



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

Máster en Trastornos de la Comunicación: Neurociencia de la Audición y el Lenguaje

Trabajo de Fin de Máster

Correlato morfológico y molecular en la cóclea del modelo de epilepsia audiógena, el hámster GASH/Sal.

Autor/a

López Pérez, Luis

Director/es

Gómez Nieto, Ricardo

López García, Dolores E.



**CURSO ACADÉMICO
2020/2021**

facultad de **Psicología**
VNiVERSiDAD DE SALAMANCA



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

D. Luis López Pérez, con Documento de Identidad 12342631A, matriculado en el Máster en Trastornos de la Comunicación: Neurociencia de la Audición y el Lenguaje.

Declaro que he redactado el Trabajo Fin de Máster titulado **Correlato morfológico y molecular en la cóclea del modelo de epilepsia audiógena, el hámster GASH/Sal** en el curso académico 2020/2021 de forma autónoma, con la ayuda de las fuentes y la literatura citadas en la bibliografía, y que he identificado como tales todas las partes tomadas de las fuentes y de la literatura indicada, textualmente o conforme a su sentido.

En Salamanca, a 17 de junio de 2021

Fdo: Luis López Pérez

Título: Correlato morfológico y molecular en la cóclea del modelo de epilepsia audiógena, el hámster GASH/Sal.

RESUMEN

El hámster GASH/Sal es un modelo de epilepsia audiógena que sufre hipoacusia neurosensorial. En el presente estudio, se ha cuantificado las principales células auditivas, así como la expresión de los genes implicados en la estructura y funcionalidad de los estereocilios cocleares (*Cdh23*, *Pcdh15* y *Gpr98*) en el primer eslabón de la vía auditiva del GASH/Sal, el órgano de Corti. Para ello, se han extraído y preparado las espiras de la cóclea para su posterior tinción y análisis cuantitativo en imágenes obtenidas con microscopía de epifluorescencia. Los resultados muestran una falta de correlación entre el número de células ciliadas internas y las células ciliadas externas y de Deiters, pero no se han encontrado diferencias numéricas significativas entre las tres filas de células ciliadas externas. El análisis de expresión génica, mediante RT-qPCR, mostró una menor expresión de los genes *Cdh23* y *Pcdh15* en la cóclea del hámster GASH/Sal, mientras que *Gpr98* no mostró diferencias comparado con el hámster control. Las características morfológicas de la cóclea del GASH/Sal difieren de lo descrito en otras especies de roedores que, junto con las alteraciones en la expresión de genes cocleares, podrían explicar la hipoacusia congénita del GASH/Sal, abriendo nuevas líneas de investigación.

Palabras clave: Análisis de expresión génica; Genes cocleares; Hipoacusia; Inmunofluorescencia; Modelo de epilepsia audiógena; Órgano de Corti; Sordera congénita

Title: Morphological and molecular correlates in the cochlea of the audiogenic seizure-prone hamster GASH/Sal.

ABSTRACT

The GASH/Sal hamster is an auditory epilepsy model suffering from sensorineural hearing loss. In the present study, the main auditory cells and the expression of genes involved in the structure and functionality of the cochlear stereocilia (*Cdh23*, *Pcdh15* and *Gpr98*) in the first link of the auditory pathway of the GASH/Sal, the organ of Corti, have been quantified. For this purpose, cochlear coils have been extracted and prepared for subsequent staining and quantitative analysis in images obtained with epifluorescence microscopy. The results show a lack of correlation between the number of inner hair cells and outer hair cells and Deiters cells, but no significant numerical differences were found between the three rows of outer hair cells. Gene expression analysis by RT-qPCR showed lower expression of *Cdh23* and *Pcdh15* genes in the cochlea of the GASH/Sal hamster, while *Gpr98* showed no differences compared to the control hamster. The morphological characteristics of the GASH/Sal cochlea differ from those described in other rodent species which, along with alterations in cochlear gene expression, could explain congenital hearing loss in GASH/Sal, opening new research lines.

Keywords: Audiogenic seizure model; Cochlear genes; Congenital deafness; Gene expression analysis; Hearing loss; Immunofluorescence; Organ of Corti

ABREVIATURAS

- Actb: β -actina
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ADN complementario
- ARN: ácido ribonucleico
- Ca^{2+} : ión calcio
- CDH23: cadherina 23
- *Cdh23*: gen codificante de la cadherina 23
- Ct: ciclo umbral del inglés *cycle threshold*
- DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
- dB: decibelios
- DC: células de Deiters
- DFNB12: sordera autosómica recesiva no sindrómica
- EDTA: ácido etilendiaminatetraacético
- GASH/Sal: hamster Genetic Audiogenic Seizure, Salamanca
- GPCR: receptor de proteína G
- GPG/Vall: línea de hámster genéticamente propenso a la epilepsia, de Valladolid
- GPR98: receptor acoplado a proteína G 98
- *Gpr98*: gen de la proteína GPR98
- HC: células Hensen
- IHC: células ciliadas internas, del inglés *inner hair cells*
- K^{+} : ión potasio
- *Mass 1*: gen de la proteína MASS1
- MASS1: proteína Susceptible de Convulsiones Audiógenas Monogénicas, del inglés *Monogenic Audiogenic Seizure-Susceptible*
- MYO7A: miosina VIIa
- OHC: células ciliadas externas, del inglés *outer hair cells*
- PARV: parvalbúmina
- PB: tampón fosfato, del inglés *phosphate buffered*
- PC: células pilares
- *Pcdh15*: gen codificante de la protocadherina 15
- PCDH15: protocadherina 15

- PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*
- PFA: paraformaldehído
- RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real, del inglés *reverse transcription quantitative real time polymerase chain reaction*
- S.E.A.: Servicio de Experimentación Animal
- SEM: error estándar de la media
- SGN: neuronas del ganglio espiral, del inglés *spiral ganglion neurons*
- SYP: sinaptofisina
- TBS: tris *buffer* salino
- *Tmc2*: gen codificante de la proteína transmembrana 2
- TMC2: proteína transmembrana 2
- TRITC: tetrametilrodamina
- tunC: túnel de Corti
- USH1G: proteína Usher tipo 1G
- *Vlgr1*: gen de la proteína VLGR1
- VLGR1: receptor acoplado a proteína G V1
- μL : microlitro
- μm : micrómetros

ÍNDICE

Declaración de autoría

Abreviaturas

Resumen y abstract

1. Introducción	1
1.1. GASH/Sal	1
1.2. Estructura del oído interno: anatomía de la cóclea	2
1.3. Proteínas implicadas en la mecanotransducción auditiva	6
1.3.1. CDH23	6
1.3.2. PCDH15	7
1.3.3. GPR98 o VLGR1.....	7
1.4. Justificación	8
2. Hipótesis	9
3. Objetivos	9
4. Materiales y métodos	10
4.1. Diseño experimental	10
4.2. Animales de experimentación	11
4.3. Obtención y preparación de las cócleas	11
4.4. Inmunohistoquímica	12
4.5. Microscopia y análisis de imagen	14
4.6. PCR cuantitativa (RT-qPCR)	14
4.7. Análisis de datos	16
4.8. Búsqueda bibliográfica	16
5. Resultados	17
5.1. Alteraciones morfológicas en el órgano de Corti del GASH/Sal ...	17
5.2. Alteraciones moleculares en el órgano de Corti del GASH/Sal	24
6. Discusión	25
7. Limitaciones del estudio y líneas de actuación futuras	30
8. Conclusiones	31
9. Bibliografía	32
10. Anexo	39

1. Introducción

1.1. GASH/Sal

El modelo de epilepsia audiógena GASH/Sal (Genetic audiogenic seizure hamster, Salamanca) es el nombre que recibe la línea de hámster desarrollada en la Universidad de Salamanca a partir de la línea originaria GPG/Vall procedente de la Universidad de Valladolid (Muñoz et al., 2017). La característica principal de esta línea es la susceptibilidad a padecer epilepsias audiógenas, similares a las crisis tónico-clónicas en humanos, peculiaridad desarrollada de manera espontánea sin haber sufrido modificación genética en el laboratorio (Barrera Bailón, 2013).

Por otro lado, junto con la epilepsia audiógena, estos animales presentan una profunda pérdida auditiva, con un umbral de 80 decibelios (dB), pese a tener una transmisión nerviosa adecuada de los estímulos auditivos. Asimismo, presentan una mayor latencia y amplitud de los potenciales auditivos evocados troncoencefálicos en el núcleo coclear y en el colículo inferior a altas intensidades, lo que se traduce en una mayor excitabilidad con la llegada de estímulos sonoros (Muñoz et al., 2017).

Atendiendo a las secciones histológicas del cerebro, se ha podido visualizar cómo estos animales, por causas ajenas al envejecimiento, presentan degeneración neuronal en los núcleos auditivos (Díaz-Rodríguez et al., 2020).

A nivel del oído interno, el GASH/Sal presenta una alteración de la estructura del órgano de Corti, incluyendo la pérdida de estereocilios en las células ciliadas y cambios en la morfología y longitud de las células de soporte cocleares, exhibiendo una disposición desordenada en los estereocilios de ambos tipos de células ciliadas a lo largo de toda la cóclea, sobre todo en las células ciliadas externas, presentando una pérdida de enlaces que lleva a la desaparición de su disposición característica (Sánchez-Benito et al., 2020).

1.2. Estructura del oído interno

El oído interno es el encargado de la mecanotransducción de estímulos sonoros, es decir, la conversión de un estímulo mecánico sonoro en una respuesta eléctrica que es procesada por el sistema nervioso central gracias a la cóclea y la inervación que llega (Mathur y Yang, 2015; Vollrath et al., 2007).

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

La última pared, denominada habitualmente **suelo** al encontrarse en la parte inferior, contiene el **órgano de Corti**, un epitelio sensorial y principal estructura sensorial de la recepción de estímulos sonoros (Mathur y Yang, 2015). En él se encuentran las células ciliadas mecanosensoras, cuyas redes de proteínas son esenciales para la correcta diferenciación celular, así como para la transducción mecanoeléctrica (Wolfrum et al., 2018). Podemos destacar dos tipos de células ciliadas: las células ciliadas internas (IHC, del inglés, *inner hair cells*), cuya función es sensorial y son las encargadas de transducir los estímulos sonoros para transformarlos en estímulos nerviosos gracias a la apertura de los canales iónicos de K^+ y Ca^{2+} por la tensión creada en los *tip links*, con la consecuente liberación de neurotransmisores; por otra parte están las células ciliadas externas (OHC, del inglés, *outer hair cells*), cuya función es mecánica, sirven de modulador del sonido, al recibir y amplificar las ondas sonoras (Bonnet y El-Amraoui, 2012; Gillespie y Müller, 2009; Hackney y Furness, 2013; Mathur y

Yang, 2015). Poseen unas microvellosidades modificadas, denominadas estereocilios, formados por filamentos de actina y unidos entre sí mediante diferentes proteínas de unión que permiten el control mecánico de canales de transducción (Zhao y Müller, 2015) (ver en Figuras 1).

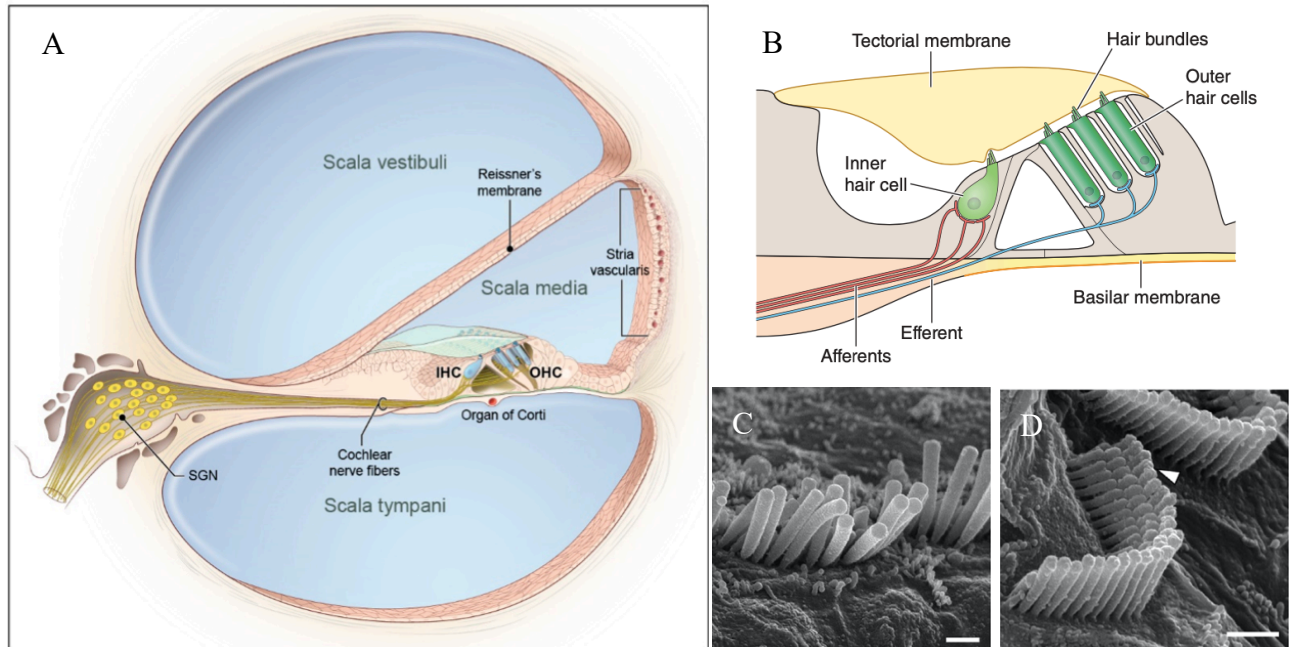


Figura 1. Anatomía del órgano de Corti. **A.** Corte transversal de la cóclea representando las escalas vestibular, media y timpánica con sus límites anatómicos. Extraído de Tona et al., (2020). **B.** Representación esquemática del órgano de Corti en donde se aprecian las células ciliadas internas en una única fila y las externas en tres filas. Ambas en su parte superior poseen un conjunto estereociliar encargado de la mecanotransducción. Extraído de Fettiplace y Kim, (2014). **C y D.** Imagen de microscopía electrónica de barrido de las células ciliadas internas (C) y externas (D) del hámster control. Apréciase en las células ciliadas externas el haz ordenado en forma de “uve” característico. Escala = 1 μ m. Extraído de Sánchez-Benito et al., (2020).

