

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA



TESIS DOCTORAL

Mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento y en la respuesta auditiva al daño: IGF-1, C-RAF y autofagia

Rocío de Iriarte Rodríguez

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA



Mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento y en la respuesta auditiva al daño: IGF-1, C-RAF y autofagia

Memoria presentada por ROCÍO DE IRIARTE RODRÍGUEZ, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de la tesis:

Dra. Isabel Varela Nieto, Profesora de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Dra. Marta Magariños Sánchez, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Dña. Isabel Varela Nieto, Profesora de Investigación del CSIC, y **Dña. Marta Magariños Sánchez**, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid:

AUTORIZAN: la presentación de la tesis doctoral titulada “**Mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento y en la respuesta auditiva al daño: IGF-1, CRAF y autofagia**” realizada bajo su dirección por la Licenciada en Biología Rocío de Iriarte Rodríguez en el Grupo de Neurobiología de la Audición perteneciente al Departamento Fisiopatología Endocrina y del Sistema Nervioso del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”. Esta tesis se ha realizado con un contrato del CSIC asociado al proyecto SAF2011-24391, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad. Revisado el presente trabajo, los Directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el tribunal que se designe al efecto.

Y para que conste a efectos oportunos se expide el presente certificado en Madrid, a 5 de junio de 2016.

Fdo.: Dra. Isabel Varela Nieto

Fdo.: Dra. Marta Magariños Sánchez

A mis padres, Elías y Nati

A mi hermano, Iván

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Isabel Varela Nieto. Gracias por acogerme en tu laboratorio, por enseñarme a investigar de forma crítica y por hacer que esta experiencia haya sido tan bonita. Por cuidarme y preocuparte siempre de mí, tanto en la etapa predoctoral como en mi futuro profesional. Gracias por tu energía inagotable. Has sido y serás todo un ejemplo a seguir para mí. Muchas gracias, de corazón.

A la Dra. Marta Magariños. Gracias porque tú fuiste el inicio de todo esto. Con tus clases de fisiología animal despertaste un interés en mí que ha ido creciendo y creciendo. Gracias por darme la oportunidad de hacer el proyecto fin de carrera contigo y por haberme dirigido la tesis. Por tu amistad y cariño. Muchas gracias Martis!

A todos mis compañeros del 2.11. Porque esta tesis es también vuestra. A Lourdes, por enseñarme a hacer las cosas con mimo y cuidado y por toda la ayuda que me has aportado siempre. A Silvia, por estar siempre dispuesta a echarme una mano y por todo el trabajo del ENNI para esta tesis. A Raquelita, por tu cariño y por compartir mis primeros congresos juntas. Por estar siempre que lo he necesitado. Ha sido un placer ser compañeras de “corner”. A Ada, por tu amistad, por los congresos compartidos, por ayudarme con esta tesis. Gracias por nuestras conversaciones sobre ciencia y por otras muchas. Dentro de poquito te toca a ti defender tu tesis, ¡muchacha suerte! A Néstor, que también será doctor dentro de muy poco. A Julio y Rafa, por toda vuestra ayuda y porque vuestras visitas al labo son siempre una alegría para nosotras. A Chema, Miguel, Sara e Isa “mis primeros alumnos”. Gracias porque he aprendido un montón con vosotros. Os deseo a los cuatro un gran futuro profesional. A María, por ayudarme tanto en mis primeros meses de laboratorio. Ha sido un placer trabajar con todos vosotros, muchísimas gracias por vuestro cariño y amistad.

A Isabel Varela Nieto, Gemma Rodríguez-Tarduchy, María de los Ángeles Pajares, Álvaro Martínez del Pozo, Alejandra Galindo e Isabel perdiguero. Gracias por la oportunidad de trabajar junto a vosotros en la SEBBM por enseñarme a divulgar ciencia, por mimarme tanto y por la oportunidad de viajar con vosotros por diferentes países.

A todo el personal del IIB. Especialmente a Gemma Rodríguez-Tarduchy y el personal del Servicio de Genómica. Gracias por vuestra paciencia conmigo y sobre todo por hacer un trabajo tan bien hecho.

A Nacho, por ayudarme con el proyecto fin de carrera que sin saberlo fue el principio de esta tesis. También agradecer a todos los que formaban parte en ese momento del laboratorio de Fisiología Animal. Porque aprendí que la ciencia es rigurosa pero también divertida. Por vuestra paciencia conmigo. Muchas gracias.

A mis compañeros del Museo Nacional de Ciencias Naturales. Gracias a todos por compartir estos últimos momentos de tesis conmigo. A Pilar López, por acogerme en su equipo y darme esta oportunidad tan bonita de trabajar en el Museo. A Alfonso, Azucena, Cristina, Luis y Xiomara, porque trabajar con vosotros es un lujo. A Alfonso doble agradecimiento, por ayudarme a maquetar la tesis.

A Salud y Andrés, mis profes del colegio. Gracias por dejar esa huella imborrable en mí. Con profesores como vosotros estoy convencida que la educación puede cambiar el mundo.

A mis niñas, Coral, Jesy y María. Gracias por todos estos años inolvidables de cariño, viajes y conversaciones. Gracias por estar siempre a mi lado.

A Ana, Patri, Fran, Ramonchu y Sangui. Gracias por tantos y tantos momentos de risas y por nuestras escapadas a los pueblos del Real. Por estar cerca siempre que lo he necesitado. Sois la caña y pienso seguir dando guerra con vosotros muchos años más.

A mis masterianos. Gracias por compartir conmigo tanta neurociencia durante los dos años de master. Especialmente a Helena, Marta, Ana y Mari. Mis Ladies.

A Isra y Marga, por compartir estos últimos momentos de tesis conmigo. Por vuestra amistad y por compartir con nosotros vuestra forma de ver el mundo. Por todos los momentos que nos quedan por disfrutar. ¡Mucho ánimo con tu tesis Marga! Dentro de poco estarás tú redactando líneas parecidas. Tienes todo mi apoyo.

A Sebas, porque conocerte ha sido precioso. Gracias por apoyarme y por estar a mi lado. Por despertar mi interés por la fotografía y el ciclismo urbano. Por todos los viajes a la playa que tanto reconfortan y por los km en furgo. Por esas conversaciones interminables que tanto me gustan. Gracias por hacer todo fácil y quererme tanto.

A Isabel, mi vecina y profesora. Muchas gracias por apoyarme siempre en todos mis proyectos académicos y por preocuparte tanto. Muchas, muchas gracias.

Y especialmente a mi familia:

A mis abuelos, tíos y primos. Gracias por vuestro cariño y porque de todos vosotros he aprendido algo. Especialmente a mis tíos, Miguel e Inés, y mis primos, Miguel y Marta, por estar siempre tan cerquita. Suerte con los nuevos Iriarte que vienen en camino, os deseo todo lo mejor. Y a mi abuela Nati, porque tus historias y tu cariño estarán siempre presentes en mí.

A mis padres, Elías y Nati, porque gracias a vosotros he llegado hasta aquí. Muchas gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme en todo. Gracias por inculcarme desde pequeña el amor a la lectura, la naturaleza, la ciencia y tantas otras cosas. Por ser mi ejemplo a seguir. Gracias, porque lo mejor que he heredado de vosotros, es el entusiasmo por la vida.

A mi hermano, Iván, que tantos y tantos momentos hemos compartido. Gracias por ser mi otra mitad.

Es imposible agradecerlos todo en unas pocas líneas. Os quiero.

GRACIAS a todos vosotros y a los que no he nombrado...

