci* 21:4593-4599.
- Blankenship AG, Feller MB (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18-29.
- Blatow M, Caputi A, Burnashev N, Monyer H, Rozov A (2003) Ca²⁺ buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron* 38:79-88.
- Branco T, Staras K (2009) The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat Rev Neurosci* 10:373-383.
- Brown MC (1989) Morphology and response properties of single olivocochlear fibers in the guinea pig. *Hear Res* 40:93-109.
- Brown MC, Nuttall AL (1984) Efferent control of cochlear inner hair cell responses in the guinea-pig. *J Physiol* 354:625-646.
- Brown MC, Pierce S, Berglund AM (1991) Cochlear-nucleus branches of thick (medial) olivocochlear fibers in the mouse: a cochleotopic projection. *J Comp Neurol* 303:300-315.
- Brown MC, Kujawa SG, Duca ML (1998) Single olivocochlear neurons in the guinea pig. I. Binaural facilitation of responses to high-level noise. *J Neurophysiol* 79:3077-3087.
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de Ribaupierre Y (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227:194-196.
- Bruce LL, Christensen MA, Warr WB (2000) Postnatal development of efferent synapses in the rat cochlea. *J Comp Neurol* 423:532-548.
- Burden SJ (2002) Building the vertebrate neuromuscular synapse. *J Neurobiol* 53:501-511.
- Carlier E, Abonnenc M, Pujol R (1975) [Maturation of unitary responses to tonal stimulation in the cochlear nerve of the kitten]. *J Physiol (Paris)* 70:129-138.
- Chen C, Blitz DM, Regehr WG (2002) Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. *Neuron* 33:779-788.
- Cody AR, Johnstone BM (1982) Reduced temporary and permanent hearing losses with multiple tone exposures. *Hear Res* 6:291-301.

- Cooper NP, Guinan JJ, Jr. (2006) Efferent-mediated control of basilar membrane motion. *J Physiol* 576:49-54.
- Crawford AC, Fettiplace R (1985) The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *J Physiol* 364:359-379.
- Culican SM, Nelson CC, Lichtman JW (1998) Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J Neurosci* 18:4953-4965.
- Dallos P (1996) Overview: Cochlear Neurobiology. In: *The Cochlea* (Dallos P, Popper AN, Fay RR, eds), pp 1-43. New York: Springer-Verlag.
- Dallos P, Harris D (1978) Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol* 41:365-383.
- Dallos P, He DZ, Lin X, Sziklai I, Mehta S, Evans BN (1997) Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J Neurosci* 17:2212-2226.
- Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WH, Sengupta S, He DZ, Zuo J (2008) Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron* 58:333-339.
- Dani JA, Bertrand D (2007) Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:699-729.
- Davis H (1983) An active process in cochlear mechanics. *Hear Res* 9:79-90.
- de Venecia RK, Liberman MC, Guinan JJ, Jr., Brown MC (2005) Medial olivocochlear reflex interneurons are located in the posteroventral cochlear nucleus: a kainic acid lesion study in guinea pigs. *J Comp Neurol* 487:345-360.
- Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* 491 (Pt 1):163-176.
- Del Castillo J, Katz B (1954a) Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. *J Physiol* 124:574-585.
- Del Castillo J, Katz B (1954b) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- Delano PH, Elgueda D, Hamame CM, Robles L (2007) Selective attention to visual stimuli reduces cochlear sensitivity in chinchillas. *J Neurosci* 27:4146-4153.
- Dittman JS, Kreitzer AC, Regehr WG (2000) Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci* 20:1374-1385.
- Dolan DF, Nuttall AL (1988) Masked cochlear whole-nerve response intensity functions altered by electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle. *J Acoust Soc Am* 83:1081-1086.
- Dulon D, Lenoir M (1996) Cholinergic responses in developing outer hair cells of the rat cochlea. *Eur J Neurosci* 8:1945-1952.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705-715.
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J (2001) alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-3506.
- Evans EF, Harrison RV (1976) Proceedings: Correlation between cochlear outer hair cell damage and deterioration of cochlear nerve tuning properties in the guinea-pig. *J Physiol* 256:43P-44P.
- Evans MG (1996) Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J Physiol* 491 (Pt 2):563-578.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309-373.