La distribución precisa de las uniones varía entre las diferentes células ciliadas, existiendo diferentes tipos de enlaces entre los que destacan los enlaces en el ápice del estereocilio o *tip links*. Los *tip links* conectan cada una de las puntas de los estereocilios con el estereocilio contiguo situado detrás de él a lo largo del eje del haz estereociliar (Hackney y Furness, 2013). Se cree que los *tip links* están formados por homodímeros de protocadherina-15 (PCDH15) que interaccionan con homodímeros de cadherina-23 (CDH23) (Choudhary et al.,

2020). Asimismo, existen otros conectores como son los localizados en la base (*ankle links*), aunque se ha visto que no se encuentran en todos los cilios de las células ciliadas maduras (Hackney y Furness, 2013). En estas uniones destaca fundamentalmente la presencia de la proteína GPR98 (de las siglas en inglés *G protein – coupled receptor 98* y también denominada VLGR1) formando un complejo de filamentos en la zona más cercana a la base del estereocilio. De este modo, se ha observado cómo las mutaciones de dicha proteína conllevan alteraciones de la organización estereociliar (McGee et al., 2006) (ver en Figura 2).

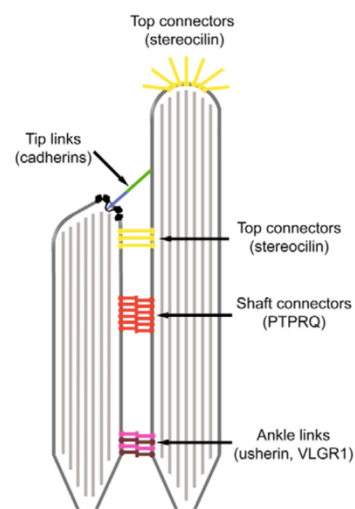


Figura 2. Tipos de enlaces estereociliares de las células ciliadas. En el esquema se puede apreciar las diferentes proteínas responsables de los diferentes estereocilios maduros. Extraído de Hackney y Furness, (2013).

Adicionalmente a estas células, se pueden distinguir otras que sirven de soporte para las OHC y las IHC, como las células de Deiters y las células pilares, las cuales proporcionan un andamiaje y soporte estructural a las células ciliadas, proporcionando un acoplamiento mecánico celular. Las células de Deiters y las células pilares se caracterizan por presentar haces organizados de microtúbulos (especialmente prominentes en las células pilares) que proporcionan un soporte rígido a las células ciliadas (Taylor et al., 2012; Wan et al., 2008). Igualmente, la superficie así como la prolongación interna de la célula de Deiters muestra gran cantidad de microvillis formados por actina y tropomiosina (Laffon y Angelini, 1996).

Las células de Deiters se describen como un cuerpo celular alargado y con un citoesqueleto en forma de cuerda, que se dispone desde la membrana basilar hasta la lámina reticular y sostiene las células ciliadas externas. Cada cuerpo celular de las células de Deiters encierra el extremo basal de la OHC y su innervación. Las células pilares, situadas entre las células de Deiters, OHC e IHC, forman el túnel de Corti, un arco creado a partir de las células pilares externas e internas y que también delimitan el espacio de Nuel entre estas células y las OHC. Finalmente, internamente a las IHC se ubican las células limitantes internas y, de manera externa a las células de Deiters y OHC, las células de Hensen o limitantes externas (Parsa et al., 2012; Taylor et al., 2012)(ver en Figura 3).

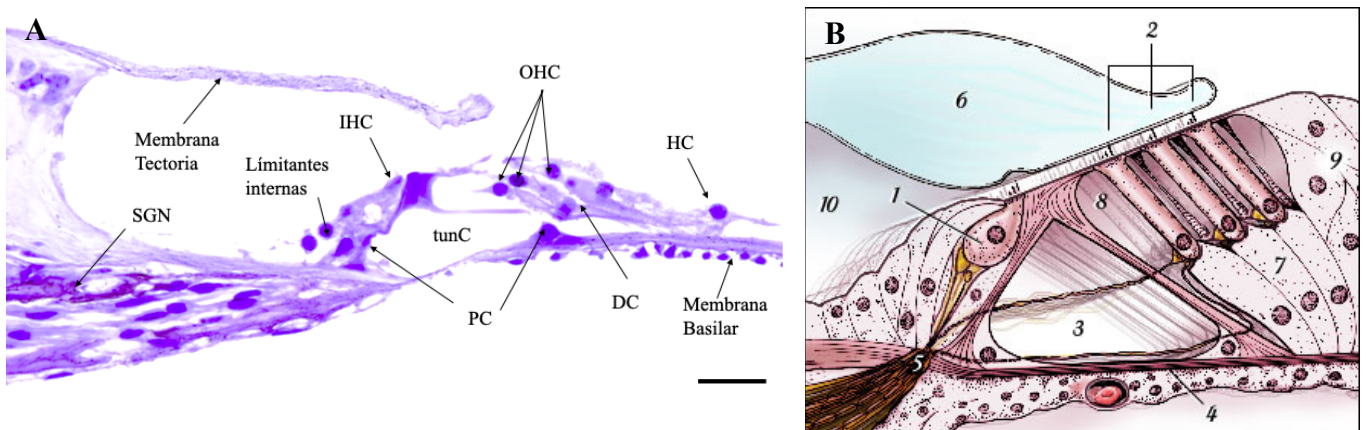


Figura 3. Componentes celulares del órgano de Corti. **A.** Imagen de microscopía óptica realizada que muestra una sección transversal del órgano de Corti del GASH/Sal teñido con Nissl. Obsérvese la disposición de las OHC e IHC y, entre éstas, las células pilares (PC) delimitando el túnel de Corti (tunC). Apréciase la distribución de las células de soporte, donde las células de Deiters (DC) se encuentran debajo de las OHC, y las células Hensen (HC) externas a éstas (Imagen extraída de la histoteca del Laboratorio 12 del INCYL). Barra de escala = 20 μ m. **B.** Esquema de corte transversal del órgano de Corti donde se pueden ver las IHC (1), las OHC (2), el tunC (3), la membrana basilar (4), la habénula perforata (5), membrana tectoria (6), DC (7), espacios de Nuel (8), HC (9) y surco espiral interno (10). (Extraído de Pujol et al., s. f.)

1.3. Proteínas implicadas en la mecanotransducción auditiva

1.3.1. CDH23

La CDH23 es un miembro de la superfamilia de cadherinas, codificada por el gen *Cdh23*. Esta superfamilia está formada por 113 cadherinas en el ser humano, en donde solo 11 son responsables de patologías (Mizutari et al., 2015). CDH23 se expresa en el conducto utriculosacular, el conducto reuniens, la membrana de Reissner, y particularmente en las células ciliadas sensoriales internas y externas, siendo un importante componente del *tip link* de los estereocilios del órgano de Corti (Ramzan et al., 2020). Desempeña un papel esencial en la cohesión de los estereocilios durante su morfogénesis, desde la base al ápex, lo que deteriora la mecanotransducción (Kazmierczak et al., 2007; Liu et al., 2012; Noben-Trauth et al., 2003; Ramzan et al., 2020) (ver en Tabla 1).

1.3.2. PCDH15

La proteína PCDH15 es un componente central del complejo de mecanotransducción en las células ciliadas auditivas que está codificada por el gen *Pcdh15* (Maeda et al., 2014). Al igual que CDH23, PCDH15 constituye una proteína de la familia de las cadherinas y, junto a la primera, es un componente esencial de los enlaces superiores de las células ciliadas internas y externas (Choudhary et al., 2020; Senften et al., 2006). Los estereocilios están unidos entre sí gracias a un complejo de proteínas en el que PCDH15 y CDH23 son fundamentales. De este modo, constituyen una parte esencial de la mecanotransducción de las IHC (Choudhary et al., 2020; Kazmierczak et al., 2007) formando los *tip links* a través de una interacción dependiente del Ca^{2+} , siendo esta unión fundamental para la mecanotransducción en las células ciliadas (Araya-Secchi et al., 2016; Oroz et al., 2019) (ver en Tabla 1).

1.3.3. GPR98 o VLGR1

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen la mayor superfamilia de proteínas, conformadas por siete proteínas helicoidales transmembrana. Detectan los estímulos extracelulares, experimentando un cambio conformacional que, a su vez, se acopla a los efectores posteriores y, en última instancia, regulan las respuestas celulares (Randy McMillan et al., 2002; Sun et al., 2013). Entre todos los GPCR relacionados con las funciones auditivas, el receptor acoplado a proteína G GPR98 es un receptor a destacar, ya que se trata de la proteína más grande de las superfamilias de GPCR (Sun et al., 2013; Yagi et al., 2007) (ver en Tabla 1).

Históricamente, GPR98 también se denominó como MASS1 (proteína susceptible de convulsiones audiógenas monogénicas, del inglés *monogenic audiogenic seizure-susceptible*) debido a la mutación silenciosa hallada en ratones Frings en el año 1953, los cuales padecían epilepsia audiógena (Klein et al., 2005). Actualmente, se conoce como VLGR1, MASS1 o GPR98 y se encuentra codificada por el gen denominado *Gpr98*, *Adgrv1* o *Vlgr1* (Orphanet, s. f.).

En el sistema nervioso periférico, se localiza en la unión extracelular entre diferentes estereocilios del órgano de Corti formando parte de los enlace denominados *ankle links* (Klein et al., 2005; Shin et al., 2013). Los modelos de ratones *knockout* y con mutaciones muestran que la pérdida de la función de GPR98 conduce a un desarrollo estereociliar anormal en el órgano de Corti y a la pérdida de audición, lo que indica que desempeña un papel crucial en la transducción de la audición o en el desarrollo del sistema auditivo (Klein et al., 2005; Sun et al., 2013).

Proteína	Abreviatura	Gen	Codificación del gen	Función de la proteína
Cadherina 23	CDH23	<i>Cdh23</i>	Glicoproteína de adhesión intercelular dependiente del calcio	Organización y formación de haces estereociliares en los <i>tip links</i>
Protocadherina 15	PCDH15	<i>Pcdh15</i>	Glicoproteína de adhesión intercelular dependiente del calcio	Desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la función normal de los estereocilios y en los <i>tip links</i>
Receptor acoplado a proteína G 98	GPR98 o VLGR1	<i>Gpr98</i>	Proteína transmembrana de unión al calcio	Formación de ankle links que conectan los estereocilios en crecimiento de las células ciliadas cocleares en desarrollo

Tabla 1. Principales proteínas implicadas en la mecanotransducción y los genes que las codifican. (Información obtenida de la base de datos: GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search, s. f.)

1.4. Justificación

La hipoacusia constituye un problema actual de gran importancia por sus implicaciones en la comunicación. Son muchos los estudios que abordan este problema desde múltiples disciplinas, tratando de conocer su etiología y tratamientos. Aunque se conoce mucho acerca de los mecanismos del oído interno, aún son muchas las incógnitas que subyacen a determinados cuadros de sordera, sobre todo congénitas, al tratarse de una zona anatómicamente difícil de acceder (Taiber y Avraham, 2019).

Con el presente estudio, se pretende investigar los correlatos morfológicos y moleculares que subyacen a la hipoacusia en el modelo del GASH/Sal, caracterizado también por la presencia de epilepsia audiógena de manera congénita. De este modo, se pretende arrojar nuevas líneas de investigación que permitan comprender la pérdida de audición a través de este modelo animal.

2. Hipótesis

La pérdida auditiva neurosensorial es una condición multidimensional con grandes implicaciones médicas, científicas, sociales y culturales (Smith et al., 2005). Una gran parte de ellas es debido a mutaciones en proteínas que derivan en una desorganización de la citoarquitectura estereociliar del oído interno o en una alteración de los núcleos auditivos. Se ha observado cómo los hámsteres GASH/Sal presentan hipoacusia acentuada, quizá por alteraciones en la morfología normal del sistema auditivo (Sánchez-Benito et al., 2020). Además, la presencia de epilepsias audiógenas hace pensar que, si ambas patologías conviven, existan anomalías en el origen de la vía auditiva nerviosa, la cóclea. Por tanto, resulta de interés saber cómo se encuentran expresadas algunas de dichas proteínas en la cóclea del hámster GASH/Sal y así poder determinar cómo afectan al funcionamiento de la audición ya que, si estas se encuentran infra o sobre-expresadas, entonces se deben materializar en cambios a nivel morfológico, de número y organización de la anatomía coclear, lo que puede constituir una diana de investigación terapéutica en el abordaje de las hipoacusias y sorderas congénitas.

3. Objetivos

- Objetivo 1: Obtener y preparar las espiras de la cóclea del hámster GASH/Sal para su análisis en superficie.
- Objetivo 2: Realizar un estudio cuantitativo de las células ciliadas internas, externas y de Deiters en órgano de Corti del hámster GASH/Sal.
- Objetivo 3: Estudiar la expresión de los genes *Cdh23*, *Pcdh15* y *Gpr98*, en la cóclea del GASH/Sal en relación con los hámsteres sirios controles.
- Objetivo 4: Estudiar posibles correlatos de los hallazgos microscópicos y moleculares con la pérdida auditiva en hámsteres GASH/Sal.

4. Materiales y métodos

4.1. Diseño experimental

El diseño experimental llevado a cabo en este estudio (Figura 4) consistió en el sacrificio de hámsteres GASH/Sal y control, de entre 10 y 11 meses de vida para la obtención de las cócleas. A continuación, fueron divididos para el análisis macrométrico mediante microscopía óptica, la preparación de espiras en superficie con las tinciones deseadas y la preparación de las muestras para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR. Para esto último, se extrajo el ARN y se cuantificó; posteriormente, se llevó a cabo la reverso-transcripción y cuantificación del cDNA y, para finalizar, se realizaron las PCRs cuantitativas en tiempo real (RT-qPCR) y su posterior análisis.