Rocío

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. El oído interno de mamíferos	15
1.1.1 Desarrollo embrionario del oído interno de mamíferos	15
1.1.2 La autofagia en el oído interno de mamíferos	18
1.1.2.1 Regulación y etapas de la autofagia	19
1.1.2.2 Señalización de la autofagia	20
1.1.2.3 Funciones de la autofagia durante el desarrollo embrionario	22
1.1.3 Estructura y función del oído interno adulto de mamíferos	23
1.1.4 La transmisión del sonido	28
1.2. Hipoacusia y sordera	29
1.2.1 Pérdida auditiva inducida por ruido (NIHL)	30
1.2.2 Susceptibilidad genética a la NIHL	31
1.2.3 Mecanismos moleculares de la NIHL	32
1.2.3.1 NIHL e inflamación	33
1.2.4 Funciones de la autofagia en la fisiopatología del oído interno adulto	33
1.3. Papel del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 en el desarrollo del oído interno y en la función auditiva	34
1.3.1 Vías de señalización del IGF-1	38
1.3.1.1 Vía de señalización PI3K/AKT	39
1.3.1.2 Vía de señalización RAF/MEK/ERK	40
1.3.1.2.1 Familia de las RAF quinasas	40

1.3.1.2.2 Estructura y regulación de las RAF quinasas	41
1.3.1.2.3 Funciones de las RAF quinasas	42
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1. Mantenimiento de los ratones y determinación de su genotipo	51
3.1.1 Colonia <i>Igfl</i>	51
3.1.2 Colonia <i>C-Raf</i>	52
3.2. Evaluación <i>in vivo</i> de la respuesta auditiva.....	54
3.3. Pérdida auditiva inducida por ruido	55
3.4. Evaluación de la función vestibular	55
3.4.1 Prueba de la curvatura del tronco	55
3.4.2 Prueba de reposicionamiento.....	56
3.4.3 Prueba de natación.....	56
3.5. Obtención y preparación de las muestras para el análisis morfológico y funcional de la cóclea.....	56
3.5.1 Inclusión en gelatina y congelación	57
3.5.2 Inclusión en parafina	57
3.6. Análisis morfológico y funcional de la cóclea.....	57
3.6.1 Análisis morfológico e inmunohistoquímica en secciones de parafina.....	57
3.6.2 Inmunohistofluorescencia en criosecciones	58
3.6.3 Cuantificación de la inmunohistofluorescencia.....	59
3.6.3.1 Cuantificación por intensidad de señal	60
3.6.3.2 Cuantificación por número de células.....	60
3.7. Extracción y análisis de proteínas	60
3.7.1 Extracción de proteínas	60

3.7.2 Cuantificación de proteínas	62
3.7.3 Determinación de los niveles de proteína y su grado de activación mediante <i>Western blotting</i>	62
3.8. Análisis del transcriptoma de la cóclea mediante arrays	63
3.8.1 Extracción de ARN.....	63
3.8.2 Hibridación de los arrays.....	63
3.8.3 Análisis de los niveles de expresión génica	64
3.9. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR	65
3.9.1 Extracción de ARN.....	65
3.9.2 RT-qPCR	65
3.10. Detección de la muerte celular mediante la técnica de TUNEL	67
3.11. Disección del oído medio.....	67
3.12. Análisis estadístico.....	68
4. RESULTADOS	69
4.1. Patrón temporal de expresión de los componentes del sistema IGF y su señalización intracelular.....	71
4.1.1. La expresión de los elementos del sistema IGF aumentan con el déficit de <i>Igf1</i> en la cóclea del ratón adulto.....	71
4.1.2. Patrón temporal de la actividad de las quinasas moduladas por el IGF-1	73
4.2. Presencia y regulación de la autofagia en el oído interno de ratón: Papel del IGF-1	78
4.2.1. Los principales genes autofágicos se expresan en la cóclea de ratones E18,5	78
4.2.2. Patrón temporal de la expresión de genes autofágicos en la cóclea del ratón nulo <i>Igf1</i>	82

4.2.3. Los genes de la maquinaria autofagica <i>Becn1</i> , <i>Atg4b</i> , <i>Atg5</i> se expresan en el vestíbulo y el cerebro de ratones <i>Igf1</i> ^{+/+} e <i>Igf1</i> ^{-/-}	86
4.2.4. El flujo autofágico está modulado en el oído interno con la edad.....	89
4.2.5. La autofagia es muy activa en las neuronas del ganglio espiral.....	91
4.3. Caracterización del ratón mutante nulo para <i>C-Raf</i>	94
4.3.1. Las RAF quinasas se expresan en el oído interno del ratón en etapas de desarrollo embrionario y en el ratón adulto.....	94
4.3.2. Los ratones nulos para <i>C-Raf</i> presentan sordera neurosensorial profunda.....	96
4.3.3. El oído medio y el oído interno de los ratones nulos para <i>C-Raf</i> presentan una morfología normal	100
4.3.4. La citoarquitectura coclear y vestibular de los ratones nulos para <i>C-Raf</i> no presenta alteraciones.....	102
4.3.5. La expresión del canal de potasio Kir4.1 disminuye en los ratones nulos <i>C-Raf</i>	103
4.3.6. El perfil molecular de la cóclea de ratones nulos para <i>C-Raf</i> E18,5 muestra un aumento en la expresión de <i>FoxG1</i>	107
4.3.7. Los ratones heterocigotos <i>C-Raf</i> presentan una mayor susceptibilidad al daño inducido por ruido	110
4.3.8. Los ratones heterocigotos <i>C-Raf</i> expuestos a ruido presentan alteraciones en la citoarquitectura coclear y en la expresión de marcadores celulares.....	110
4.3.9. Los ratones heterocigotos <i>C-Raf</i> presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas	115

5. DISCUSIÓN	117
5.1. El déficit de IGF-1 modifica los niveles de algunos componentes del sistema IGF y de los principales elementos de señalización intracelular.....	119
5.1.1. El déficit de IGF-1 en la cóclea se compensa parcialmente a nivel de su receptor de alta afinidad y de IGF-2.....	119
5.1.2. Los ratones nulos <i>Igf-1</i> presentaron niveles aumentados de A-RAF,C-RAF y p-p38, y disminuidos los niveles de p-AKT.....	121
5.2. La autofagia está presente en el oído interno del ratón durante el desarrollo y en el adulto y su acción se localiza en las neuronas del ganglio espiral.....	122
5.3. El déficit de <i>C-Raf</i> provoca sordera neurosensorial profunda e incrementa la susceptibilidad al daño inducido por ruido.....	126
5.3.1. Los ratones nulos <i>C-Raf</i> presentan sordera neurosensorial profunda bilateral.....	127
5.3.2. Los ratones heterocigotos <i>C-Raf</i> presentan una mayor susceptibilidad al ruido y presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas	130
6. CONCLUSIONES	133
7. BIBLIOGRAFÍA	137
8. ANEXOS	155
8.1. ANEXO I: <i>C-Raf</i> deficiency leads to hearing loss and increased noise susceptibility.....	157
8.2. ANEXO II: Age-regulated function of autophagy in the mouse inner ear.....	175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del desarrollo del oído interno en mamíferos.....	16
Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de autofagia	19
Figura 3. Representación esquemática de los estadios de la autofagia	21
Figura 4. Estructura del oído interno de mamíferos.....	24
Figura 5. Citoarquitectura de la cóclea	26
Figura 6. Principales características del fenotipo neural y coclear del ratón nulo <i>Igf1</i>	37
Figura 7. Mecanismos de señalización del IGF-1	39
Figura 8. Estructura conservada de la familia de las RAF quinasas	44
Figura 9. Análisis del genotipo de ratones <i>Igf1</i> y <i>C-Raf</i>	53
Figura 10. La expresión de los genes <i>A-Raf</i> y <i>C-Raf</i> aumenta en los animales nulos para <i>Igf1</i>	74
Figura 11. Modulación de la actividad de las quinasas AKT, p38 y JNK del ratón nulo para <i>Igf1</i>	77
Figura 12. Expresión de genes autofágicos en la cóclea del ratón nulo para <i>Igf1</i>	83
Figura 13. Heterogeneidad de la expresión de genes autofágicos en la cóclea del ratón P270 nulo para <i>Igf1</i>	84
Figura 14. Las cócleas de ratones de edades avanzadas presentan mayores niveles de expresión de <i>Cox2</i>	85
Figura 15. Los genes de la maquinaria autofágica <i>Becn1</i> , <i>Atg4b</i> y <i>Atg5</i> se expresan en el vestíbulo y el cerebro de ratones <i>Igf1</i> ^{+/+} e <i>Igf1</i> ^{-/-}	88
Figura 16. El flujo autofágico está modulado con la edad en el oído interno del ratón.....	90
Figura 17. La autofagia está activa en las neuronas del ganglio espiral del ratón	92