- Felmy F, Neher E, Schneggenburger R (2003) Probing the intracellular calcium sensitivity of transmitter release during synaptic facilitation. *Neuron* 37:801-811.

- Fettiplace R (2009) Defining features of the hair cell mechano-electrical transducer channel. *Pflügers Arch* 458:1115-1123.
- Fisher SA, Fischer TM, Carew TJ (1997) Multiple overlapping processes underlying short-term synaptic enhancement. *Trends Neurosci* 20:170-177.
- Flock A, Russell IJ (1973) The post-synaptic action of efferent fibres in the lateral line organ of the burbot *Lota lota*. *J Physiol* 235:591-605.
- Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Cuttle MF, Takahashi T (1998) Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron* 20:797-807.
- Fortune ES, Rose GJ (2001) Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci* 24:381-385.
- Franchini LF, Elgoyhen AB (2006) Adaptive evolution in mammalian proteins involved in cochlear outer hair cell electromotility. *Mol Phylogenet Evol* 41:622-635.
- Frank T, Khimich D, Neef A, Moser T (2009) Mechanisms contributing to synaptic Ca²⁺ signals and their heterogeneity in hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4483-4488.
- Friauf E, Lohmann C (1999) Development of auditory brainstem circuitry. Activity-dependent and activity-independent processes. *Cell Tissue Res* 297:187-195.
- Fritsch B, Nichols DH (1993) Dil reveals a prenatal arrival of efferents at the differentiating otocyst of mice. *Hear Res* 65:51-60.
- Frolenkov GI (2006) Regulation of electromotility in the cochlear outer hair cell. *J Physiol* 576:43-48.
- Frolenkov GI, Mammano F, Belyantseva IA, Coling D, Kachar B (2000) Two distinct Ca²⁺-dependent signaling pathways regulate the motor output of cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 20:5940-5948.
- Fuchs PA, Murrow BW (1992) Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci* 12:800-809.
- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:452-458.
- Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2000) Plasticity in the development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat after unilateral cochlear ablation. *J Neurosci* 20:6939-6949.
- Galambos R (1956) Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 19:424-437.
- Galambos R, Davis J (1943) The response of single auditory-nerve fibers to acoustic stimulation. *J Neurophysiol* 6:39-57.
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083-11090.
- Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H (1993) Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69:236-242.
- Gifford ML, Guinan JJ, Jr. (1987) Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hear Res* 29:179-194.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2000) Cholinergic synaptic inhibition of inner hair cells in the neonatal mammalian cochlea. *Science* 288:2366-2368.
- Goda Y, Davis GW (2003) Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron* 40:243-264.
- Gomez-Casati ME, Fuchs PA, Elgoyhen AB, Katz E (2005) Biophysical and pharmacological characterization of nicotinic cholinergic receptors in rat cochlear inner hair cells. *J Physiol* 566:103-118.
- Goutman JD, Fuchs PA, Glowatzki E (2005) Facilitating efferent inhibition of inner hair cells in the cochlea of the neonatal rat. *J Physiol* 566:49-59.

- Grossman Y, Parnas I, Spira ME (1979) Differential conduction block in branches of a bifurcating axon. *J Physiol* 295:283-305.
- Guinan JJ, Jr. (1996) Physiology of olivocochlear efferents. In: *The Cochlea* (Dallos P, Popper AN, Fay RR, eds), pp 435–502. New York: Springer-Verlag.
- Guinan JJ, Jr. (2006) Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hear* 27:589-607.
- Gummer AW, Mark RF (1994) Patterned neural activity in brain stem auditory areas of a prehearing mammal, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Neuroreport* 5:685-688.
- Hackney CM, Mahendrasingam S, Penn A, Fettiplace R (2005) The concentrations of calcium buffering proteins in mammalian cochlear hair cells. *J Neurosci* 25:7867-7875.
- Harris KM, Sultan P (1995) Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology* 34:1387-1395.
- He DZ, Jia S, Dallos P (2003) Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. *J Neurosci* 23:9089-9096.
- Horvath M, Ribari O, Repassy G, Toth IE, Boldogkoi Z, Palkovits M (2003) Intracochlear injection of pseudorabies virus labels descending auditory and monoaminergic projections to olivocochlear cells in guinea pig. *Eur J Neurosci* 18:1439-1447.