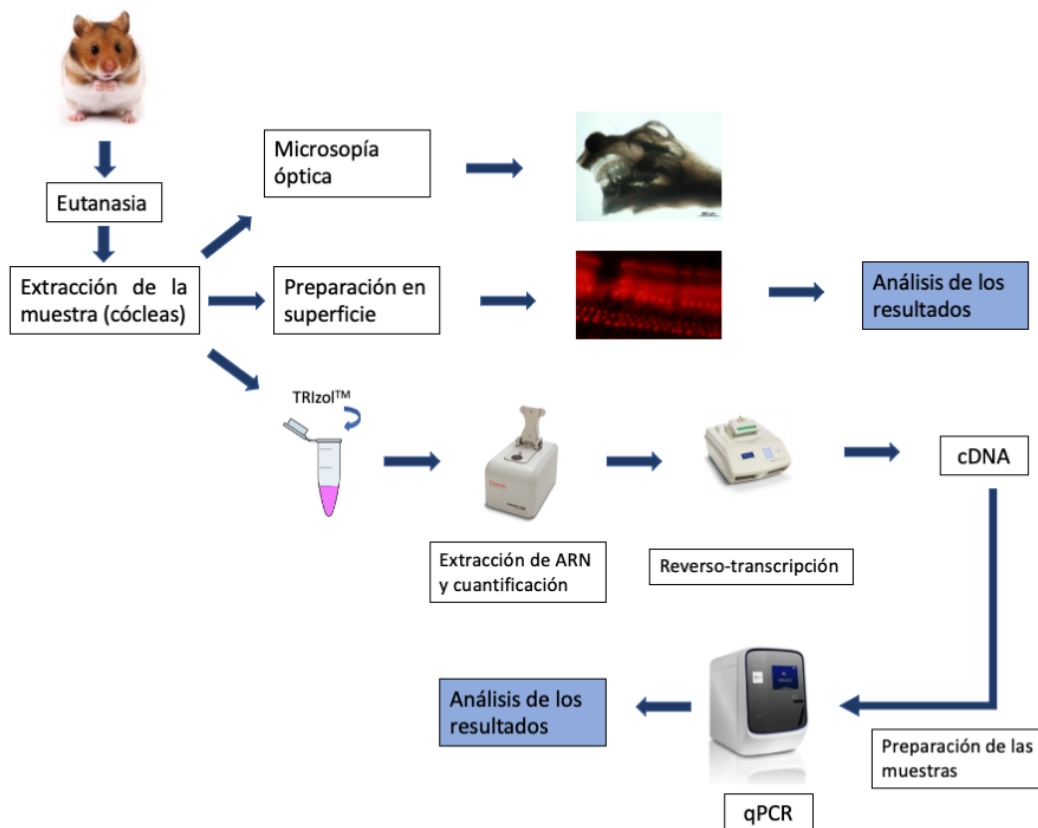


Figura 4. Esquema del diseño experimental del estudio

4.2. Animales de experimentación

En este estudio, se emplearon 6 hámsteres GASH/sal de entre 10 y 11 meses de vida para el estudio morfométrico. Para el estudio molecular, se usaron 6 hámsteres GASH/Sal y 6 hámsteres sirios controles de aproximadamente, todos obtenidos en el Servicio de Experimentación Animal (S.E.A.) de la Universidad de Salamanca. Los animales fueron alojados en el animalario acondicionado en cajas de policarbonato en habitaciones con las condiciones óptimas la temperatura, humedad y luz según su ritmo circadiano.

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Salamanca y la Junta de Castilla y León y se llevaron a cabo de conformidad con las directivas del Consejo de la Comunidad Europea (2010/63 / UE), la ley española (RD 53/2013 BOE 34 / 11370-420, 2013) para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Añadido a esto, se siguió el principio de las tres “R” (reducción, reemplazo, refinamiento) como eje principal de la protección animal durante todo el proceso y siempre que fue posible.

4.3. Obtención y preparación de las cócleas

Para la obtención de la muestra, se procedió siguiendo el protocolo y directrices estipuladas para el uso y cuidado de los animales de laboratorio conforme la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (2010/63/UE), la legislación española vigente (RD 1201/05), y con las establecidas por el Comité de Bioética Institucional (número de aprobación 375). Todo ello garantizando el mínimo número de animales, así como evitar su sufrimiento.

Los animales fueron anestesiados por vía inhalatoria con isoflurano. Tras comprobar su arreflexia, fueron eutanasiados con guillotina. A continuación, se procedió a extracción y disección de las cócleas. Una parte de ellas fueron almacenadas a -80 °C hasta el procedimiento de extracción de ARN.

Tras ello, se realizó la preparación y fijación del tejido. Se procedió a la fijación de las destinadas a estudios histológicos. Para ello, bajo disección microscópica,

se retiró la bulla para poder perforar el ápex con una aguja histológica y perfundir paraformaldehído (PFA) al 4 % en tampón fosfato (PB) 0.1 M, pH = 7.4 por la ventana oval y que éste circulase por la cóclea.

Después, se procedió a decalcificar la muestra en ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 8% en tampón fosfato 0.1 M, pH = 7.4 durante 10 días a temperatura ambiente en agitación.

Para la obtención de las espiras, primeramente, se realizó un corte axial paramodiolar, teniendo como referencia la ventana oval, para después dividir la cóclea en espiras, eliminando la pared vascular y las membranas tectoria y de Reissner. Todo ello realizado en tris *buffer* salino (TBS) 0.05 M que garantice la preservación de la muestra. Tras la obtención de estas muestras, se realizan los procesos de tinción acorde al protocolo descrito en los apartados siguientes.

4.4. Inmunohistoquímica

Para el protocolo de inmunotinción se utilizaron los siguientes reactivos y anticuerpos según el objetivo de tinción (ver en Tabla 2):

Antígeno	AC primario	Dilución	Referencia	AC secundario	Dilución	Referencia	Objetivo
GPR98	Rabbit anti-Mass1	1/50	NBP2-57048	DyLight Horse Anti-Rabbit IgG (488 nm)	20 µg/mL	DK-8818	Visualizar GPR 98 mediante epifluorescencia
CDH23	Rabbit anti-Cadherin like 23	1/400	Ab131135	Cy TM 2 Donkey Anti-Rabbit IgG	1/50	IR-711-225-152	Visualizar Cadherina 23 mediante epifluorescencia
SYP	Mouse anti-Synaptophysin	1/200	SA-SVP38	DyLight Horse Anti-mouse IgG (594 nm)	20 µg/mL	DK-8818	Visualizar terminales nerviosos mediante epifluorescencia
PARV	Rabbit anti-Parvalbumin	1/1000	SW-PV28	DyLight Horse Anti-Rabbit IgG (488) nm	20 µg/mL	DK-8818	Visualizar la proteínas ligadores de calcio mediante epifluorescencia

Tabla 2. Reactivos utilizados en las inmunotinciones. Abreviaturas: AC: anticuerpo; Ig: inmunoglobulina; PARV (parvalbúmina); Ab: © Abcam, Cambridge, UK; NB: © Novus Biologicals, Centennial, CO, USA; Sc: © Santa Cruz biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA; BA: ©Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; IR: © Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. PA; USA;

DK: © DyLight Kit (Vector Laboratories, CA, USA); SW: © Swant Inc. Switzerland ; SA: © Sigma-Aldrich, MO, USA

Para la preparación, una vez diseccionadas las espiras y divididas en secciones (basal, medial y apical) se colocaron en una placa microtituladora y con una rejilla de microscopia electrónica para trasladar las secciones sin dañarlas. Para quitar o cambiar los líquidos, usamos una micropipeta de 200 µL con precaución de no absorber las espiras.

Se realiza un lavado en TBS 0.05 M pH 7.6 seguido de un bloqueo de marcaje con *Normal Horse Serum* durante una hora para evitar la inmunotinción inespecífica. A continuación, se incubó en un cóctel de anticuerpos primarios anti-sinaptofisina, MASS1, parvalbúmina o CDH23 (según el objetivo) durante 72 horas a 4 °C en agitación.

Tras este tiempo, se lavó con TBS 0.05 M pH 7.6 tres veces durante 15 minutos en agitación, para después incubar en un cóctel con los anticuerpos secundarios. Después, se lavó de nuevo tres veces durante 15 minutos para, finalmente, cubrir y montar con la solución de vector.

Es muy importante el mantenimiento de la muestra lejos de fuentes de luz durante la incubación de los anticuerpos secundarios y consecuentes lavados para que la muestra no pierda la capacidad de fluorescencia

Para las muestras preparadas con contrateñido con DAPI y faloidina, se realizó una mezcla en proporción 1:1 de:

VECTASHIELD® HardSet™ Antifade Mounting Medium with Phalloidin H-1600-10 (TRITC-Phalloidin) y VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium with DAPI: H-1200-10, ambos de Vector Laboratories, Inc. CA, USA.

Con estas tinciones se logrará teñir el citoesqueleto de las células gracias a la afinidad de la faloidina (TRITC-Phalloidin) por los filamentos de actina y los núcleos celulares con DAPI gracias a su afinidad por la timina y adenina del ADN.

4.5. Microscopía y análisis de la imagen

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

Los objetivos utilizados para la obtención de imagen fueron 2.5x 10x, 20x y 40x acompañados de la correspondiente escala y según el objetivo determinado para la imagen.

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

4.6. PCR cuantitativa (RT – qPCR)

Se utilizaron 6 hámsteres control y 6 hámsteres GASH/Sal, de manera que cada cóclea recogida según el apartado anterior se transfirió al reactivo TRIzol™ (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). El ARN celular total del tejido congelado, se extrajo de las muestras individuales de tejido utilizando el reactivo TRIzol™ de acuerdo con el procedimiento del fabricante. La cantidad total se midió por espectrometría a 260nm utilizando el espectrofotómetro NanoPhotometer® (Implen GmbH), y la calidad del ARN se evaluó teniendo en cuenta las relaciones de absorción 260/280 y 260/230 nm.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 800 ng de ARN total utilizando el kit del sistema de transcripción inversa ImProm-IITM (Promega Corporation, Madison, SWI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El análisis de RT-qPCR se llevó a cabo utilizando el sistema QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems by Life Technology, Europa) con la Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies, Europa). La mezcla de PCR de 20 ml contenía 80 ng de molde de ADNc, 400 nMol de cada cebador y 10 ml de Power SYBR Green PCR Master Mix. Los cebadores (*primers*) específicos para los genes examinados en el presente estudio (ver Tabla 3), se diseñaron por medio del software Primer3 v.0.4.0. de forma que los productos de la RT-qPCR abarcaran dos intrones identificados. La amplificación de la PCR fue la siguiente: 10 minutos a 95 °C antes de 40 ciclos térmicos, cada uno de ellos consistente en desnaturalización a 95 °C durante 15 s y recocado/extensión a 60 °C durante 30 s, seguido de la curva de fusión. Los datos de salida se analizaron con el software QuantStudio 7™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) y se normalizaron por la expresión de un gen endógeno, beta-actina (β -actina). El valor de la expresión génica relativa de cada transcrito se calculó siguiendo fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ("condición 1"- ΔCt "condición 2"), donde "condición 1" corresponde a la muestra experimental, "condición 2" corresponde a la muestra del animal de control, y ΔCt de cada "condición" es Ct "gen experimental" - Ct "gen endógeno" (Damasceno et al., 2020). Por último, se utilizó una reacción de control negativa sin muestra (agua) en todas las RT-qPCR y el grupo de control se utilizó como muestra de calibración.

Gene symbol	Ensembl number	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Product size (bp)
<i>Cdh23</i>	ENSMAUG00000016882	ATCCAAGTTGGAGATGTGAATGAC	GTTGACGATGAAGATGGGTGTC	108
<i>Pcdh15</i>	ENSMAUG00000022156	AGTTCTGGATAGAGACCCACCA	ATAACTGTGCCACCTTCTTGT	84
<i>Gpr98</i>	ENSCGRG00000009203	CAGCGCGTTCTGGATGTTG	TATCAATTCTGGCACC GCCT	110
<i>Actb</i>*	ENSMAUG00000008763	AGCCATGTACGTAGCCATCC	ACCCTCATAGATGGGCACAG	115

Tabla 3. Cebadores utilizados para la RT-qPCR

4.7. Análisis de datos

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

Los análisis estadísticos de las muestras obtenidas para el análisis morfológico fueron realizados con el software SPSS-IBM v26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se realizaron una prueba ANOVA para la determinación de diferencias significativas en las medias de los diferentes grupos con la prueba post hoc de Bonferroni. Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq .05^*$ y $p \leq .001^{***}$.

Para el análisis de las RT – qPCR se usó el software GraphPad Prism 9.0.0, en donde se recogieron y analizaron las muestras para ser comparadas mediante una *T de Student* para muestras independientes. Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq .05^*$, $p < .01^{**}$ y $p \leq .001^{***}$.

4.8. Búsqueda bibliográfica

Además de los materiales y métodos anteriormente indicados, se utilizaron recursos informáticos para el acceso a la literatura científica y los estudios relacionados con los datos hallados. Se utilizó el motor de búsqueda PubMed que permite el acceso a los documentos de la base de datos MEDLINE gestionada por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, y el gestor bibliográfico Mendeley. Las palabras claves utilizadas fueron “CDH23”, “Cochlea”, “Deafness”, “GASH/Sal”, “Gene expression”, “GPR98”, “MASS1”, “Morphology” “Organ of Corti”, “PCDH15”, y “VLGR1”. Se eligieron los recursos bibliográficos de mayor calidad y evidencia científica que confirmen o refuten los resultados obtenidos.

5. RESULTADOS

Los resultados del presente se muestran a continuación, divididos según en función de las alteraciones morfológicas o moleculares del órgano de Corti.