Figura 18. Las RAF quinasas se expresan en el oído interno de ratón en desarrollo y postnatal	95
Figura 19. Los ratones nulos para <i>C-Raf</i> presentan sordera neurosensorial profunda	97
Figura 20. Los ratones heterocigotos para <i>C-Raf</i> presentan alteraciones en la transmisión del estímulo a lo largo de la vía auditiva central	99
Figura 21. Los ratones nulos para <i>C-Raf</i> presentan una morfología normal de los oídos medio e interno	101
Figura 22. Citoarquitecturas coclear y vestibular de los ratones nulos para <i>C-Raf</i> no presentan alteraciones	104
Figura 23. La expresión del canal de potasio Kir4.1 disminuye en los ratones nulos para <i>C-Raf</i>	106
Figura 24. El análisis del perfil molecular de la cóclea de ratones nulos para <i>C-Raf</i> E18,5 muestra un aumento en la expresión de <i>FoxG1</i>	108
Figura 25. Los ratones heterocigotos para <i>C-Raf</i> presentan una mayor susceptibilidad al daño inducido por ruido	111
Figura 26. Los ratones heterocigotos para <i>C-Raf</i> expuestos a ruido presentan alteraciones graves en la citoarquitectura coclear	113
Figura 27. Los ratones heterocigotos para <i>C-Raf</i> expuestos a ruido presentan alteraciones específicas en la expresión de marcadores celulares.....	114
Figura 28. Los ratones heterocigotos para <i>C-Raf</i> expuestos a ruido presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas.....	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica y <i>Western blotting</i>	61
Tabla 2. Sondas TaqMan.....	66
Tabla 3. Patrón temporal de la expresión de los genes del sistema IGF.....	72
Tabla 4A. Genes de la maquinaria autofágica	79
Tabla 4B. Genes de la red reguladora de la autofagia.....	80
Tabla 5. Niveles de expresión de genes cocleares en ratones E18,5.....	109

RESUMEN

El factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) pertenece a la familia de polipéptidos de la insulina, que desempeñan un papel fundamental en el desarrollo embrionario y la homeostasis del sistema nervioso adulto, así como, en procesos celulares como proliferación, supervivencia, migración celular y diferenciación. El IGF-1 es fundamental en la regulación del crecimiento y la diferenciación coclear, y sus mutaciones están asociadas con pérdida auditiva en el ratón y en el hombre. Las acciones del IGF-1 están mediadas por rutas de señalización intracelular entre las que se encuentra la vía RAF-MEK-ERK. La familia de las RAF quinasas transmite información extracelular al núcleo y su activación es crucial para la regulación celular a varios niveles, que van desde el desarrollo embrionario hasta la carcinogénesis. Se ha descrito que B-RAF y C-RAF modulan la neurogénesis y la neuritogénesis durante el desarrollo del oído interno de pollo. Además, el déficit de C-RAF está asociado a sordera neurosensorial en los síndromes de Noonan y Leopard. Varios estudios han relacionado al IGF-1 con la autofagia en distintos contextos celulares. La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado esencial para el desarrollo embrionario y la homeostasis del adulto. El mecanismo de autofagia provee energía reciclando componentes intracelulares y facilita la eliminación de células apoptóticas. Se ha descrito que, en el oído interno, la autofagia desempeña un papel importante durante el desarrollo temprano del embrión de pollo y en respuesta a lesiones óticas en el ratón adulto. Sin embargo, no existen estudios sobre la expresión de la maquinaria autofágica en el oído interno postnatal y adulto.

En este trabajo se han estudiado los mecanismos moleculares por los que el IGF-1 regula el desarrollo y la maduración coclear, mediante el análisis de los componentes del sistema IGF y de los principales elementos de su señalización intracelular. Se ha demostrado que el déficit de *Igf1* se compensa al nivel de su receptor *Igf1R* y al nivel del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 2 (*Igf2*) en edades adultas. Además, el déficit de *Igf1* está asociado con un aumento en la expresión de A-RAF y C-RAF en edades postnatales y modifica los niveles de expresión de las quinasas AKT y p38. Asimismo, se ha estudiado si la autofagia podría ser uno de los procesos involucrados en el desarrollo coclear y su maduración funcional. Se ha demostrado que los genes relacionados con la autofagia (ATG) *Becn1*, *Atg4b* y *Atg5* se

expresan en la cóclea, vestíbulo y los núcleos cocleares de ratón, desde las últimas etapas del desarrollo hasta la edad adulta y, posteriormente, disminuye su expresión al año de edad. También se ha confirmado la presencia de flujo autofágico puesto que se observan niveles reducidos de la proteína de unión a ubiquitina secuestradora 1 (SQSTM1p62) y un aumento en los niveles relativos de la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3-II (LC3-II). El flujo autofágico en etapas perinatales es inferior al del ratón adulto. A los dos meses de edad, se llega a una meseta de expresión, coincidiendo con el momento en el que se alcanza la actividad funcional completa de la cóclea. Además, se ha demostrado que la autofagia se asocia sobre todo a las neuronas del ganglio espiral. En paralelo, se han realizado análisis de la expresión génica de la maquinaria autofágica en animales nulos para *Igf1* y no se han encontrado diferencias significativas respecto a los silvestres. Por último, se ha estudiado el papel que juega en la fisiopatología de la sordera C-RAF, uno de los componentes centrales de la vía RAF-MEK-ERK activada por el IGF-1. Para ello, se han utilizado animales silvestres, heterocigotos y nulos para *C-Raf*. Se ha demostrado que las RAF quinasas se expresan en el oído interno en desarrollo y en la cóclea adulta de ratón. La delección en homocigosis de *C-Raf* produce sordera neurosensorial profunda. Sin embargo, no se han observado alteraciones celulares evidentes excepto una reducción notable en la expresión del canal de potasio Kir4.1, circunstancia suficiente como causa de sordera. También se ha estudiado la función de *C-Raf* en la protección y reparación celular exponiendo ratones heterocigotos para *C-Raf* a ruido. Se ha observado que niveles reducidos de C-RAF afectan negativamente a la preservación de la audición en respuesta a ruido a través de mecanismos que implican la activación de JNK y una respuesta apoptótica exacerbada.

Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que el IGF-1 y C-RAF tienen un papel clave en el correcto desarrollo y funcionamiento de la cóclea de ratones, así como, un papel fundamental en la protección auditiva. Además, la maquinaria autofágica está activa en el oído interno, se regula con la edad, y no se ve comprometida por la ausencia crónica del IGF-1.

ABREVIATURAS

14-3-3 Proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa

A

aa	Aminoácidos
ABR	Auditory brainstem response (En castellano: potenciales evocados del tronco cerebral; PEATC)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AKT	Proteína quinasa B
p-AKT	Proteína quinasa B fosforilada
<i>Akt1</i>	Gen que codifica para la AKT1
<i>Akt2</i>	Gen que codifica para la AKT2
<i>Ambra1</i>	Regulador de la autofagia/Beclina-1 1
AP-1	Proteína activadora 1
ANOVA	Análisis de la varianza
<i>A-Raf</i>	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , isoforma A
A-RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , isoforma A
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	Ácido ribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
<i>Atg</i>	Gen asociado a la autofagia
ATG	Gen asociado a la autofagia
<i>Atg3</i>	Gen asociado a la autofagia 3
ATG3	Gen asociado a la autofagia 3
<i>Atg4</i>	Gen asociado a la autofagia 4
ATG4	Gen asociado a la autofagia 4
<i>Atg5</i>	Gen asociado a la autofagia 5
ATG5	Gen asociado a la autofagia 5
<i>Atg6</i>	Gen asociado a la autofagia 6