- Housley GD, Ashmore JF (1991) Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc Biol Sci* 244:161-167.
- Hudspeth AJ (2008) Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear. *Neuron* 59:530-545.
- Johnson SL, Eckrich T, Kuhn S, Zampini V, Franz C, Ranatunga KM, Roberts TP, Masetto S, Knipper M, Kros CJ, Marcotti W (2011) Position-dependent patterning of spontaneous action potentials in immature cochlear inner hair cells. *Nat Neurosci* 14:711-717.
- Jonas P, Major G, Sakmann B (1993) Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J Physiol* 472:615-663.
- Jones MV, Westbrook GL (1996) The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19:96-101.
- Jones TA, Jones SM, Paggett KC (2001) Primordial rhythmic bursting in embryonic cochlear ganglion cells. *J Neurosci* 21:8129-8135.
- Jones TA, Leake PA, Snyder RL, Stakhovskaya O, Bonham B (2007) Spontaneous discharge patterns in cochlear spiral ganglion cells before the onset of hearing in cats. *J Neurophysiol* 98:1898-1908.
- Kandler K (2004) Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr Opin Neurobiol* 14:96-104.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195:481-492.
- Katz E, Verbitsky M, Rothlin CV, Vetter DE, Heinemann SF, Elgoyhen AB (2000) High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor. *Hear Res* 141:117-128.
- Katz E, Elgoyhen AB, Gomez-Casati ME, Knipper M, Vetter DE, Fuchs PA, Glowatzki E (2004) Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 24:7814-7820.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.
- Kawase T, Delgutte B, Liberman MC (1993) Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J Neurophysiol* 70:2533-2549.
- Kemp DT (1978) Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 64:1386-1391.
- Kennedy HJ, Crawford AC, Fettiplace R (2005) Force generation by mammalian hair bundles supports a role in cochlear amplification. *Nature* 433:880-883.

- Kiang NY, Watanabe T, Thomas EC, Clark LF (1962) Stimulus coding in the cat's auditory nerve. Preliminary report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 71:1009-1026.
- Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273:1709-1714.
- Kong JH, Adelman JP, Fuchs PA (2008) Expression of the SK2 calcium-activated potassium channel is required for cholinergic function in mouse cochlear hair cells. *J Physiol* 586:5471-5485.
- Kros CJ, Ruppersberg JP, Rusch A (1998) Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394:281-284.
- Kujawa SG, Liberman MC (2001) Effects of olivocochlear feedback on distortion product otoacoustic emissions in guinea pig. *J Assoc Res Otolaryngol* 2:268-278.
- Labarca C, Schwarz J, Deshpande P, Schwarz S, Nowak MW, Fonck C, Nashmi R, Kofuji P, Dang H, Shi W, Fidan M, Khakh BS, Chen Z, Bowers BJ, Boulter J, Wehner JM, Lester HA (2001) Point mutant mice with hypersensitive alpha 4 nicotinic receptors show dopaminergic deficits and increased anxiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2786-2791.
- Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-456.
- Leake PA, Hradek GT, Chair L, Snyder RL (2006) Neonatal deafness results in degraded topographic specificity of auditory nerve projections to the cochlear nucleus in cats. *J Comp Neurol* 497:13-31.
- Leao RN, Sun H, Svahn K, Berntson A, Youssoufian M, Paolini AG, Fyffe RE, Walmsley B (2006) Topographic organization in the auditory brainstem of juvenile mice is disrupted in congenital deafness. *J Physiol* 571:563-578.
- Lenoir M, Shnerson A, Pujol R (1980) Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 160:253-262.
- Liberman MC (1982) The cochlear frequency map for the cat: labeling auditory-nerve fibers of known characteristic frequency. *J Acoust Soc Am* 72:1441-1449.
- Liberman MC (1989) Rapid assessment of sound-evoked olivocochlear feedback: suppression of compound action potentials by contralateral sound. *Hear Res* 38:47-56.
- Liberman MC, Kiang NY (1978) Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Otolaryngol Suppl* 358:1-63.
- Liberman MC, Brown MC (1986) Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear Res* 24:17-36.