5.1. Alteraciones morfológicas en el órgano de Corti del GASH/Sal

Para la determinación de las alteraciones existentes, se extrajo una cóclea íntegra para su observación anatómico – topográfica y morfológica. Se analizó el tamaño coclear de las muestras y las dimensiones de las diferentes espiras como se puede ver en la Figura 4, obteniendo un diámetro en la espira basal de 2213 μm , en la espira media de 1365 μm y en la espira apical 605 μm . Asimismo, se determinó la longitud del eje, tomando el modiolo de referencia, en 1728 μm y un diámetro máximo de 1423 μm .

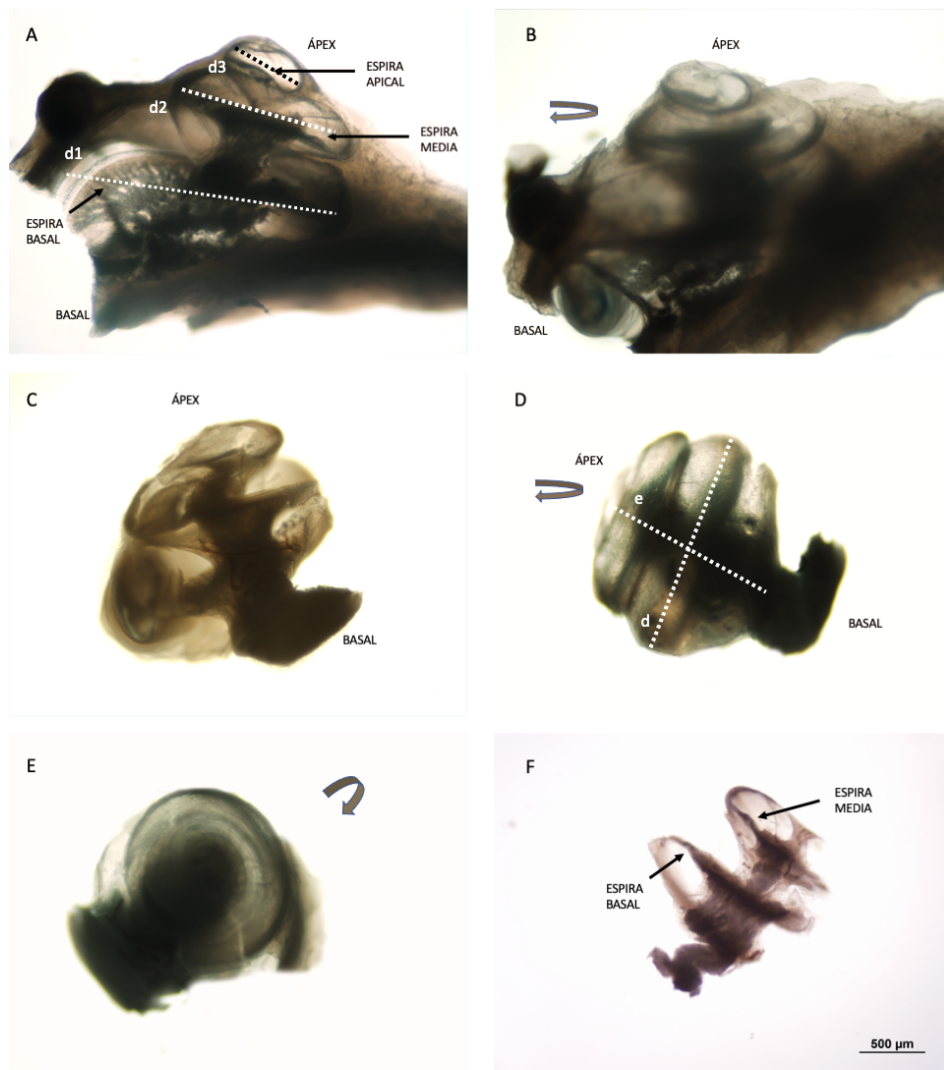


Figura 5. Estructura de la cóclea del GASH/Sal desde diferentes ángulos de visión. **A.** Imagen de microscopía óptica de las diferentes espiras obtenida tras un corte paramodiolar (d1 = espira basal; d2 = espira media; d3 = espira apical). **B.** Visión obtenida tras rotación de la muestra anterior 180° sobre su eje. **C.** Vista interna de la cóclea sin estructuras óseas. **D.** Rotación de la muestra anterior 180° sobre su eje (e = eje modiolar; d = diámetro coclear máximo). **E.** Visión dorsal desde el ápex. **F.** Espiras basal y media con la estría vascular delimitando la pared lateral.

En la Figura 6 se aprecian las espiras obtenidas (según lo descrito en el apartado “obtención y preparación de cócleas”) para su posterior tinción. Se puede observar la espira basal con la región más externa donde se ubican las OHC e IHC y una parte interna limítrofe al modiolo correspondiente a las neuronas del ganglio espiral que inervan la cóclea.

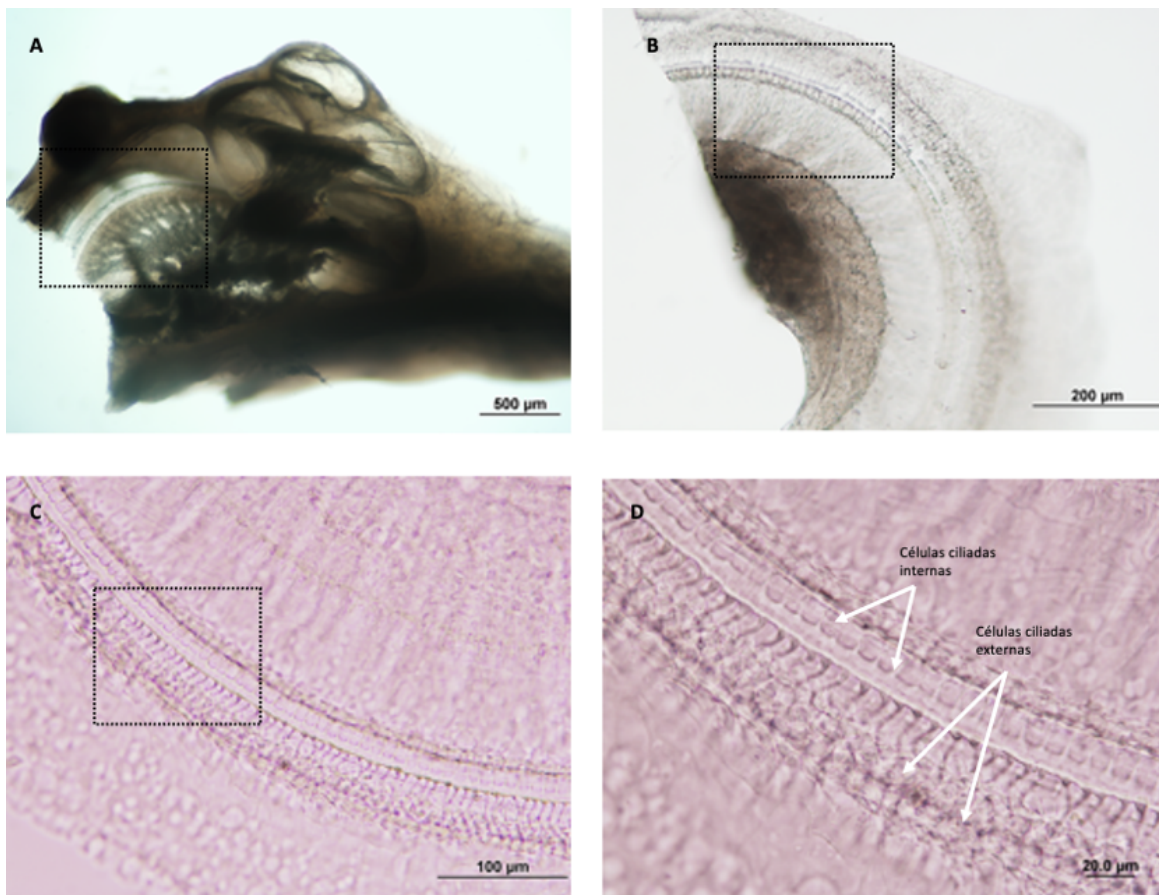


Figura 6. Disección de las cócleas del GASH/Sal. **A.** Fotografía en campo claro de la cóclea y espiras tras un corte paramodiolar. **B.** Microfotografía de la espira basal correspondiente al recuadro en la imagen A. **C y D.** Microfotografías a mayor aumento mostrando el detalle del recuadro correspondiente a las imágenes B y C, respectivamente. Obsérvese la disposición de las IHC y las OHC

Siguiendo los pasos descritos en el apartado correspondiente a la tinción de muestras, éstas fueron analizadas cualitativa y cuantitativamente. Cualitativamente, se observó en las muestras teñidas con DAPI cómo la organización de las OHC era irregular y difería entre las diferentes muestras teñidas en cuanto a la disposición de los núcleos celulares. En la Figura 7A se pueden apreciar separaciones entre las células, ausencias de determinadas OHC y desorganización en la distribución de las diferentes hileras, lo que puede suponer una anomalía. Con respecto las células de Deiters, teñidas con faloidina gracias a sus filamentos de actina (Figura 7B), destaca principalmente la ausencia de alguna de dichas células. Cuantitativamente, se seleccionaron las muestras y contabilizaron manualmente las IHC y OHC en tinciones con DAPI, y una contabilización de las células de Deiters en las muestras teñidas con faloidina (Figura 7A y B). Además, mediante faloidina fue posible observar las prolongaciones de las células de Deiters, las cuales se imbrican entre las OHC participando en la disposición espacial de las mismas (figura 7C). Del mismo modo, con respecto a los estereocilios de las células ciliadas, también formados por actina, se vio que estos presentaban una desorganización en su disposición (figura 7D).

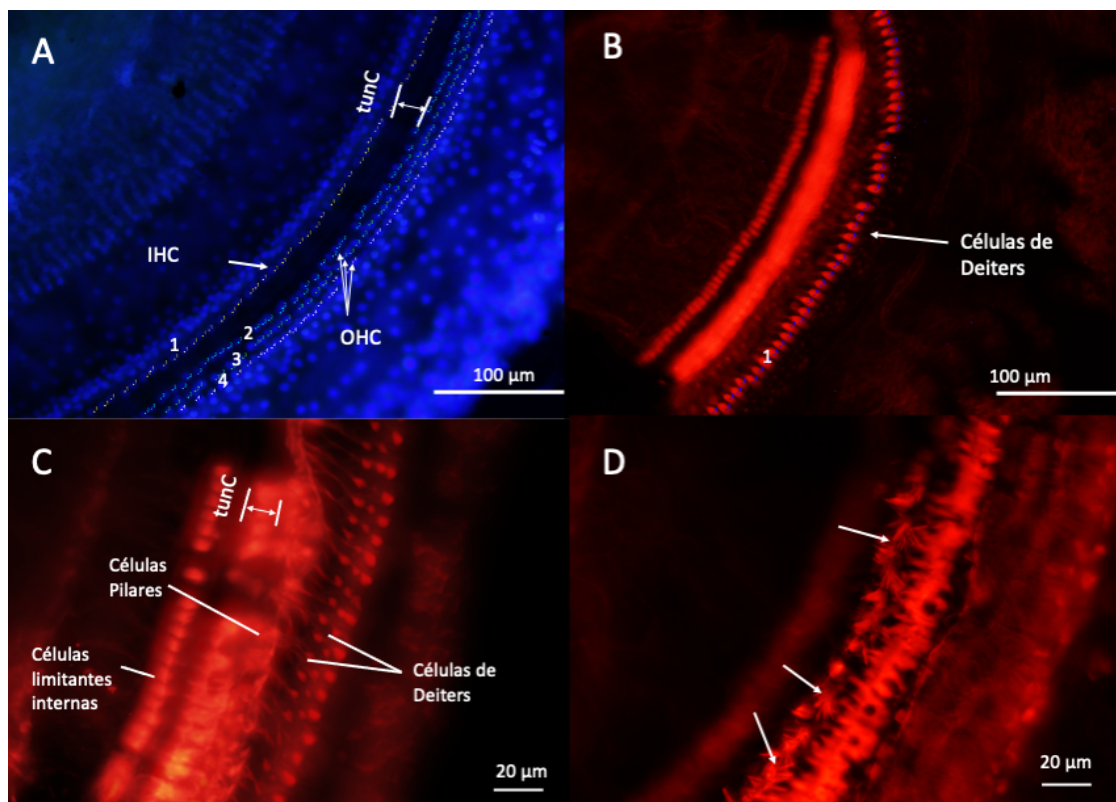


Figura 7. Distribución de las células ciliadas y de soporte en la cóclea del GASH/Sal. **A.** Microfotografía de epifluorescencia teñida con mostrando los núcleos de las IHC y OHC. Obsérvese la hilera de IHC y las tres hileras de OHC, separadas por el túnel de Corti. Nótese que las IHC aparecen marcadas con el número 1; la primera, segunda y tercera fila de OHC se representan con el número 2, 3 y 4, respectivamente. La imagen es representativa de la identificación utilizada durante el análisis cuantitativo del número de células ciliadas por cada 100 μm . **B.** Microfotografía mostrando una sección teñida con faloidina mostrando diferente tipo células de soporte. Con el número 1 aparecen marcadas las células de Deiters contabilizadas en la muestra. **C.** Microfotografía de una sección coclear teñida en faloidina en donde se pueden apreciar las células de Deiters con sus procesos falángicos que se situarían entre las OHC. **D.** Microfotografía en donde se aprecian los estereocilios de las IHC. Obsérvese la marcada desorganización estereociliar en las IHC del GASH/Sal (flechas).

Tras la contabilización de las diferentes muestras, se analizaron los datos, obteniendo una media de 10.5 ICH/100 μm , 11.9 OHC1/100 μm , 11.7 OHC2/100 μm , 11.7 OHC3/100 μm , lo que supone un total de 35.3 OHC/100 μm con una ratio OHC/IHC de 3.36. Con respecto a las células de Deiters, estas presentaron una proporción de 11.78 células por cada 100 μm de longitud coclear (ver en Tabla 4). De este modo, mediante una prueba ANOVA, se determinó que existían diferencias significativas (p -valor = .000) entre las IHC y el resto de los grupos (ver Figura 8).