<i>Atg7</i>	Gen asociado a la autofagia 7
ATG7	Gen asociado a la autofagia 7
<i>Atg9</i>	Gen asociado a la autofagia 9
ATG9	Gen asociado a la autofagia 9
ATG10	Gen asociado a la autofagia 10
ATG12	Gen asociado a la autofagia 12
<i>Atg16L1</i>	Gen asociado a la autofagia 16
ATG16L1	Cadena ligera 1 del gen asociado a la autofagia 16
ATP	Adenosín trifosfato
B	
BAD	Promotor de muerte asociado a B-XL/Bcl2
BECN1	Beclina1
<i>Becn1</i>	Beclina1
<i>B-Raf</i>	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , isoforma B
B-RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> , isoforma B
BSA	Albúmina de suero bovino
C	
CB	Células basales
CC	Conducto coclear
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Células ciliadas internas
Cd	Caudal
CE	Cresta epitelial
Chp	Anticuerpo policlonal de pollo
CI	Células intermedias
CM	Células marginales
Co	Cóclea
<i>Cox2</i>	Citocromo c oxidasa, subunidad 2
CP	Células pilares
<i>Cp</i>	Celuloplasmina
CR1	Región conservada 1
CR2	Región conservada 2

CR3	Región conservada 3
<i>C-Raf</i>	<u>R</u> apidly <u>a</u> ccelerated <u>f</u> ibrosarcoma, isoforma C
C-RAF	<u>R</u> apidly <u>a</u> ccelerated <u>f</u> ibrosarcoma, isoforma C
<i>C-Raf</i> ^{+/+}	Ratón con genotipo silvestre
<i>C-Raf</i> ^{+/-}	Ratón heterocigoto para el gen <i>C-Raf</i>
<i>C-Raf</i> ^{-/-}	Ratón nulo para el gen <i>C-Raf</i>
D	
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
dB	Decibelio
dB SPL	Decibelio del nivel de presión sonora (<i>sound pressure level</i>)
DE	Genes diferencialmente expresados
<i>Dlx</i>	Factor de transcripción de tipo <i>distal-less homeobox</i>
Do	Dorsal
E	
E	Estadio embrionario
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EM	Escala media
ENNI	Servicio de evaluación neurosensorial no invasiva
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
p-ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares fosforilada
ET	Escala timpánica
EV	Escala vestibular
F	
FC	<i>Fold Change</i>
FFA	Ácido graso libre
FGF	Factores de crecimiento de fibroblastos
FOX	Factores de transcripción de tipo <i>forkhead box</i>
<i>FoxG1</i>	Factor de transcripción de tipo <i>forkhead box G1</i>
<i>FoxI1</i>	Factor de transcripción de tipo <i>forkhead box I1</i>
<i>FoxM1</i>	Factor de transcripción de tipo <i>forkhead box M1</i>

G

GABARAP 11	Proteína asociada al receptor de ácido gamma-amino butírico tipo A 11
GABARAP12	Proteína asociada al receptor de ácido gamma-amino butírico tipo A 12
<i>Gap43</i>	Proteína asociada al crecimiento 43
<i>Gata</i>	Factor de transcripción de tipo GATA
GAV	Ganglio acústico vestibular
GE	Ganglio espiral
GF	Factor de crecimiento
GLAST	Neurotransportador para el glutamato tipo GLAST
<i>Gmfb</i>	Factor de maduración glial beta
GP	Anticuerpo policlonal de cabra
<i>Gpx1</i>	Glutation peroxidasa
GRB2	Proteína ligadora del receptor del factor de crecimiento 2
GTP	Guanosín trifosfato

H

HRP	Peroxidasa de rábano
-----	----------------------

I

<i>Igf1</i>	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
<i>Igf1</i> ^{+/+}	Ratón con genotipo silvestre
<i>Igf1</i> ^{+/-}	Ratón heterocigoto para el gen <i>Igf1</i>
<i>Igf1</i> ^{-/-}	Ratón nulo para el gen <i>Igf1</i>
<i>Igf2</i>	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2
IGF-2	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2
<i>Igf1r</i>	Receptor de alta afinidad del IGF-1
IGF1R	Receptor de alta afinidad del IGF-1
IGF2R	Receptor tipo manosa 6 fosfato del IGF-2
IGFBP	Proteínas de unión a IGF-1
<i>Igfbp2</i>	Proteína de unión a IGF-1 tipo 2
<i>Igfbp3</i>	Proteína de unión a IGF-1 tipo 3

IHC	Inmunohistoquímica
Il1 β	Interleukina 1 beta
Il6	Interleukina 6
Il10	Interleukina 10
<i>Ins2</i>	Insulina tipo 2
IR	Receptor de la insulina
IRS	Proteínas adaptadoras de la familia de los sustratos para el receptor de la insulina
J	
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
p-JNK	Quinasa c-Jun N-terminal fosforilada
K	
<i>KCNE1</i>	Canal de potasio activado por voltaje, subfamilia Isk, miembro 1
<i>Kcnq1</i>	Canal de potasio activado por voltaje, subfamilia Q, miembro 1
<i>KCNQ4</i>	Canal de potasio activado por voltaje, subfamilia Q, miembro 4
Kir4.1	Canal rectificador de potasio, subfamilia J, miembro 10
L	
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada a microtúbulo
LC3B	Isoforma B de la cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada a microtúbulo
LC3-I	Forma citosólica de la cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada a microtúbulo
LC3-II	Cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada a microtúbulo unida a la membrana del autofagosoma
LE	Ligamento espiral
LM	Mielina difusa interna

M

MANOVA	Análisis de la varianza multivariante de tres vías
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<i>Mapk14</i>	Proteína quinasa activada por mitógeno 14
<i>Mash1</i>	Factor de transcripción “ <i>achaete-scute family bHLH 1</i> ”
MEF2	Factor potenciador 2 de miocitos
<i>Mef2D</i>	Factor potenciador 2 de miocitos D
MEK	Proteína quinasa activada por mitógenos
p-MEK	Proteína quinasa activada por mitógenos fosforilada
MH2	Retrovirus Mill Hill 2 de aves
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
MouM	Anticuerpo monoclonal de ratón
MSV	Sarcoma de virus de ratón
mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos
<i>MyePo</i>	Mielina P0
MyoVIIa	Miosina VIIa

N

NC VIII	VIII nervio craneal
ND	No detectado
<i>Ndp52</i>	<i>Calcium binding and coiled-coil domain 2</i>
<i>NeuN</i>	<i>RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 3</i>
NF	Neurofilamento
NGS	Suero normal de cabra
NIHL	Pérdida de audición inducida por ruido
<i>Ntn1</i>	Netrina 1

O

OC	Órgano de Corti
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud

P

P	Estadio postnatal
---	-------------------

P21	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A
P27 ^{kip}	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1B
p38	Proteína quinasa activada por mitógenos 14
p-p38	Proteína quinasa activada por mitógenos 14 fosforilada
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
f-PARP	Poli ADP ribosa polimerasa fragmentada
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Potencial endococlear
Phal	Faloidina
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidinositol 3 quinasa
PIP3	Fosfatidinositol 3 fosfato
<i>Pmca2</i>	Transportador ATPasa de calcio de la membrana plasmática tipo 2
<i>PON1</i>	Paraoxonasa 1
<i>PON2</i>	Paraoxonasa 2
PPLR	Probabilidad de cociente de registro positivo
PUMA	Programa informático “ <i>Propagating Uncertainty in Microarray Anaysis</i> ”