- Liberman MC, Puria S, Guinan JJ, Jr. (1996) The ipsilaterally evoked olivocochlear reflex causes rapid adaptation of the 2f1-f2 distortion product otoacoustic emission. *J Acoust Soc Am* 99:3572-3584.
- Lioudyno M, Hiel H, Kong JH, Katz E, Waldman E, Parameshwaran-Iyer S, Glowatzki E, Fuchs PA (2004) A "synaptoplasmic cistern" mediates rapid inhibition of cochlear hair cells. *J Neurosci* 24:11160-11164.
- Lippe WR (1994) Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neurosci* 14:1486-1495.
- Lisman JE (1997) Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* 20:38-43.
- Luo L, Bennett T, Jung HH, Ryan AF (1998) Developmental expression of alpha 9 acetylcholine receptor mRNA in the rat cochlea and vestibular inner ear. *J Comp Neurol* 393:320-331.
- Maison S, Micheyl C, Collet L (2001) Influence of focused auditory attention on cochlear activity in humans. *Psychophysiology* 38:35-40.
- Maison SF, Adams JC, Liberman MC (2003) Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J Comp Neurol* 455:406-416.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.

- Mallart A, Martin AR (1967) An analysis of facilitation of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 193:679-694.
- Manley GA (2000) Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11736-11743.
- Manley GA, Koppl C (1998) Phylogenetic development of the cochlea and its innervation. *Curr Opin Neurobiol* 8:468-474.
- Maoileidigh DO, Julicher F (2010) The interplay between active hair bundle motility and electromotility in the cochlea. *J Acoust Soc Am* 128:1175-1190.
- Marcotti W, Kros CJ (1999) Developmental expression of the potassium current $I_{K,n}$ contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol* 520 Pt 3:653-660.
- Marcotti W, Johnson SL, Kros CJ (2004) A transiently expressed SK current sustains and modulates action potential activity in immature mouse inner hair cells. *J Physiol* 560:691-708.
- Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11:812-822.
- Merchan-Perez A, Liberman MC (1996) Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *J Comp Neurol* 371:208-221.
- Meyer AC, Moser T (2010) Structure and function of cochlear afferent innervation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 18:441-446.
- Millar NS (2008) RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S177-183.
- Mochida S, Few AP, Scheuer T, Catterall WA (2008) Regulation of presynaptic $Ca(V)2.1$ channels by Ca^{2+} sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. *Neuron* 57:210-216.
- Morley BJ, Simmons DD (2002) Developmental mRNA expression of the $\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in the rat cochlea. *Brain Res Dev Brain Res* 139:87-96.
- Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppertsberg JP (1994) A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* 266:1059-1062.
- Mountain DC (1980) Changes in endolymphatic potential and crossed olivocochlear bundle stimulation alter cochlear mechanics. *Science* 210:71-72.
- Mulders WH, Robertson D (2000a) Evidence for direct cortical innervation of medial olivocochlear neurones in rats. *Hear Res* 144:65-72.
- Mulders WH, Robertson D (2000b) Effects on cochlear responses of activation of descending pathways from the inferior colliculus. *Hear Res* 149:11-23.
- Mulders WH, Robertson D (2001) Origin of the noradrenergic innervation of the superior olivary complex in the rat. *J Chem Neuroanat* 21:313-322.
- Mulkey RM, Zucker RS (1992) Posttetanic potentiation at the crayfish neuromuscular junction is dependent on both intracellular calcium and sodium ion accumulation. *J Neurosci* 12:4327-4336.
- Muller M, Felmy F, Schwaller B, Schneggenburger R (2007) Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca^{2+} buffer in the calyx of held that accelerates the decay of Ca^{2+} and short-term facilitation. *J Neurosci* 27:2261-2271.
- Murthy V, Taranda J, Elgoyhen AB, Vetter DE (2009a) Activity of nAChRs containing $\alpha 9$ subunits modulates synapse stabilization via bidirectional signaling programs. *Dev Neurobiol* 69:931-949.
- Murthy V, Maison SF, Taranda J, Haque N, Bond CT, Elgoyhen AB, Adelman JP, Liberman MC, Vetter DE (2009b) SK2 channels are required for function and long-term survival of efferent synapses on mammalian outer hair cells. *Mol Cell Neurosci* 40:39-49.
- Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF (1997) Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18:599-612.

- Nadol JB, Jr. (1988) Comparative anatomy of the cochlea and auditory nerve in mammals. *Hear Res* 34:253-266.
- Narita K, Akita T, Hachisuka J, Huang S, Ochi K, Kuba K (2000) Functional coupling of Ca²⁺ channels to ryanodine receptors at presynaptic terminals. Amplification of exocytosis and plasticity. *J Gen Physiol* 115:519-532.
- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (1996a) Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. I. Properties of the response. *Hear Res* 101:132-148.
- Nenov AP, Norris C, Bobbin RP (1996b) Acetylcholine response in guinea pig outer hair cells. II. Activation of a small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Hear Res* 101:149-172.
- Nieder P, Nieder I (1970) Stimulation of efferent olivocochlear bundle causes release from low level masking. *Nature* 227:184-185.
- Oatman LC (1976) Effects of visual attention on the intensity of auditory evoked potentials. *Exp Neurol* 51:41-53.
- Oliver D, Klocker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppertsberg JP, Fakler B (2000) Gating of Ca²⁺-activated K⁺ channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26:595-601.
- Orr-Urtreger A, Broide RS, Kasten MR, Dang H, Dani JA, Beaudet AL, Patrick JW (2000) Mice homozygous for the L250T mutation in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor show increased neuronal apoptosis and die within 1 day of birth. *J Neurochem* 74:2154-2166.
- Ota Y, Oliver DL, Dolan DF (2004) Frequency-specific effects on cochlear responses during activation of the inferior colliculus in the Guinea pig. *J Neurophysiol* 91:2185-2193.
- Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005a) Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci* 25:10905-10912.
- Plazas PV, De Rosa MJ, Gomez-Casati ME, Verbitsky M, Weisstaub N, Katz E, Bouzat C, Elgoyhen AB (2005b) Key roles of hydrophobic rings of TM2 in gating of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *Br J Pharmacol* 145:963-974.
- Puel JL, Uziel A (1987) Correlative development of cochlear action potential sensitivity, latency, and frequency selectivity. *Brain Res* 465:179-188.
- Pujol R, Lavigne-Rebillard M, Lenoir M (1998) Development of sensory and neural structures in the mammalian cochlea. In: *Development of the auditory system*. (Rubel EW, Popper AN, Fay RR, eds), pp 146-192. New York: Springer-Verlag.
- Rabbitt RD, Clifford S, Breneman KD, Farrell B, Brownell WE (2009) Power efficiency of outer hair cell somatic electromotility. *PLoS Comput Biol* 5:e1000444.
- Rajan R (2000) Centrifugal pathways protect hearing sensitivity at the cochlea in noisy environments that exacerbate the damage induced by loud sound. *J Neurosci* 20:6684-6693.
- Raphael Y, Altschuler RA (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 60:397-422.
- Rhode WS (1971) Observations of the vibration of the basilar membrane in squirrel monkeys using the Mossbauer technique. *J Acoust Soc Am* 49:Suppl 2:1218+.
- Robertson D, Gummer M (1985) Physiological and morphological characterization of efferent neurones in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 20:63-77.
- Robles L, Ruggero MA (2001) Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81:1305-1352.
- Robles L, Ruggero MA, Rich NC (1986) Basilar membrane mechanics at the base of the chinchilla cochlea. I. Input-output functions, tuning curves, and response phases. *J Acoust Soc Am* 80:1364-1374.
- Rothlin CV, Katz E, Verbitsky M, Elgoyhen AB (1999) The alpha9 nicotinic acetylcholine receptor shares pharmacological properties with type A gamma-aminobutyric acid, glycine, and type 3 serotonin receptors. *Mol Pharmacol* 55:248-254.
- Rothlin CV, Lioudyno MI, Silbering AF, Plazas PV, Casati ME, Katz E, Guth PS, Elgoyhen AB (2003) Direct interaction of serotonin type 3 receptor ligands with recombinant and native alpha 9 alpha 10-containing nicotinic cholinergic receptors. *Mol Pharmacol* 63:1067-1074.