Tipo de célula	N	Mínimo estadístico	Máximo estadístico	Media	Desviación	Varianza
IHC	31	9.2	11.9	10.5	0.65	0.42
OHC1	53	9.5	15.1	11.9	1.13	1.27
OHC2	31	7.5	14.4	11.7	1.30	1.68
OHC3	31	9.1	14.9	11.7	1.27	1.61
Células de Deiters	9	9.6	12.9	11.8	0.98	0.95

Tabla 4. Estadísticos descriptivos completos del número de células por cada 100 micras de longitud colear. Para la cuantificación fueron clasificadas las células en IHC, OHC1, OHC2, OHC3 como se muestra la figura 7A. En el caso de las células de Deiters se clasificaron y cuantificaron como se muestra en la figura 7B. N = número de fotografías analizadas

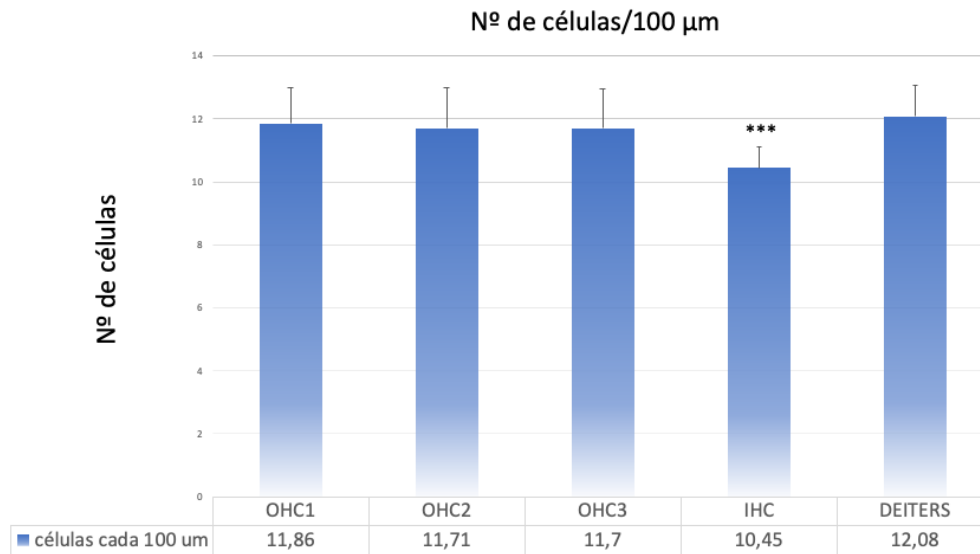


Figura 8. Gráfico de barras de la media del número de células ciliadas internas (IHC), células ciliadas externas (OHC1, OHC2 y OHC3) y de Deiters, contabilizadas en 100 µm de longitud coclear. Las barras representan la media ± SEM. Obsérvese diferencias significativas del número de IHC con respecto a los demás grupos. Análisis estadístico: prueba ANOVA de una vía, con prueba *post hoc* Bonferroni ($p \leq .001^{***}$).

Del mismo modo, se analizaron unas muestras procesadas con anti-parvalbúmina, donde aparecían las IHC teñidas. Obtuvimos un número medio de 9.82 IHC/µm, concordando con los resultados obtenidos en la contabilización con DAPI (ver Figura 9). Añadido a esto se obtuvo una inmunopositividad parcial para parvalbúmina, viéndose cómo algunas de las IHC no presentaban inmunotinción

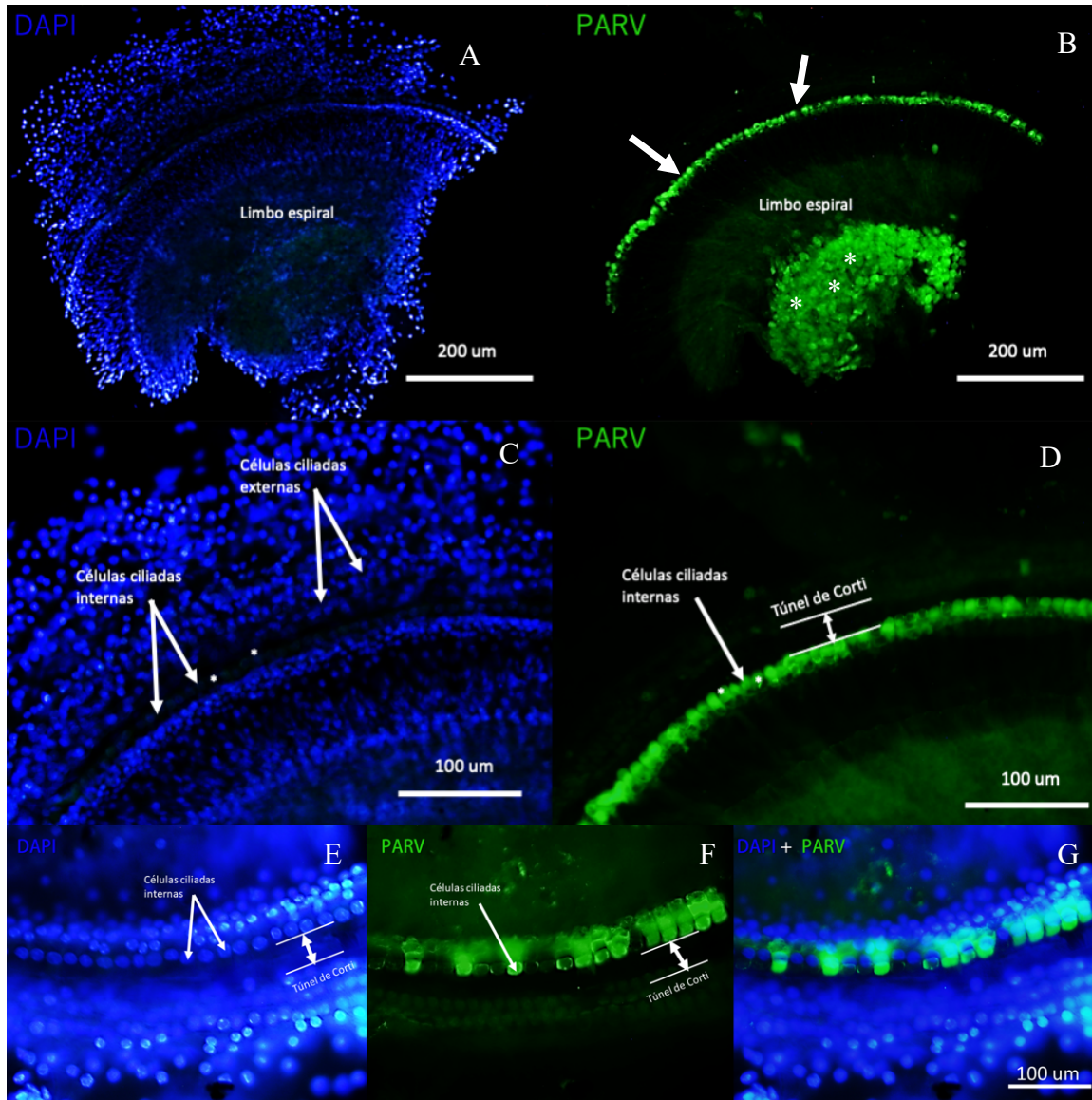


Figura 9. Distribución de las IHC inmunopositivas para Parvalbúmina. A y C. Microfotografías de epifluorescencia teñidas con DAPI donde se aprecian los núcleos de las células cocleares. B y D. Microfotografías de las mismas secciones mostradas en A y C, respectivamente. Obsérvese la hilera de IHC (flechas) y las neuronas del ganglio espiral (asterisco) inmunopositivas para Parvalbúmina (en verde). E y F. Microfotografías a mayor aumento de una sección teñida con DAPI y anti-parvalbúmina, respectivamente. G. Fotocomposición de las imágenes E y F mostrando la ausencia de inmunopositividad en determinadas IHC.

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

En la Figura 10, se aprecia cómo la proteína GPR98, visualizada mediante la tinción correspondiente, se expresa entre las OHC. Igualmente, entre las OHC, se observan terminales nerviosos inmunoteñidos frente a sinaptofisina (SYP) que presumiblemente proceden del sistema olivococlear medial que inervan las OHC.

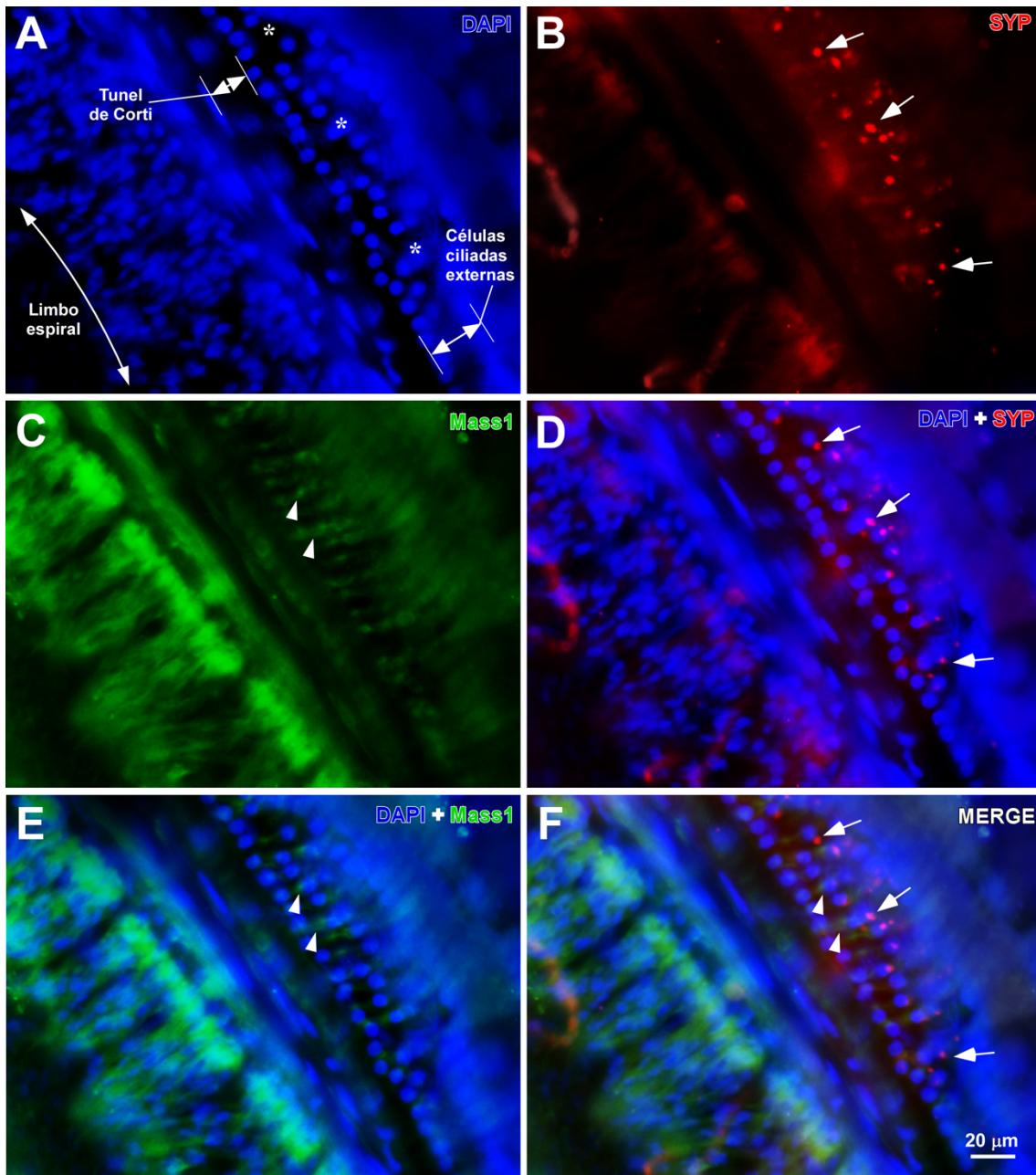


Figura 10. Inmunorreactividad para sinaptofisina y proteína GPR98 (MASS1) en la cóclea del GASH/Sal. **A.** Microfotografía de epifluorescencia mostrando los núcleos de las OHC con DAPI. Obsérvese la desorganización de las hileras de dichas células (asterisco). **B.** Microfotografía de la misma sección de A mostrando inmunofluorescencia para sinaptofisina. Las flechas indican los terminales presinápticos procedentes del haz olivococlear medial. **C.** Inmunotinción contra la

proteína GPR98 para su visualización. **D.** Fotocomposición de A y B, donde se muestra la ubicación de los terminales inmunomarcados con sinaptofisina en la región de las OHC. **E.** Fotocomposición de A y C donde se observa la proteína GPR98 en la región de las OHC (flechas). **F.** Fotocomposición de A, B y C

Por otra parte, otra proteína de interés que se ha observado su expresión es la CDH23. En la Figura 11 nuevamente se ven los núcleos teñidos con DAPI y, entre estos, zonas débilmente inmunoteñidas frente a CDH23 en una región compatible con la ubicación de los *tip links* de los estereocilios (Figura 11, B y C).