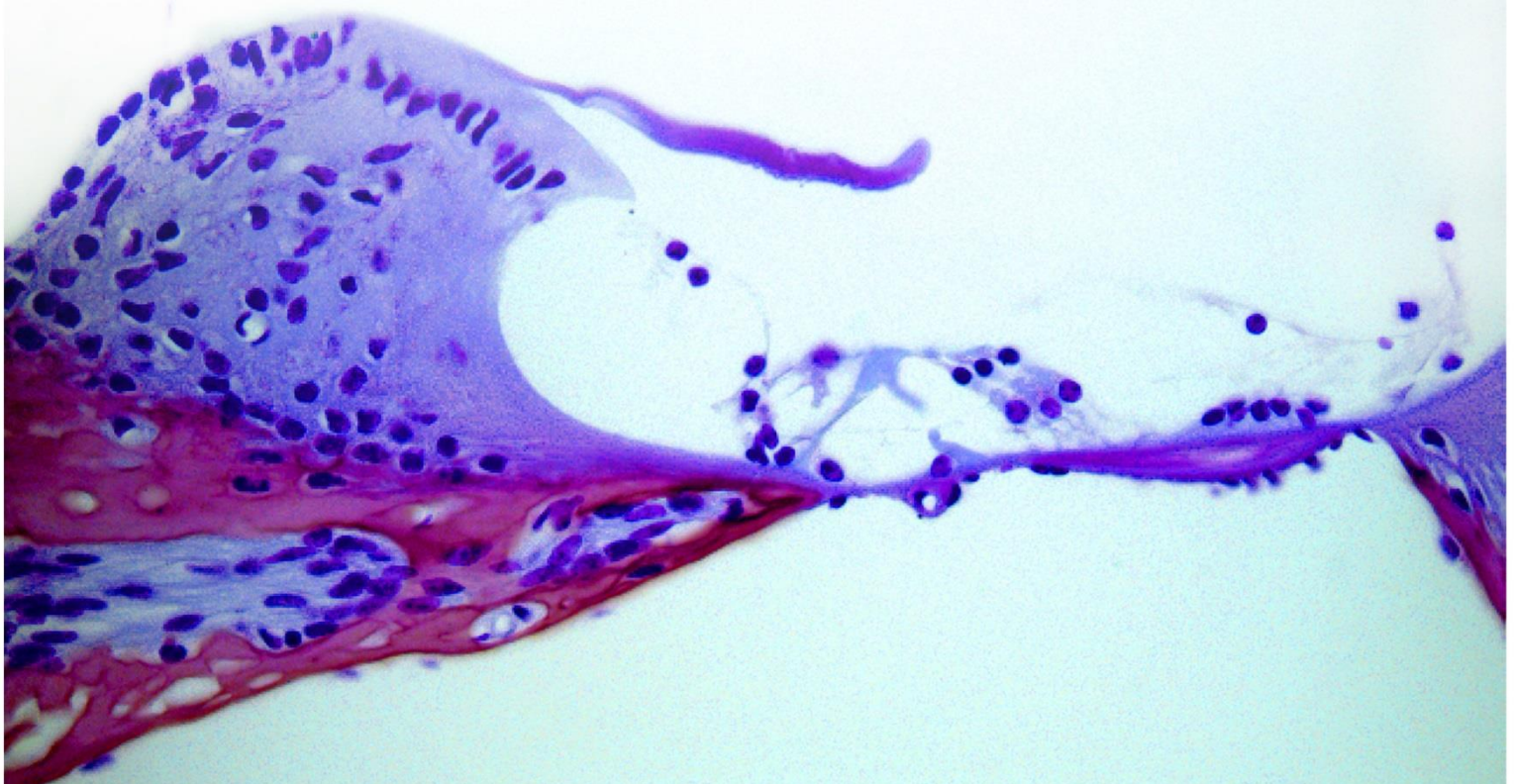
R

RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RbM	Anticuerpo monoclonal de conejo
RbP	Anticuerpo policlonal de conejo
RMA	Programa informático “ <i>Robust Multiarray Average</i> ”
ROI	Región de interés
<i>Rplp0</i>	Proteína ribosomal grande P0
Rpm	Revoluciones por minuto
RQ	Valores de cuantificación relativa de la expresión génica
RT	Transcripción inversa

RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa en tiempo real
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Desviación media estándar
SG-TI	Neuronas tipo I
SQSTM/p62	Proteína de unión a ubiquitina secuestrosoma 1
<i>Sod1</i>	Superóxido dismutasa 1
SOS	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina RAS/RAC
<i>SOD2</i>	Superóxido dismutasa 2
<i>Sox2</i>	Factor de transcripción SRY (región determinante del sexo en el cromosoma Y) tipo 2
SOX2	Factor de transcripción SRY (región determinante del sexo en el cromosoma Y) tipo 2
<i>Sox9a</i>	Factor de transcripción SRY (región determinante del sexo en el cromosoma Y) tipo 9a
SPSS	Programa informático “ <i>Software Package Sigmastat-Sigmaplot</i> ”
StV	Estría vascular
SYN	Sinaptofisina
T	
TBS	Tampón tris salino
TBP	Agente reductor tributilfosfina
<i>Tfap</i>	Factor de transcripción AP
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
<i>Tgf b1</i>	Factor de crecimiento transformante beta 1
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
<i>Tgf bR1</i>	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
<i>Tgf b2</i>	Factor de crecimiento transformante beta 2
<i>Tgf bR2</i>	Receptor 2 del factor de crecimiento transformante beta
TLR	<i>Toll-like receptor</i>

<i>Tlr1</i>	<i>Toll-like receptor 1</i>
TLR1	<i>Toll-like receptor 1</i>
<i>Tlr6</i>	<i>Toll-like receptor 6</i>
TLR6	<i>Toll-like receptor 6</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TUNEL	<i>Terminal Transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labelling</i>
U	
<i>Ulk1</i>	Complejo quinasa 1 similar a Unc 51
ULK1	Complejo quinasa 1 similar a Unc 51
V	
V	Vestíbulo
VASP	Fosfoporteína estimulada por vasodilatadores
VO	Vesícula ótica
Vo	Ventana oval
Vr	Ventana redonda
W	
WB	<i>Western blotting</i>

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. El oído interno de mamíferos

El oído interno de mamíferos es un sistema sensorial estructuralmente complejo formado por los órganos responsables de la audición y el equilibrio, denominados cóclea y vestíbulo respectivamente. Está constituido por una estructura epitelial cerrada denominada laberinto membranoso donde se encuentran diversas estructuras sensoriales y no sensoriales bañadas en un fluido denominado endolinfa. El laberinto membranoso se compone del laberinto vestibular y el conducto coclear. El laberinto vestibular constituye el órgano receptor para el sentido del equilibrio y el conducto coclear está formado por el órgano de Corti (OC), que es el órgano sensorial de la audición propiamente dicho. El laberinto membranoso, a su vez, se encuentra rodeado por el laberinto óseo o cápsula ósea, estructura que se encuentra excavada en la porción petrosa del hueso temporal (Magariños *et al.*, 2014).

1.1.1. Desarrollo embrionario del oído interno de mamíferos

Las células que constituyen el oído interno adulto proceden en su mayoría de la placoda ótica embrionaria con la excepción de los melanocitos de la estría vascular y las células de Schwann que proceden de la cresta neural (Fritsch *et al.*, 2011, Rubel y Fritsch, 2002). El desarrollo del oído interno comienza en el día embrionario 7,5 (E7,5) con la especificación de la placoda ótica en la región dorsal del ectodermo romboencefálico (**Figura 1a**), localizada entre los rombómeros 5 y 6. Las placodas craneales son regiones del ectodermo que generan una gran variedad de tipos celulares, incluyendo elementos de los órganos de los sentidos y la mayoría de las neuronas sensoriales del sistema nervioso craneal. Las distintas placodas derivan de una región preplacodal común, que rodea la placa neural (Streit, 2007). La inducción de la placoda ótica necesita señales procedentes de los tejidos circundantes como algunos miembros de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), así como, la expresión de ciertos factores de transcripción procedentes de la región preplacodal (*Dlx*, *Sox9a*, *Gata*, *Tfap* y *Foxi1*) (Whitfield, 2015). Posteriormente a la inducción, en los días embrionarios 8 y 9 (E8-9), la placoda se engrosa e invagina hasta formar la copa ótica (**Figura 1b**), que se separa del ectodermo y se cierra para originar la vesícula ótica u otocisto (VO) durante el día embrionario 9,5 (E9,5) (**Figura 1c, d**).