- Roux I, McIntosh M, Fuchs P, Glowatzki E (2011) Onset of cholinergic efferent synaptic transmission at the rat inner hair cell. In: Annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology (Santi PA, ed), p 192. Baltimore, Maryland, USA: Association for Research in Otolaryngology
- Rubel EW, Fritsch B (2002) Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci* 25:51-101.
- Ryan A, Dallos P (1975) Effect of absence of cochlear outer hair cells on behavioural auditory threshold. *Nature* 253:44-46.
- Sage C, Huang M, Vollrath MA, Brown MC, Hinds PW, Corey DP, Vetter DE, Chen ZY (2006) Essential role of retinoblastoma protein in mammalian hair cell development and hearing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7345-7350.
- Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.
- Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17:5858-5867.
- Sellick PM, Patuzzi R, Johnstone BM (1982) Measurement of basilar membrane motion in the guinea pig using the Mossbauer technique. *J Acoust Soc Am* 72:131-141.
- Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, Besnard F (2002) A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol* 61:150-159.
- Shigemoto T, Ohmori H (1991) Muscarinic receptor hyperpolarizes cochlear hair cells of chick by activating Ca(2+)-activated K+ channels. *J Physiol* 442:669-690.
- Siegel JH, Kim DO (1982) Efferent neural control of cochlear mechanics? Olivocochlear bundle stimulation affects cochlear biomechanical nonlinearity. *Hear Res* 6:171-182.
- Silver RA (2003) Estimation of nonuniform quantal parameters with multiple-probability fluctuation analysis: theory, application and limitations. *J Neurosci Methods* 130:127-141.
- Simmons DD (2002) Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. *J Neurobiol* 53:228-250.
- Simmons DD, Morley BJ (1998) Differential expression of the alpha 9 nicotinic acetylcholine receptor subunit in neonatal and adult cochlear hair cells. *Brain Res Mol Brain Res* 56:287-292.
- Simmons DD, Mansdorf NB, Kim JH (1996) Olivocochlear innervation of inner and outer hair cells during postnatal maturation: evidence for a waiting period. *J Comp Neurol* 370:551-562.
- Sippy T, Cruz-Martin A, Jeromin A, Schweizer FE (2003) Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci* 6:1031-1038.
- Spitzer NC (2006) Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444:707-712.
- Stevens CF, Wesseling JF (1999) Augmentation is a potentiation of the exocytotic process. *Neuron* 22:139-146.
- Stocker M (2004) Ca(2+)-activated K+ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 5:758-770.
- Tan MN, Robertson D, Hammond GR (2008) Separate contributions of enhanced and suppressed sensitivity to the auditory attentional filter. *Hear Res* 241:18-25.
- Tang Y, Zucker RS (1997) Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission. *Neuron* 18:483-491.
- Taranda J, Maison SF, Ballestero JA, Katz E, Savino J, Vetter DE, Boulter J, Liberman MC, Fuchs PA, Elgoyhen AB (2009a) A point mutation in the hair cell nicotinic cholinergic receptor prolongs cochlear inhibition and enhances noise protection. *PLoS Biol* 7:e18.
- Taranda J, Ballestero JA, Hiel H, de Souza FS, Wedemeyer C, Gomez-Casati ME, Lipovsek M, Vetter DE, Fuchs PA, Katz E, Elgoyhen AB (2009b) Constitutive expression of the alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit fails to maintain cholinergic responses in inner hair cells after the onset of hearing. *J Assoc Res Otolaryngol* 10:397-406.

- Thompson AM, Thompson GC (1993) Relationship of descending inferior colliculus projections to olivocochlear neurons. *J Comp Neurol* 335:402-412.
- Tritsch NX, Yi E, Gale JE, Glowatzki E, Bergles DE (2007) The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450:50-55.
- Tritsch NX, Rodriguez-Contreras A, Crins TT, Wang HC, Borst JG, Bergles DE (2010) Calcium action potentials in hair cells pattern auditory neuron activity before hearing onset. *Nat Neurosci* 13:1050-1052.
- Tsujimoto T, Jeromin A, Saitoh N, Roder JC, Takahashi T (2002) Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science* 295:2276-2279.