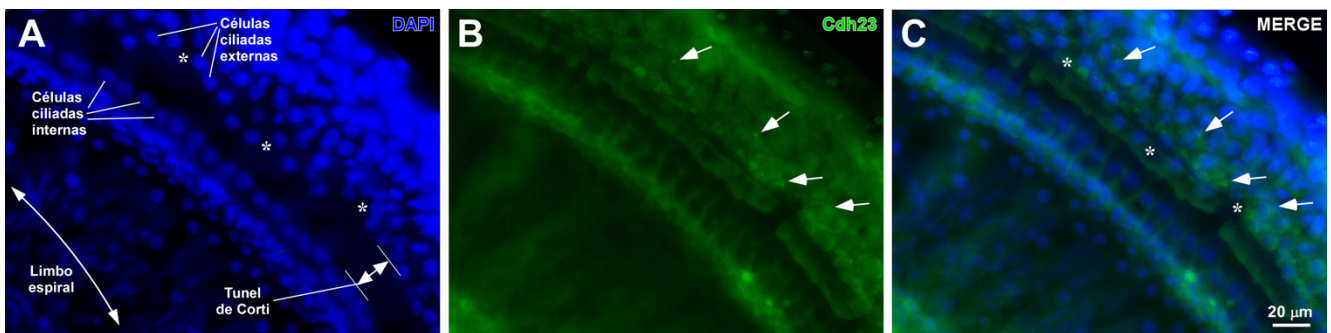


Figura 11. Inmunorreactividad para CDH23 en la cóclea del GASH/Sal. **A.** Se observan los núcleos de las células cocleares teñidos con DAPI. **B.** Inmunotinción contra cadherina (punta de flecha) en la misma sección observada en A. **C.** fotocomposición de A y B muestra la ubicación de la proteína en la región de las OHC. Obsérvese la débil inmunorreactividad para CDH23 en dicha región.

5.2. Alteraciones moleculares en el órgano de Corti del GASH/Sal

De los genes relacionados con los estereocilios, los genes *Cdh23* y *Pcdh15* mostraron una regulación negativa en GASH/Sal en comparación con el grupo de control (Figura 12, A y B) mientras que el gen *Gpr98*, no mostró diferencias transcripcionales entre los grupos evaluados (Figura 12, C).

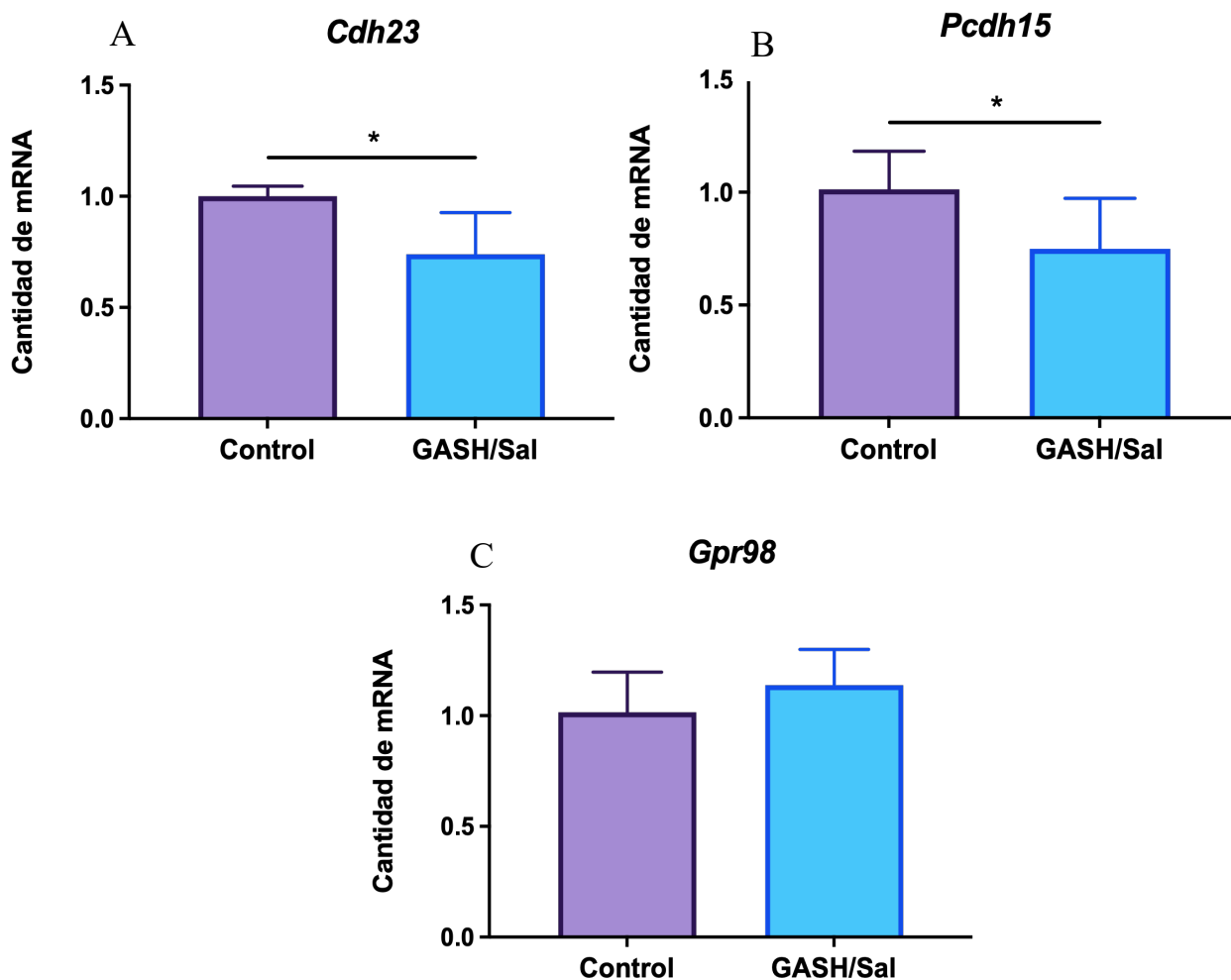


Figura 12. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea. **A:** *Cdh23* ($t = 4.692$; $p = .0001$); **B:** *Pcdh15* ($t = 3.261$; $p = .0036$); **C:** *Gpr98* ($t = 1.659$; $p = .1127$); Eje X: Cantidades relativas de ARNm en unidades arbitrarias. Eje Y: Grupos experimentales: hámsteres sirios (Control) y hámsteres propensos a convulsiones (GASH/Sal). Las barras representan la media \pm SEM. Análisis estadístico: prueba T de Student, * $p \leq .05$

6. DISCUSIÓN

Las células estereociliadas de la cóclea están distribuidas en tres filas de OHC y una fila de IHC. Se asientan en la membrana basilar, que oscila en respuesta a las ondas de presión sonora (Gillespie y Müller, 2009). Las OHC responden a potenciales inducidos por el sonido para ejercer una función de amplificador coclear y, por tanto, entre sus funciones destacan el aumento sensibilidad a niveles bajos de presión sonora, la selectividad frecuencial y el adecuado rendimiento coclear (Ashmore, 2019; Santos-Sacchi, 2019). La relación entre la pérdida de OHC y la capacidad de amplificación coclear aún no

está clara, pero se ha observado en ratas que, si la pérdida de OHC es superior a 2/3 del total, la amplificación se ve disminuida siempre y cuando el resto de OHC se encuentren funcionales (Chen et al., 2008). Esto puede implicar que, si el hámster GASH/Sal presenta anomalías cuantitativas en el número de OHC contabilizadas en el presente estudio, la capacidad de amplificación pueda estar reducida, contribuyendo a la hipoacusia que presentan de manera congénita y hallada en estudios previos mediante potenciales evocados troncoencefálicos (Muñoz et al., 2017). Se ha descrito la densidad de células ciliadas, tanto externas como internas, en la cóclea de otros roedores. En el ratón silvestre (*Mus musculus*), el número de células ciliadas por cada 100 µm de longitud coclear fueron 41.1 para las OHC y 12.1 para las IHC. La cóclea del ratón de la cepa de laboratorio NMRI contiene 39.7 OHC y 11.7 IHC por cada 100 µm, mientras que la del ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) tiene respectivamente 38.9 y 11.1. Con respecto a la rata silvestre (*Rattus norvegicus*), la cóclea posee 37.2 OHC y 9.8 IHC por cada 100 µm; y en una proporción similar se ha descrito en la rata negra (*Rattus rattus*, 37.2 OHC y 10.7 IHC por cada 100 µm) y en rata de la cepa Wistar (37.5 OHC y 10.39 IHC por cada 100 µm) (Burda et al., 1988). Burda et al. (1989) analizaron la morfometría de la cóclea del topo de palestina (*Spalax ehrenbergi*), obteniendo un total de 41.5 OHC y 10 IHC por cada 100 µm, si bien esta proporción la asocian a un desarrollo coclear condicionado por el hábitat subterráneo. Un estudio posterior de Lange et al. (2004) analizó la morfometría coclear del topillo (*Microtus arvalis*) y la rata topera (*Arvicola terrestres*), observando en el primero un total de 44.2 OHC y 12.1 IHC por cada 100 µm, mientras que, en el segundo animal, se describieron 40.5 OHC y 11.6 IHC. En nuestro estudio, hemos cuantificado que la cóclea del hámster GASH/Sal tiene 35.3 OHC por cada 100 µm, siendo esta proporción entre el 5 y 20% menor que los encontrados en otros roedores. Por el contrario, nuestro estudio ha mostrado que las IHC del GASH/Sal se encuentran en una proporción de 10.5 por cada 100 µm, siendo este resultado mayor que en la rata silvestre, la cepa Wistar y el topo de Palestina. En cambio, las IHC del GASH/Sal presenta una proporción entre 2 y 13 % menor que las descritas en el ratón silvestre, el de campo y el ratón de la cepa NMRI, así como en la rata negra, la rata topera y el topillo.

En lo referente a la ratio OHC/IHC, se puede apreciar cómo los roedores descritos poseen una mayor ratio que el GASH/Sal (ratio OHC/IHC 3.36). La ratio obtenida en dichos animales fue en ratón silvestre 3.4; ratón de laboratorio NMRI 3.4; ratón de campo 3.5; rata negra 3.48; rata de la cepa Wistar 3.6; rata silvestre 3.48; topo de palestina 4.15; topillo 3.49 y rata topera 3.65.

Cualitativamente, como muestran las imágenes de inmunofluorescencia, hay un desorden de las OHC, algo que confirma los resultados obtenidos en el estudio de Sánchez-Benito et al. (2020). En dicho estudio, mediante microscopía electrónica de barrido, observaron filas no paralelas de OHC en GASH/Sal debido a la protrusión de las células de Deiters, aspecto que no se puede determinar mediante el análisis en superficie. La falta de paralelismo entre las filas sí es apreciable en las muestras obtenidas y analizadas en este estudio. Asimismo, Sánchez-Benito et al. (2020), unido a las características morfométricas anteriormente descritas, destacan la presencia de anomalías en el conjunto estereociliar de las células ciliadas, algo que se ha observado en este estudio mediante imágenes de inmunofluorescencia, al verse un claro desorden de los estereocilios. Este aspecto muestra la correlación de los resultados morfométricos y las alteraciones moleculares halladas en el GASH/Sal. Se ha encontrado que *Pcdh15* y *Cdh23*, genes cuya expresión tiene lugar en los estereocilios, estaban infraexpresados. Ambos son fundamentales en los *tip links* estereociliares por lo que podrían explicar el desorden observado y descrito.

Los *tip links* entre los estereocilios están compuestos por dímeros de CDH23 que forman su porción superior y dímeros de PCDH15 que forman su porción inferior. De este modo, constituyen los *tip links* a través de una interacción dependiente del calcio (Araya-Secchi et al., 2016; Kazmierczak et al., 2007; Mahendrasingam et al., 2017). Estos genes son necesarios para la transducción sensorial que se produce gracias a los canales iónicos mecanosensitivos en los estereocilios en las células ciliadas internas del oído. La mecanotransducción es una consecuencia de la desviación de los estereocilios hacia la fila de estereocilios más larga, lo que genera tensión en los puentes apicales, abriendo los canales y causando la despolarización de las células ciliadas internas cocleares (Choudhary et al., 2020; Corey et al., 2019;

Kurima et al., 2015). En este aspecto, presumiblemente, la infraexpresión tanto de *Pcdh15* como *Cdh23*, se materializa con anomalías en dichas uniones dependientes de calcio haciendo que estas sean menos eficientes, algo que con apoyan nuestros resultados sobre inmunopositividad para parvalbúmina. En los resultados se aprecia cómo las células son inmunopositivas de manera parcial, lo que puede ser indicativo de una inadecuada mecanotransducción.

Se ha visto en ratones que las células ciliadas puede expresar tres isoformas de PCDH15 (CD1, CD2 y CD3) y que sólo la ausencia de una (PCDH15-CD2) produce sordera, aunque cualquier alteración en una de las isoformas contribuye a anomalías del desarrollo de los *tip links* (Corey et al., 2019). Estudios publicados previamente demuestran la falta de organización de los estereocilios durante el desarrollo en ausencia de PCDH15, al comprometer el papel de la proteína LHFPL5 (proteína de membrana tetraspanina de los estereocilios de las células ciliadas) con la que su interacción es crucial en los *tip links* en las células ciliadas de la cóclea (Ge et al., 2018; Mahendrasingam et al., 2017). Estos estudios concuerdan con los datos publicados por Sánchez-Benito et al., (2020), donde se muestra la falta de un adecuado orden y desarrollo estereociliar en el GASH/Sal y también concuerdan con el presente estudio, donde se observa la infraexpresión de PCDH15 detectada mediante RT-qPCR de la cóclea del GASH/Sal frente a controles. Por tanto, nuestros resultados apoyan los estudios previos y podrían explicar la hipoacusia presente en el GASH/Sal, pudiendo estar afectada tanto la transducción por anomalías de las IHC como la función de amplificación coclear de las OHC debido al déficit de PCDH15.