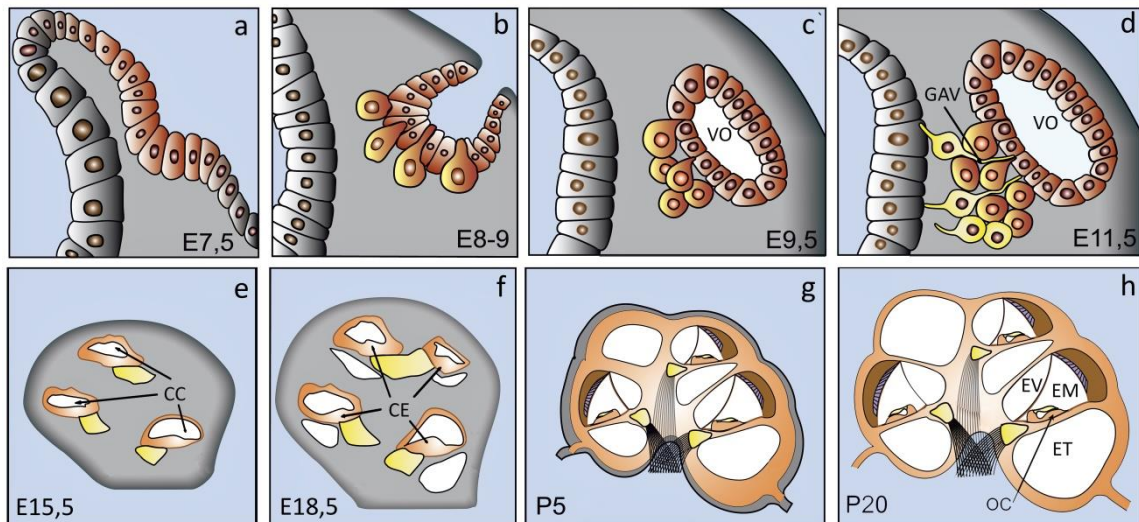


Figura 1. Esquema del desarrollo del oído interno en mamíferos. El oído interno en mamíferos se origina a partir de la placoda ótica (a, E7,5), un engrosamiento del ectodermo cefálico que se invagina para formar la copa ótica (b, E8-9). Posteriormente, la copa se cierra y da lugar a la vesícula ótica (c, d), que experimenta un periodo de intensa proliferación celular, morfogénesis y diferenciación celular para transformarse en lo que conocemos como laberinto membranoso. Las células mesenquimales adyacentes se diferencian dando lugar al laberinto óseo (e-h). Los precursores neuronales migran del epitelio ventral para formar el GAV (b-d). La coordinación de estos procesos es necesaria para generar los distintos tipos celulares y estructuras que constituyen el oído interno adulto (g, h). Figura adaptada de Magariños *et al.*, 2014. Abreviaturas: CC, conducto coclear; CE, crestas epiteliales; E, día embrionario; EV, escala vestibular; EM, escala media; ET, escala timpánica; GAV, ganglio acústico vestibular; OC, órgano de Corti; VO, vesícula ótica.

Durante el desarrollo posterior, la VO experimenta un periodo de gran proliferación celular, acompañado de cambios morfológicos complejos y diferenciación celular que dará lugar a la mayoría de los tipos celulares del oído interno adulto, que incluyen neuronas, células ciliadas sensoriales y células de sostén (Magarinos *et al.*, 2012). Los neuroblastos que van a formar el ganglio acústico-vestibular (GAV) migran de la pared medial de la VO y se diferencian en neuronas que inervarán los parches sensoriales (Magariños *et al.*, 2014) (**Figura 1b-d**). Las estructuras vestibulares se desarrollarán a partir de la región dorsal de la VO, mientras que el epitelio ventral formará la parte auditiva del oído interno. De un parche pro-sensorial de la región ventromedial de la VO se forma el conducto coclear (CC). El CC experimenta una serie de cambios morfológicos y procesos de diferenciación para transformar el epitelio simple de la VO y dar lugar al laberinto membranoso o escala media (EM) de la cóclea formado por el OC (**Figura 1, e-h**) (Kelly y Chen, 2009). Entre los estadios E15,5 y E18,5 las células se reorganizan para formar las crestas epiteliales (CE) (**Figura 1, e-f**),

que posteriormente se desarrollarán para formar algunas de las estructuras presentes en la escala media: el limbo espiral, las células ciliadas internas (CCI), células ciliadas externas (CCE) y las células de soporte (Magariños *et al.*, 2014). Además, en etapas postnatales se produce una remodelación anatómica de la cóclea que conduce a la apertura del túnel de Corti y, casi al mismo tiempo, la membrana tectoria se desprende de las superficies apicales de las células ciliadas y de soporte y se desarrolla la membrana basilar (Walters y Zuo, 2013). Paralelamente a la formación del órgano de Corti, las células mesenquimales adyacentes forman una cápsula cartilaginosa que, posteriormente, formará el laberinto óseo formado por la escala vestibular (EV) y timpánica (ET) (**Figura 1, e-h**) (Magariños *et al.*, 2014).

El correcto desarrollo embrionario del oído interno de vertebrados requiere de la coordinación de distintos procesos como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la apoptosis y la senescencia. Para que se produzca la organogénesis del oído interno es necesario un control estricto de la proliferación y de la salida del ciclo celular, así como, de la diferenciación de los precursores óticos en los distintos tipos de células que formarán el oído adulto (Alsina *et al.*, 2009). Se ha descrito en pollo que la apoptosis también desempeña un papel fundamental en la morfogénesis del epitelio ótico y en la neurogénesis del GAV, puesto que contribuye a la determinación del número final de células y elimina las células defectuosas (Leon *et al.*, 2004, Aburto *et al.*, 2012b). Además, recientemente se ha descrito la implicación de la senescencia en el desarrollo embrionario del saco endolinfático, un saco ciego cuya función en el adulto es recoger y filtrar la endolinfa de los conductos coclear y vestibular. La senescencia es un proceso fisiológico que durante el desarrollo es estrictamente dependiente del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A (p21) y promueve la remodelación tisular del saco endolinfático determinando el equilibrio entre las distintas poblaciones celulares (Munoz-Espin *et al.*, 2013).

Se han descrito varios factores implicados en estos procesos, como el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) que está implicado en la regulación del ciclo celular de los progenitores óticos y en la supervivencia de las células óticas (Magariños *et al.*, 2014). Además, se ha publicado que la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), que está directamente regulada por Notch, tiene un papel fundamental para la diferenciación del epitelio auditivo sensorial, formado por las

células ciliadas y de soporte (Nakajima, 2015). También hay muchos factores de transcripción implicados en la histogénesis del oído interno como es el factor de transcripción de tipo *forkhead box G1* (*Foxg1*), que regula la proliferación y la especificación del destino celular. Concretamente, *Foxg1* determina la formación y el tamaño de los parches sensoriales, la organización de las células ciliadas y la formación y orientación de las neuronas del GAV, y los ratones nulos presentan el laberinto membranoso más corto, un mayor número de filas de células ciliadas e inervación anormal (Pauley *et al.*, 2006).

En los últimos años la autofagia se ha unido a estos programas celulares bien conocidos de proliferación, supervivencia, apoptosis y diferenciación.

1.1.2. La autofagia en el oído interno de mamíferos

La autofagia es una vía lisosomal de degradación altamente conservada en eucariotas que fue descrita por primera vez por Clark y Novikoff a finales de la década de los 50 cuando observaron en riñones de ratón estructuras en forma de vesícula que contenían materiales citoplasmáticos (Clark, 1957). Este proceso se encarga de suministrar energía metabólica, del reciclaje de componentes intracelulares y de la eliminación de moléculas y orgánulos perjudiciales. La autofagia protege a la célula del estrés tanto fisiológico como patológico y desempeña un papel fundamental durante el desarrollo como mecanismo de muerte, supervivencia y mantenimiento de la homeostasis celular. Debido a la importancia de su papel fisiológico, la desregulación o el incorrecto funcionamiento de la autofagia ha sido relacionada con el envejecimiento, la progresión de enfermedades neurodegenerativas y con el cáncer (Lopez-Otin *et al.*, 2013, Schneider y Cuervo, 2014).