- Vetter DE, Saldana E, Mugnaini E (1993) Input from the inferior colliculus to medial olivocochlear neurons in the rat: a double label study with PHA-L and cholera toxin. *Hear Res* 70:173-186.
- Vetter DE, Liberman MC, Mann J, Barhanin J, Boulter J, Brown MC, Saffiote-Kolman J, Heinemann SF, Elgoyhen AB (1999) Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron* 23:93-103.
- Vetter DE, Katz E, Maison SF, Taranda J, Turcan S, Ballesterro J, Liberman MC, Elgoyhen AB, Boulter J (2007) The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20594-20599.
- Vollrath MA, Kwan KY, Corey DP (2007) The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu Rev Neurosci* 30:339-365.
- Von Bekesy G (1956) Current status of theories of hearing. *Science* 123:779-783.
- Walsh EJ, McGee J, McFadden SL, Liberman MC (1998) Long-term effects of sectioning the olivocochlear bundle in neonatal cats. *J Neurosci* 18:3859-3869.
- Warr WB, Guinan JJ, Jr. (1979) Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. *Brain Res* 173:152-155.
- Warr WB, Boche JE (2003) Diversity of axonal ramifications belonging to single lateral and medial olivocochlear neurons. *Exp Brain Res* 153:499-513.
- Warren EH, 3rd, Liberman MC (1989a) Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I. Contributions of cochlear efferents. *Hear Res* 37:89-104.
- Warren EH, 3rd, Liberman MC (1989b) Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. II. Dependence on stimulus variables. *Hear Res* 37:105-121.
- Wedemeyer C, Ballesterro J, Zorrilla de San Martin J, Elgoyhen AB, Katz E (2010) ACh Release at the Efferent-IHC Synapse Is Modulated by Presynaptic GABA B Receptors In: Thirty-third Annual Midwinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology (Santi PA, ed), p 33. Anaheim, California, USA
- Weisstaub N, Vetter DE, Elgoyhen AB, Katz E (2002) The alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res* 167:122-135.
- Weisz C, Glowatzki E, Fuchs P (2009) The postsynaptic function of type II cochlear afferents. *Nature* 461:1126-1129.
- Wersinger E, McLean WJ, Fuchs PA, Pyott SJ (2010) BK channels mediate cholinergic inhibition of high frequency cochlear hair cells. *PLoS One* 5:e13836.
- Wiederhold ML, Kiang NY (1970) Effects of electric stimulation of the crossed olivocochlear bundle on single auditory-nerve fibers in the cat. *J Acoust Soc Am* 48:950-965.
- Wilson JL, Henson MM, Henson OW, Jr. (1991) Course and distribution of efferent fibers in the cochlea of the mouse. *Hear Res* 55:98-108.
- Winslow RL, Sachs MB (1988) Single-tone intensity discrimination based on auditory-nerve rate responses in backgrounds of quiet, noise, and with stimulation of the crossed olivocochlear bundle. *Hear Res* 35:165-189.
- Winter IM, Robertson D, Yates GK (1990) Diversity of characteristic frequency rate-intensity functions in guinea pig auditory nerve fibres. *Hear Res* 45:191-202.

- Wong AY, Graham BP, Billups B, Forsythe ID (2003) Distinguishing between presynaptic and postsynaptic mechanisms of short-term depression during action potential trains. *J Neurosci* 23:4868-4877.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395:503-507.
- Xu-Friedman MA, Regehr WG (2004) Structural contributions to short-term synaptic plasticity. *Physiol Rev* 84:69-85.
- Xu J, Wu LG (2005) The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. *Neuron* 46:633-645.
- Yoshida N, Shigemoto T, Sugai T, Ohmori H (1994) The role of inositol trisphosphate on ACh-induced outward currents in bullfrog saccular hair cells. *Brain Res* 644:90-100.
- Yu N, Zhu ML, Zhao HB (2006) Prestin is expressed on the whole outer hair cell basolateral surface. *Brain Res* 1095:51-58.
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405:149-155.
- Zorrilla de San Martin J, Pyott S, Ballesteros J, Katz E (2010) Ca²⁺ and Ca²⁺-activated K⁺ channels that support and modulate transmitter release at the olivocochlear efferent-inner hair cell synapse. *J Neurosci* 30:12157-12167.
- Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13-31.
- Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.