Como se menciona anteriormente, PCDH15 interacciona con CDH23 en la formación de los *tip links*, pero no únicamente dependen de estas dos proteínas. Otras publicaciones indican que hay diversos genes como por ejemplo el gen de la proteína transmembrana 2 (*Tmc2*) cuya expresión en la cóclea se limita al desarrollo de las agrupaciones de estereocilios. Este gen codifica el canal transmembrana TMC2 que constituye un canal de mecanotransducción complejo que incluye la proteína PCDH15, entre otras (Kurima et al., 2015; Liu et al., 2019; Corey et al., 2019; Jia et al., 2020). Con respecto a la CDH23, en la

porción superior del estereocilio, interacciona con otras proteínas como MYO7A (miosina VIIa) descrita como el elemento motor que tira de CDH23 para ejercer tensión en el *tip link*. A eso se unen otras proteínas que forman el complejo como son harmonina-b y USH1G. Por tanto, la infraexpresión de *Cdh23*, puede ser indicativo de que este complejo no actúe correctamente y no cause la tensión necesaria en la transducción. Añadido a esto, Furness et al., (2008) indican que la concentración de calcio extracelular afecta a la longitud del *tip link* y a su localización, contribuyendo a la elongación o acortamiento de la cadena proteica.

Por lo que respecta a la proteína GPR98, no se han determinado diferencias significativas en la expresión del gen que la codifica en relación a los controles. Pese a ello, se ha visto un papel importante de dicha proteína en el desarrollo y mantenimiento estereociliar de las células auditivas (McGee et al., 2006). Se ha observado cómo el gen *Gpr98* se expresa transitoriamente en los *ankle links* estereociliares y que, si éste es deficiente, el desarrollo estereociliar se ve afectado (McGee et al., 2006; Shin et al., 2013). Este aspecto no se justifica por la ausencia de diferencias significativas en la expresión del gen en la cóclea en nuestro estudio, aunque existen otras investigaciones que evidencian otras regiones auditivas diferentes a la cóclea donde este gen se expresa, como es el colículo inferior, un núcleo troncoencefálico cuya función es muy relevante en audición y cuya alteración puede deteriorar la transmisión del sonido desde la cóclea a la corteza auditiva (Mathur y Yang, 2015; Shin et al., 2013). Además, la ausencia de diferencias en la expresión génica no implica que la proteína no esté alterada, ya que aspectos como su estabilidad o tasa de recambio podrían presentar alguna anomalía y ser causantes de las alteraciones encontradas.

Aparte de la expresión proteica, otras cuestiones estudiadas, son las mutaciones de estos genes y su fenotipo, es decir, sus manifestaciones. Se ha hallado que, alteraciones en estos genes por su implicación en el sistema auditivo, son responsables de una alta prevalencia de sorderas congénitas, aunque con un patrón diverso. Las mutaciones en *Pcdh15* y *Cdh23* son responsables del síndrome de Usher tipo 1, el cuadro más frecuente y severo de sordoceguera congénita, y de una forma de sordera autosómica no-sindrómica

recesiva denominada DFNB12 (Han et al., 2012; Jaijo et al., 2012; Mathur y Yang, 2015; Mizutari et al., 2015).

Añadido a esto, se ha visto que *Cdh23* y *Pcdh15* también son responsables de cuadros de una susceptibilidad a las convulsiones audiógenas (Libé-Philippot et al., 2017), y que es la característica principal del GASH/Sal (Muñoz et al., 2017).

Por lo que respecta a la proteína GPR98, se ha visto que, si está alterada, también puede dar lugar a Síndrome de Usher, en este caso, tipo 2. Esta forma de Síndrome de Usher es la segunda en prevalencia. En este caso, a nivel auditivo presentan una pérdida auditiva neurosensorial que oscila entre moderada y severa, y progresiva en el tiempo (Pan y Zhang, 2012). Estudios recientes con ratones han demostrado que mutaciones en *Gpr98* implica la aparición de defectos tempranos en los estereocilios que conducen a una pérdida completa en la cóclea de IHC y de OHC (Whatley et al., 2020) por lo que, aunque no haya diferencias en la expresión de dicha proteína, es posible que se encuentre alterada a otros niveles.

7. Limitaciones del estudio y líneas de actuación futuras

El presente estudio muestra limitaciones en cuanto a la ausencia de comparación de los hámsteres GASH/Sal con un grupo control en la determinación de la morfometría. En este aspecto se abre una línea de actuación futura al observarse la validez de la preparación de las muestras según lo descrito en este estudio y no realizado anteriormente en este modelo animal. Por tanto, se presenta una línea de investigación para así comparar las descripciones morfométricas halladas con controles y evaluar las posibles diferencias. Asimismo, las alteraciones moleculares detectadas en algunas proteínas puede ser indicativo de que otras presentes en los complejos de unión de los estereocilios también estén alteradas y, por tanto, también sean objeto de estudio como por ejemplo las proteínas MYO7A o TMC2

8. Conclusiones

- **Primera:** el procedimiento descrito para el análisis en superficie de la cóclea de GASH/Sal constituye un procedimiento apto para estudio y análisis de la misma.
- **Segunda:** el GASH/Sal posee diferencias en el número de células ciliadas internas con respecto a las células ciliadas externas y estas últimas son menos numerosas en proporción que en la mayoría de los roedores de su especie estudiados. Asimismo, presenta un desorden en las células ciliadas externas.
- **Tercera:** los genes *Cdh23* y *Pcdh15* se encuentran infrexpresados con respecto a los controles, lo que podría explicar el desorden presente en estereocilios de las células ciliadas externas del GASH/Sal, mientras que el gen *Gpr98* no presenta diferencias significativas con controles.
- **Cuarta:** el desorden de las células ciliadas externas, unido a su menor número e infraexpresión de *Cdh23* y *Pcdh15* pueden ser factores que expliquen la hipoacusia congénita del GASH/Sal.

9. Bibliografía

1. Araya-Secchi, R., Neel, B. L., y Sotomayor, M. (2016). An elastic element in the protocadherin-15 tip link of the inner ear. *Nature Communications*, 7, 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms13458>
2. Ashmore, J. (2019). Outer hair cells and electromotility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033522>
3. Barrera-Bailón B, Oliveira J. A., López D.E., Muñoz de la Pascua L.J., Garcia-Cairasco N., Sancho C (2013). Pharmacological and neuroethological study of three antiepileptic drugs in the genetic audiogenic seizure hamster (GASH:Sal). *Epilepsy and Behavior*, 28(3):413-425. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2013.05.028>
4. Bonnet, C., y El-Amraoui, A. (2012). Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): Pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Current Opinion in Neurology*, 25(1), 42-49. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32834ef8b2>
5. Burda, H., Ballast, L., y Bruns, V. (1988). Cochlea in old world mice and rats (Muridae). *Journal of Morphology*, 198(3), 269-285. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051980303>
6. Burda, H., Bruns, V., y Nevo, E. (1989). Middle ear and cochlear receptors in the subterranean mole-rat, *Spalax ehrenbergi*. *Hearing Research*, 39(3), 225-230. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(89\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0378-5955(89)90042-7)
7. Chen, G.-D., Tanaka, C., y Henderson, D. (2008). Relation between outer hair cell loss and hearing loss in rats exposed to styrene. *Hearing Research*, 243(1-2), 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.05.008>
8. Choudhary, D., Narui, Y., Neel, B. L., Wimalasena, L. N., Klanseck, C. F., De-La-Torre, P., Chen, C., Araya-Secchi, R., Tamilselvan, E., y Sotomayor, M. (2020). Structural determinants of protocadherin-15 mechanics and function in hearing and balance perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(40), 4837-24848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920444117>
9. Corey, D. P., Akyuz, N., y Holt, J. R. (2019). Function and dysfunction of TMC channels in inner ear hair cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033506>

10. Damasceno, S., Gómez-Nieto, R., Garcia-Cairasco, N., Herrero-Turrión, M. J., Marín, F., y López, D. E. (2020). Top Common Differentially Expressed Genes in the Epileptogenic Nucleus of Two Strains of Rodents Susceptible to Audiogenic Seizures: WAR and GASH/Sal. *Frontiers in Neurology*, 11, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00033>
11. Díaz-Rodríguez, S. M., López-López, D., Herrero-Turrión, M. J., Gómez-Nieto, R., Canal-Alonso, A., y López, D. E. (2020). Inferior Colliculus Transcriptome After Status Epilepticus in the Genetically Audiogenic Seizure-Prone Hamster GASH/Sal. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00508>
12. Driver, E. C., y Kelley, M. W. (2020). Development of the cochlea. *Development (Cambridge)*, 147(12). <https://doi.org/10.1242/dev.162263>
13. Driver, E. C., y Kelley, M. W. (2020). Development of the cochlea. *Development*, 147(12), dev162263. <https://doi.org/10.1242/dev.162263>
14. Fettiplace, R., y Kim, K. X. (2014). The physiology of mechano-electrical transduction channels in hearing. *Physiological Reviews*, 94(3), 951-986. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2013>
15. Furness, D. N., Katori, Y., Nirmal Kumar, B., y Hackney, C. M. (2008). The dimensions and structural attachments of tip links in mammalian cochlear hair cells and the effects of exposure to different levels of extracellular calcium. *Neuroscience*, 154(1), 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.010>
16. Ge, J., Elferich, J., Goehring, A., Zhao, H., Schuck, P., y Gouaux, E. (2018). Structure of mouse protocadherin 15 of the stereocilia tip link in complex with LHFPL5. *eLife*, 7, 1-24. <https://doi.org/10.7554/eLife.38770>
17. Orphanet: Genes. (s. f.). Recuperado 22 de marzo de 2021, de https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Genes.php?lng=ES&data_id=16165&Disease_Disease_Genes_diseaseGroup=GPR98&Disease_Disease_Genes_diseaseType=Gen&MIS_SING%20CONTENT=adhesion-G-protein-coupled-receptor-V1---ADGRV1--GPR98-&search=Disease_Genes_Simple&
18. GeneCards—Human Genes | Gene Database | Gene Search. (s. f.). Recuperado 16 de mayo de 2021, de <https://www.genecards.org/>

19. Gillespie, P. G., y Müller, U. (2009). Mechanotransduction by Hair Cells: Models, Molecules, and Mechanisms. *Cell*, 139(1), 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.010>
20. Hackney, C. M., y Furness, D. N. (2013). The composition and role of cross links in mechano-electrical transduction in vertebrate sensory hair cells. *Journal of Cell Science*, 126(8), 1721-1731. <https://doi.org/10.1242/jcs.106120>
21. Han, F., Yu, H., Tian, C., Chen, H. E., Benedict-Alderfer, C., Zheng, Y., Wang, Q., Han, X., y Zheng, Q. Y. (2012). A new mouse mutant of the Cdh23 gene with early-onset hearing loss facilitates evaluation of otoprotection drugs. *The Pharmacogenomics Journal*, 12(1), 30-44. <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.60>
22. Jaijo, T., Oshima, A., Aller, E., Carney, C., Usami, S., Millán, J. M., y Kimberling, W. J. (2012). Mutation screening of the PCDH15 gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Molecular Vision*, 18, 1719-1726.
23. Kazmierczak, P., Sakaguchi, H., Tokita, J., Wilson-Kubalek, E. M., Milligan, R. A., Müller, U., y Kachar, B. (2007). Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature*, 449(7158), 87-91. <https://doi.org/10.1038/nature06091>
24. Klein, B. D., Fu, Y. H., Ptacek, L. J., y White, H. S. (2005). Auditory deficits associated with the frings Mgr1 (Mass1) mutation in mice. *Developmental Neuroscience*, 27(5), 321-332. <https://doi.org/10.1159/000086712>
25. Kurima, K., Ebrahim, S., Pan, B., Sedlacek, M., Sengupta, P., Millis, B. A., Cui, R., Nakanishi, H., Fujikawa, T., Kawashima, Y., Choi, B. Y., Monahan, K., Holt, J. R., Griffith, A. J., y Kachar, B. (2015). TMC1 and TMC2 Localize at the Site of Mechanotransduction in Mammalian Inner Ear Hair Cell Stereocilia. *Cell Reports*, 12(10), 1606-1617. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.058>
26. Laffon, E., y Angelini, E. (1996). On the Deiters cell contribution to the micromechanics of the organ of Corti. *Hearing Research*, 99(1-2), 106-109. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(96\)00089-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(96)00089-5)
27. Lange, S., Stalleicken, J., y Burda, H. (2004). Functional morphology of the ear in fossorial rodents, *Microtus arvalis* and *Arvicola terrestris*. *Journal of Morphology*, 262(3), 770-779. <https://doi.org/10.1002/jmor.10277>

28. Libé-Philippot, B., Michel, V., De Monvel, J. B., Le Gal, S., Dupont, T., Avan, P., Métin, C., Michalski, N., y Petit, C. (2017). Auditory cortex interneuron development requires cadherins operating hair-cell mechanoelectrical transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(30), 7765-7774. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703408114>
29. Liu, S., Li, S., Zhu, H., Cheng, S., y Zheng, Q. Y. (2012). A mutation in the *cdh23* gene causes age-related hearing loss in *Cdh23* *nmf308/nmf308* mice. *Gene*, 499(2), 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.084>
30. Maeda, R., Kindt, K. S., Mo, W., Morgan, C. P., Erickson, T., Zhao, H., Clemens-Grisham, R., Barr-Gillespie, P. G., y Nicolson, T. (2014). Tip-link protein protocadherin 15 interacts with transmembrane channel-like proteins TMC1 and TMC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12907-12912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402152111>
31. Mahendrasingam, S., Fettiplace, R., Alagramam, K. N., Cross, E., y Furness, D. N. (2017). Spatiotemporal changes in the distribution of LHFPL5 in mice cochlear hair bundles during development and in the absence of PCDH15. *PLoS ONE*, 12(10), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185285>
32. Mathur, P., y Yang, J. (2015). Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(3), 406-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.020>
33. McGee, J. A., Goodyear, R. J., McMillan, D. R., Stauffer, E. A., Holt, J. R., Locke, K. G., Birch, D. G., Legan, P. K., White, P. C., Walsh, E. J., y Richardson, G. P. (2006). The very large G-protein-coupled receptor VLG1: A component of the ankle link complex required for the normal development of auditory hair bundles. *Journal of Neuroscience*, 26(24), 6543-6553. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0693-06.2006>
34. Mizutari, K., Mutai, H., Namba, K., Miyanaga, Y., Nakano, A., Arimoto, Y., Masuda, S., Morimoto, N., Sakamoto, H., Kaga, K., y Matsunaga, T. (2015). High prevalence of CDH23 mutations in patients with congenital high-frequency sporadic or recessively inherited hearing loss. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0276-z>