Existen tres formas principales de autofagia: la autofagia mediada por chaperonas, que degrada proteínas diana específicas mediante el complejo chaperona-proteína; la microautofagia, que implica la degradación de material citoplasmático directamente invaginado por el lisosoma; y la macroautofagia, que es el tipo de autofagia que se estudiará en este trabajo y que a partir de ahora se denominará autofagia (Aburto *et al.*, 2012b) (**Figura 2**). También se han descrito la mitofagia y peroxifagia, formas de autofagia selectiva en las que se degradan de forma específica mitocondrias y

peroxisomas, respectivamente, dañados o innecesarios (Feng *et al.*, 2014, Parzych y Klionsky, 2014, Wirawan *et al.*, 2012).

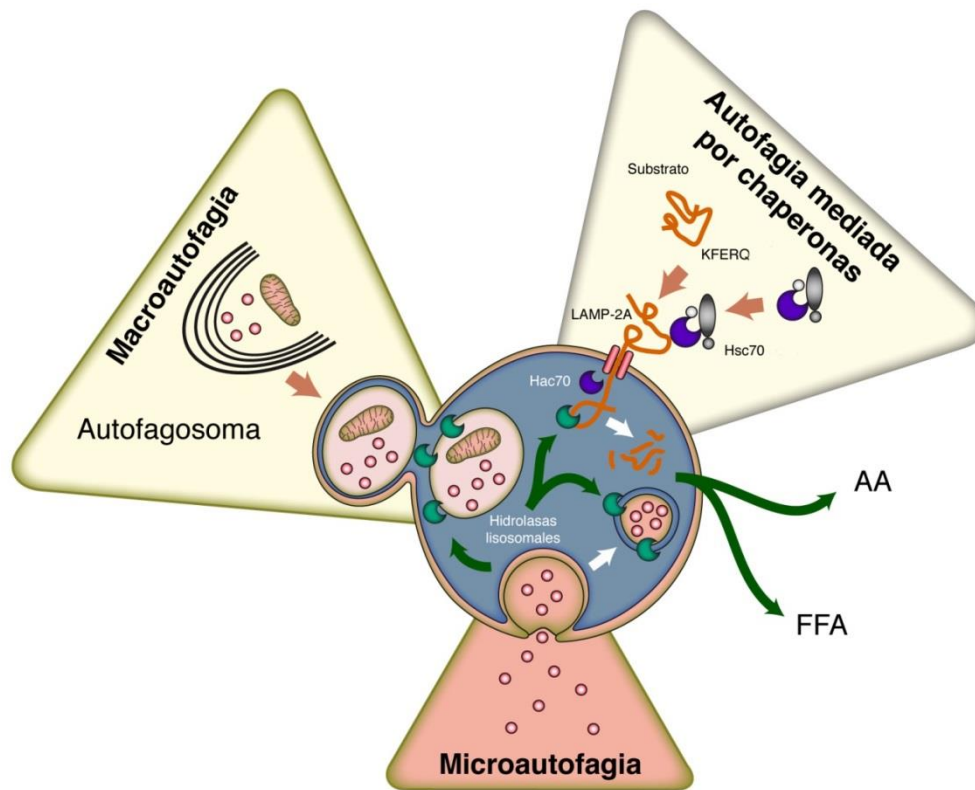


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de autofagia. La autofagia mediada por chaperonas degrada proteínas diana específicas con motivos KFERQ mediante el complejo HSC70 chaperona-proteína que se transloca directamente al lumen del lisosoma mediante el receptor denominado LAMP-2A para su degradación. Durante la microautofagia la membrana del lisosoma se invagina para envolver las porciones del citoplasma que van a ser degradados. La macroautofagia requiere la formación de unas vacuolas especializadas de doble membrana denominada autofagosoma, su fusión con un lisosoma dará lugar al autofagolisosoma dentro del cual se degrada la carga citoplasmática mediante enzimas hidrolíticas. Abreviaturas: AA, aminoácidos y FFA, ácidos grasos libres. Figura adaptada de Wirawan *et al.*, 2012.

1.1.2.1. Regulación y etapas de la autofagia

La autofagia se activa por señales inductoras muy diversas que incluyen la privación de nutrientes, de factores de crecimiento, señales de inflamación, niveles bajos de adenosín trifosfato (ATP), hipoxia o altas concentraciones de calcio (**Figura 3**). El proceso comienza cuando los orgánulos y las proteínas citoplasmáticas son rodeados por una doble membrana lipídica denominada fagóforo, que comienza a crecer

por ambos extremos y finalmente se cierra, encerrando dentro la carga citoplasmática, formando el autofagosoma. Posteriormente, los autofagosomas se transportan por estructuras del citoesqueleto y se fusionan con lisosomas, formando una vesícula llamada autofagolisosoma, en la que el contenido y su membrana se degradan por enzimas hidrolíticas. Los productos de este proceso catabólico son componentes básicos como aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos, y son reciclados para la síntesis de proteínas, macromoléculas y aprovechadas para la generación de ATP (Hurley y Schulman, 2014).

Se han descrito varias etapas en la autofagia: inducción, nucleación o ensamblaje, elongación y formación del autofagosoma, a lo largo de las cuales intervienen de forma coordinada una gran cantidad de proteínas codificadas por genes específicos de este proceso denominados genes asociados a la autofagia (*Atg*). Se han descrito más de 30 genes *Atg* en levaduras y muchos de ellos están conservados evolutivamente en eucariotas superiores (Klionsky *et al.*, 2008, Mizushima y Levine, 2010).

1.1.2.2. Señalización de la autofagia

Durante la inducción del autofagosoma el complejo de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) es inactivado y se disocia del complejo quinasa 1 similar a UNC 51 (ULK1) permitiendo así la activación de éste. Aunque mTOR es considerada una pieza clave en la regulación de la autofagia como regulador negativo también se han descrito vías independientes de mTOR (Sarkar, 2013, Tan *et al.*, 2014). ULK1 activa a su vez a la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) cuando está formando un complejo con Beclina1 (BECN1), el homólogo de *Atg6* en levaduras (**Figura 3**) (Feng *et al.*, 2014).

Durante la nucleación la PI3K genera fosfatidilinositol 3 fosfato (PIP3) y se encarga del reclutamiento de proteínas ATG necesarias en la elongación de la membrana. El sistema cíclico del ATG9 transporta membrana de varias fuentes de donantes durante la formación del autofagosoma. Se han propuesto distintos donadores de membrana como la membrana plasmática, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y la mitocondria (**Figura 3**) (Ohsumi, 2014).