35. Muñoz, L. J., Carballosa-Gautam, M. M., Yanowsky, K., García-Atarés, N., y López, D. E. (2017). The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy and Behavior*, 71, 181-192. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.03.002>
36. Noben-Trauth, K., Zheng, Q. Y., y Johnson, K. R. (2003). Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nature Genetics*, 35(1), 21-23. <https://doi.org/10.1038/ng1226>
37. Pujol, R., Lenoir, M., Rebillard, G., y Gil-Lozaga, P. (s. f.). Viaje al mundo de la audición. Recuperado 16 de junio de 2021, de <http://www.cochlea.eu/es>
38. Oroz, J., Galera-Prat, A., Hervás, R., Valbuena, A., Fernández-Bravo, D., y Carrión-Vázquez, M. (2019). Nanomechanics of tip-link cadherins. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49518-x>
39. Pan, L., y Zhang, M. (2012). Structures of usher syndrome 1 proteins and their complexes. *Physiology*, 27(1), 25-42. <https://doi.org/10.1152/physiol.00037.2011>
40. Parsa, A., Webster, P., y Kalinec, F. (2012). Deiters cells tread a narrow path-The Deiters cells-basilar membrane junction-. *Hearing Research*, 290(1-2), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.05.006>
41. Ramzan, K., Al-Numair, N. S., Al-Ageel, S., Elbaik, L., Sakati, N., Al-Hazaa, S. A. F., Al-Owain, M., y Imtiaz, F. (2020). Identification of novel cdh23 variants causing moderate to profound progressive nonsyndromic hearing loss. *Genes*, 11(12), 1-15. <https://doi.org/10.3390/genes11121474>
42. Randy McMillan, D., Kayes-Wandover, K. M., Richardson, J. A., y White, P. C. (2002). Very large G protein-coupled receptor-1, the largest known cell surface protein, is highly expressed in the developing central nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 785-792. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108929200>
43. Sánchez-Benito, D., Hyppolito, M. A., Alvarez-Morujó, A. J., López, D. E., y Gómez-Nieto, R. (2020). Morphological and molecular correlates of altered hearing sensitivity in the genetically audiogenic seizure-prone hamster GASH/Sal. *Hearing Research*, 392, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107973>

44. Santos-Sacchi, J. (2019). The speed limit of outer hair cell electromechanical activity. *Hno*, 67(3), 159-164. <https://doi.org/10.1007/s00106-019-0615-9>
45. Senften, M., Schwander, M., Kazmierczak, P., Lillo, C., Shin, J. B., Hasson, T., Géléoc, G. S. G., Gillespie, P. G., Williams, D., Holt, J. R., y Müller, U. (2006). Physical and functional interaction between protocadherin 15 and myosin VIIa in mechanosensory hair cells. *Journal of Neuroscience*, 26(7), 2060-2071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4251-05.2006>
46. Shin, D., Lin, S. T., Fu, Y. H., y Ptáček, L. J. (2013). Very large G protein-coupled receptor 1 regulates myelin-associated glycoprotein via Gas/Gaq-mediated protein kinases A/C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), 19101-19106. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318501110>
47. Smith, R. J. H., Bale Jr, J. F., y White, K. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet*, 365, 879-890. <https://doi.org/10.1002/lary.25544>
48. Sun, J. P., Li, R., Ren, H. Z., Xu, A. T., Yu, X., y Xu, Z. G. (2013). The very large g protein coupled receptor (Vlgr1) in hair cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 50(1), 204-214. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9911-5>
49. Taiber, S., y Avraham, K. B. (2019). Genetic Therapies for Hearing Loss: Accomplishments and Remaining Challenges. *Neuroscience Letters*, 713, 134527. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134527>
50. Taylor, R. R., Jagger, D. J., y Forge, A. (2012). Defining the cellular environment in the organ of corti following extensive hair cell loss: A basis for future sensory cell replacement in the cochlea. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030577>
51. Tona, R., Lopez, I. A., Fenollar-Ferrer, C., Faridi, R., Anselmi, C., Khan, A. A., Shahzad, M., Morell, R. J., Gu, S., Hoa, M., Dong, L., Ishiyama, A., Belyantseva, I. A., Riazuddin, S., y Friedman, T. B. (2020). Mouse Models of Human Pathogenic Variants of TBC1D24 Associated with Non-Syndromic Deafness DFNB86 and DFNA65 and Syndromes Involving Deafness. *Genes*, 11(10), 1122. <https://doi.org/10.3390/genes11101122>
52. Vollrath, M. A., Kwan, K. Y., y Corey, D. P. (2007). The Micromachinery of Mechanotransduction in Hair Cells. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 339-365. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112917>

53. Wan, G., Corfas, G., y Stone, J. (2008). Rethinking Silent Majority: Role of Supporting Cells. *Bone*, 24(5), 448-459. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.03.009>.Inner
54. Whatley, M., Francis, A., Ng, Z. Y., Khoh, X. E., Atlas, M. D., Dilley, R. J., y Wong, E. Y. M. (2020). Usher Syndrome: Genetics and Molecular Links of Hearing Loss and Directions for Therapy. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.565216>
55. Wolfrum, U., y Nagel-Wolfrum, K. (2018). [The Usher Syndrome, a Human Ciliopathy]. *Klinische Monatsblatter Fur Augenheilkunde*, 235(3), 273-280. <https://doi.org/10.1055/a-0573-9431>
56. Yagi, H., Tokano, H., Maeda, M., Takabayashi, T., Nagano, T., Kiyama, H., Fujieda, S., Kitamura, K., y Sato, M. (2007). *Vlgr1* is required for proper stereocilia maturation of cochlear hair cells. *Genes to Cells*, 12(2), 235-250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01046.x>
57. Zhao, B., y Müller, U. (2015). The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 34(Figure 2), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.08.006>

10. Anexo

Anexo 1: Lista de tablas y figuras empleadas

FIGURAS

Figura 1. Anatomía del órgano de Corti

Figura 2. Tipos de enlaces estereociliares de las células ciliadas

Figura 3. Componentes celulares del órgano de Corti.

Figura 4. Esquema del diseño experimental del estudio

Figura 5. Estructura de la cóclea del GASH/Sal desde diferentes ángulos de visión

Figura 6. Disección de las cócleas del GASH/Sal.

Figura 7. Distribución de las células ciliadas y de soporte en la cóclea del GASH/Sal.

Figura 8. Gráfico de barras de la media del número de células ciliadas internas (IHC), células ciliadas externas (OHC1, OHC2 y OHC3) y de Deiters, contabilizadas en 100 μm de longitud coclear.

Figura 9. Distribución de las IHC inmunopositivas para Parvalbúmina.

Figura 10. Inmunorreactividad para sinaptofisina y proteína GPR98 (MASS1) en la cóclea del GASH/Sal.

Figura 11. Inmunorreactividad para CDH23 en la cóclea del GASH/Sal.

Figura 11. Cantidades relativas de los transcritos en la cóclea

TABLAS

Tabla 1. Principales proteínas implicadas en la mecanotransducción y los genes que las codifican

Tabla 2. Reactivos utilizados en las inmunotinciones

Tabla 3. Cebadores utilizados para la RT-qPCR

Tabla 4. Estadísticos descriptivos completos del número de células por cada 100 micras de longitud colear.

Anexo 2: Protocolo preparación de cócleas para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia

Se puede partir de un animal fijado con perfusión transcardiaca 4% PFA o extracción en fresco con anestesia isoflurano seguida de decapitación como se ha hecho en este estudio

Primeramente, se comienza con la fijación y preparación del tejido en fresco consistente en los siguientes pasos.

- Eliminar restos óseos y musculares de las cócleas. Identificar izquierda y derecha.
- Abrir la bulla
- Perforar el ápex con una aguja histológica y perfundir con PFA 4% (filtrado) a través de las ventanas. Usar una cánula muy fina.
- Poner las cócleas en postfijación con PFA 4% en PB 0.1M entre 2 – 24 h a 4°C

A continuación, se procede a decalcificar EDTA 8% durante 10 días a temperatura ambiente. Preparación de la solución de EDTA 8% en PFA 1% en PB 0.1M:

- 375 ml de H₂O destilada
- 40 g de EDTA
- 125 ml de PFA 4% en PB 0.1M.

Echar el agua destilada los 40 g de EDTA y añadir NaOH hasta que el polvo se disuelva y se vuelva transparente, ya que el EDTA es muy ácido. Añadir el PFA 4%. Filtrar la solución y almacenar en temperatura ambiente. Las cócleas se dejan en la solución a temperatura ambiente durante 10 días. En las cócleas de un animal sin perfundir no se satura la solución de EDTA y no será necesario cambiar la solución durante el proceso.

Para la obtención de las espiras, se divide la cóclea en dos mitades mediante un corte paramodiolar, teniendo como referencia la ventana redonda. Con unas pinzas muy afiladas, se va quitando la masa cartilaginosa con mucho cuidado para acceder a las espiras de la lámina reticular. Se cortan las espiras (apical, medial y basal). También, se quita la pared vascular con una cuchilla para evitar que ésta se ponga encima de la lámina reticular y de las membranas tectoria y de Reissner.

Anexo 3: Protocolo de inmunofluorescencia para la detección de sinaptofisina y Mass1 en cóclea contrateñido con DAPI.

Reactivos y anticuerpos:

- Mouse anti-Synaptophysin (SYP). SVP-38, monoclonal (Sigma). Dilución recomendada 1/200 a 1/400.
- Rabbit anti-Mass1 (GPR98). Novus Biologicals, NBP2-57048. Dilución recomendada 1/50 a 1/200.
- VectaFluor Duet Antibody Reagent (DK-8818, Vector) DyLight 488 anti-rabbit IgG (green) + DyLight 594 Anti-mouse IgG (red)

Procedimiento:

Una vez diseccionadas las espiras y divididas en secciones (basal, medial y apical) se colocan de placas de cultivo de 48 pocillos. Se utilizará una rejilla de microscopia electrónica para trasladar las secciones sin dañarlas. Se almacenará en TBS 0.05 M pH 7.6 (400 μ L por pocillo). Manejar con cuidado las espiras asegurándose de que siempre estén sumergidas. Para quitar cambiar los líquidos usar una micropipeta de 200 μ L con precaución de no absorber las espiras.

- 1) Lavado en TBS 0.05 M pH 7.6.....1 X 15 min. en agitación

TBS se prepara:

- a) Tris (Trisma Base - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121.1) = 6.06 gr
 - b) NaCl = 8.85 gr
 - d) H₂O destilada q.s.p. 1000 ml
 - e) Ajustar el pH con solución de HCl hasta 7.6
- 2) Bloqueo del marcaje inespecífico con Reagent Kit: 2.5 Normal Horse Serum.....1 hora en agitación T^a ambiente. 200 – 300 μ L por pocillo.
 - 3) Incubación con el cocktail de Anticuerpos primarios Mouse anti-Synaptophysin + Rabbit Mass1 durante 72 horas a 4 °C en agitación.

Solución de incubación de los anticuerpos: (TBS 0.05M + 2.5 % NGS + 0.5 % TX). Cóctel anticuerpos: Mass1 dilución 1/100 (sin alicuotar) + SYP dilución 1/100 (alícuotas 1/10 de 100 μ l). Volumen total = 1000 μ l. Se puede reducir a 300-200 μ L por pocillo.

- 4) Lavado en TBS 0.05 M pH 7.6.....3 X 15 min. en agitación y en oscuridad

- 5) Incubar en VectaFluor Duet Antibody Reagent (Anticuerpos secundarios) durante 120 min. temperatura ambiente en agitación.
- 6) Lavado en TBS 0.05 M pH 7.6.....3 X 15 min. en agitación
- 7) Cubrir y montar con la solución de vector (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI: H-1200-10).

Es muy importante el mantenimiento de la muestra lejos de fuentes de luz durante la incubación de los anticuerpos secundarios y consecuentes lavados para que la muestra no pierda la capacidad de fluorescencia

Con respecto al protocolo para la tinción con parvalbúmina y CDH23, se siguieron los mismos procesos, únicamente se varió la solución de anticuerpos primarios y, en el caso de la CDH23 el anticuerpo secundario (CyTM2 Donkey Anti-Rabbit IgG)

Anexo 4: Protocolo preparación paraformaldehído (PFA)

Para la preparación del fijador, se siguieron los siguientes pasos bajo la más estricta seguridad debido a la toxicidad del PFA. Se utilizó todo el material de barrera necesario, así como la preparación del mismo bajo campana extractora.

Fijador:

A= 4% Paraformaldehido en 0.1 M PB pH 7.4

Calcular el volumen de Paraformaldehido 4% necesario para preparar el volumen deseado. Por ejemplo, si se desea preparar 100 mL

100 mL ----- 4 g paraformaldehido
1000 mL ----- x

x= 40 g PFA para preparación

Diluir a 65 °C en aproximadamente la mitad del volumen total de agua destilada en un matraz de vidrio (por ejemplo: Pyrex). Calentar agua y luego agregar paraformaldehido + 1 gota de NaOH para adecuar el pH y permitir la disolución. Se verá que se vuelve transparente. Luego dejar enfria

B= tampón fosfato (PB) 0.1 M

Partiendo de PB 0.4 M, calcular el volumen necesario de este tampón para resultar una disolución PB 0.1M. Por ejemplo, para 500 mL:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$
$$500 \text{ ml} \times 0,1 = V2 \times 0.4$$

V2 = 125 ml PB 0.4 M + resto de agua destilada

Total fijador:

B = 125 mL PB 0.4 M filtrar

A = 500 mL (Agua + 40g paraformaldehido)

D = Resto de agua destilada.

Es importante que tanto la disolución A como B se filtren con un filtro de papel y se midan en una probeta de precisión. Asimismo, el agua destilada para completar el volumen total deseado ha de ser filtrada del mismo modo.