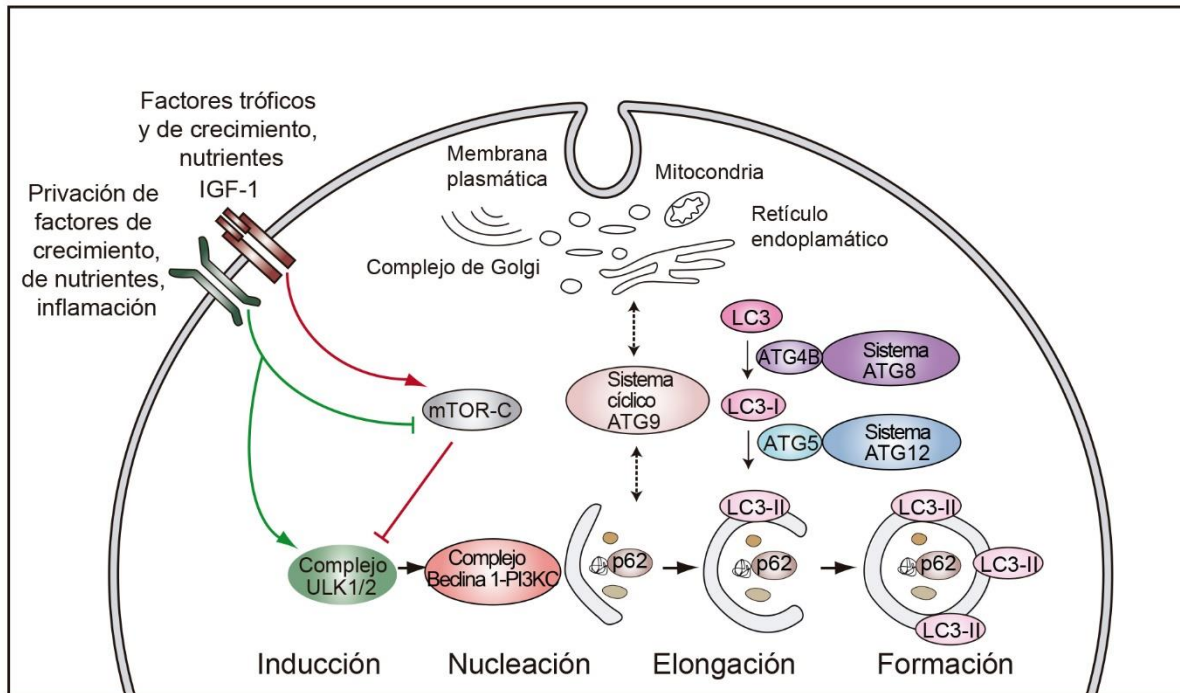


Figura 3. Representación esquemática de los estadios de la autofagia. La privación del factor de crecimiento, la inflamación o la falta de nutrientes son algunas de las señales que regulan la activación de la autofagia. Se activa el complejo ULK1/2 que fosforila y activa al complejo Beclina1-PI3KC3. El sistema cíclico ATG9 proporciona las membranas necesarias procedentes de diferentes donantes para la formación del autofagosoma. La formación del autofagosoma también requiere la acción de dos sistemas de conjugación de ubiquitina, ATG8 y ATG12, para su elongación y formación. La proteína LC3 pasa a ser la forma citosólica LC3-I mediante la acción de ATG4B y posteriormente sufre modificaciones post-traduccionales y genera la forma LC3-II al unirse a la fosfatidiletanolamina mediante la acción de ATG5. La SQTm/p62 (p62) se une a las proteínas ubiquitiniladas y las conduce al autofagosoma, que se fusiona con un lisosoma y da lugar al autofagolisosoma. La carga citoplasmática del autofagolisosoma es degradada y será devuelta al citosol en forma de aminoácidos o ácidos grasos.

Dos sistemas de conjugación de ubiquitina, ATG12 y ATG8, están implicados en la elongación de la membrana del autofagosoma (**Figura 3**). El complejo ATG12 está formado por las proteínas ATG5, ATG7, ATG10, ATG12 y ATG16L1 y el complejo ATG8 por las proteínas ATG3, ATG4/B/C/D, ATG7, ATG10, LC3A/B/B2/c y GABARAP/11/12/GATE-16 (Le Grand *et al.*, 2011). Ambos complejos regulan la cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada a microtúbulo (LC3), el homólogo en mamíferos de *Atg8*. La proteasa ATG4B es responsable de romper el residuo C-terminal de la proteína LC3, generando así la forma citosólica LC3-I. Debido a la acción de las proteínas ATG7, ATG3 y ATG16L1, LC3-I se conjuga con la fosfatidiletanolamina generando la forma LC3-II que se une a la membrana del autofagosoma (**Figura 3**)

(Feng *et al.*, 2014). Los niveles relativos de LC3-II combinados con la degradación lisosomal de substratos autofágicos son un indicador del flujo autofágico. La proteína de unión a ubiquitina secuestrosoma 1 (SQSTM/p62) se une a LC3-I y a los agregados de proteínas ubiquitinadas y facilita su entrada en el autofagosoma (**Figura 3**). Por lo tanto, la degradación de SQSTM/p62 es dependiente de la autofagia y sus niveles correlacionan de forma negativa con los niveles de LC3-II (Bjorkoy *et al.*, 2009, Klionsky *et al.*, 2008, Bjorkoy *et al.*, 2006, Klionsky *et al.*, 2016).

Finalmente, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, conduciendo a la degradación de la carga por las enzimas hidrolíticas (Hurley y Schulman, 2014).

1.1.2.3. Funciones de la autofagia durante el desarrollo embrionario

La autofagia está generalmente considerada como un proceso inespecífico en el que se degradan todo tipo de componentes celulares, pero también puede ser un proceso selectivo para degradar orgánulos dañados o innecesarios, moléculas y patógenos (Reggiori y Ungermann, 2012). Durante el desarrollo embrionario, la autofagia es un proceso catabólico clave altamente regulado por señales hormonales y ambientales. Inmediatamente después del nacimiento, los neonatos se enfrentan a condiciones de ayuno hasta que reciben nutrientes de la leche materna. Se ha descrito que en este período crítico de 3-12 horas después del nacimiento se induce la autofagia en varios tejidos. Ratones deficientes en *Atg3*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg9*, *Atg16L* mueren poco después de nacer a pesar de estar en apariencia sanos. En este contexto, se ha propuesto la autofagia como una fuente de energía, basado en el hecho de que estos mutantes muestran niveles reducidos de aminoácidos en sangre y en tejido adiposo (Aburto *et al.*, 2012b, Kuma *et al.*, 2004). Además, la autofagia contribuye al desarrollo del sistema nervioso en diferentes niveles. Un incorrecto funcionamiento de la autofagia afecta al número de progenitores neuronales y, más adelante en el desarrollo, puede afectar a la capacidad de las poblaciones neuronales para diferenciarse correctamente (Fimia *et al.*, 2007).

Los ratones nulos en *Ambra1*, una proteína altamente expresada en el sistema nervioso y que se une a Beclina1, muestran proliferación excesiva de células neuroepiteliales, un aumento en la apoptosis y un patrón cerebral incorrecto (Fimia *et al.*, 2007). También se ha descrito que la deficiencia de ULK1 causa una formación incorrecta de los axones de las neuronas de la capa granular del cerebelo (Tomoda *et al.*,

1999). Además, se ha descrito que el ortólogo de ULK1 en *Caenorhabditis elegans* y en *Drosophila melanogaster* también está implicado en el correcto desarrollo de axones y neuritas (Mochizuki *et al.*, 2011, Ogura *et al.*, 2010).

La autofagia también está implicada en la diferenciación de linfocitos y eritrocitos durante la hematopoyesis. Ratones quiméricos con células deficientes en *Atg5* y *Atg7* presentaron defectos en la formación de linfocitos B y T, respectivamente (Pua *et al.*, 2007). El estudio de los ratones con células deficientes en *Atg7* también demostró que los eritrocitos dependen de la autofagia para su correcto desarrollo (Mortensen y Simon, 2010). Además, la autofagia suministra la energía necesaria para la supervivencia de los condrocitos y facilita la eliminación de los condrocitos terminales durante la formación del hueso (Srinivas y Shapiro, 2006). También se ha descrito la autofagia como un proceso clave en la adipogénesis y ha sido relacionada con la obesidad (Dong y Czaja, 2011, Meng y Cai, 2011).

Se ha descrito que la autofagia interviene en la formación del GAV y en el correcto desarrollo de la VO de embrión de pollo. Además, provee la energía necesaria para la eliminación de las células apoptóticas y su inhibición causa la desregulación del ciclo celular impidiendo la correcta diferenciación de los progenitores óticos (Aburto *et al.*, 2012b, Magarinos *et al.*, 2010). Los ratones nulos para el gen *Atg4b* presentan patologías relacionadas con el equilibrio, debidas a un defecto en el desarrollo de la otoconia vestibular. Además, ratones deficientes en *Atg5* mueren al poco de nacer y muestran ausencia de otoconia o alteraciones en forma y/o tamaño de esta estructura (Marino *et al.*, 2010).

1.1.3. Estructura y función del oído interno adulto de mamíferos

Anatómicamente el oído adulto de mamíferos se divide en tres partes: oído externo, oído medio y oído interno. El oído externo está formado por el pabellón de la oreja y por el conducto auditivo externo, que a través de la membrana timpánica se comunica con el oído medio. La membrana timpánica es la responsable de transformar las ondas sonoras en vibraciones mecánicas. El oído medio se sitúa en la cavidad timpánica y está formado por una cadena de huesecillos que se denominan martillo, yunque y estribo, que transmiten la vibración mecánica hacia la ventana oval de la cóclea (**Figura 4**).

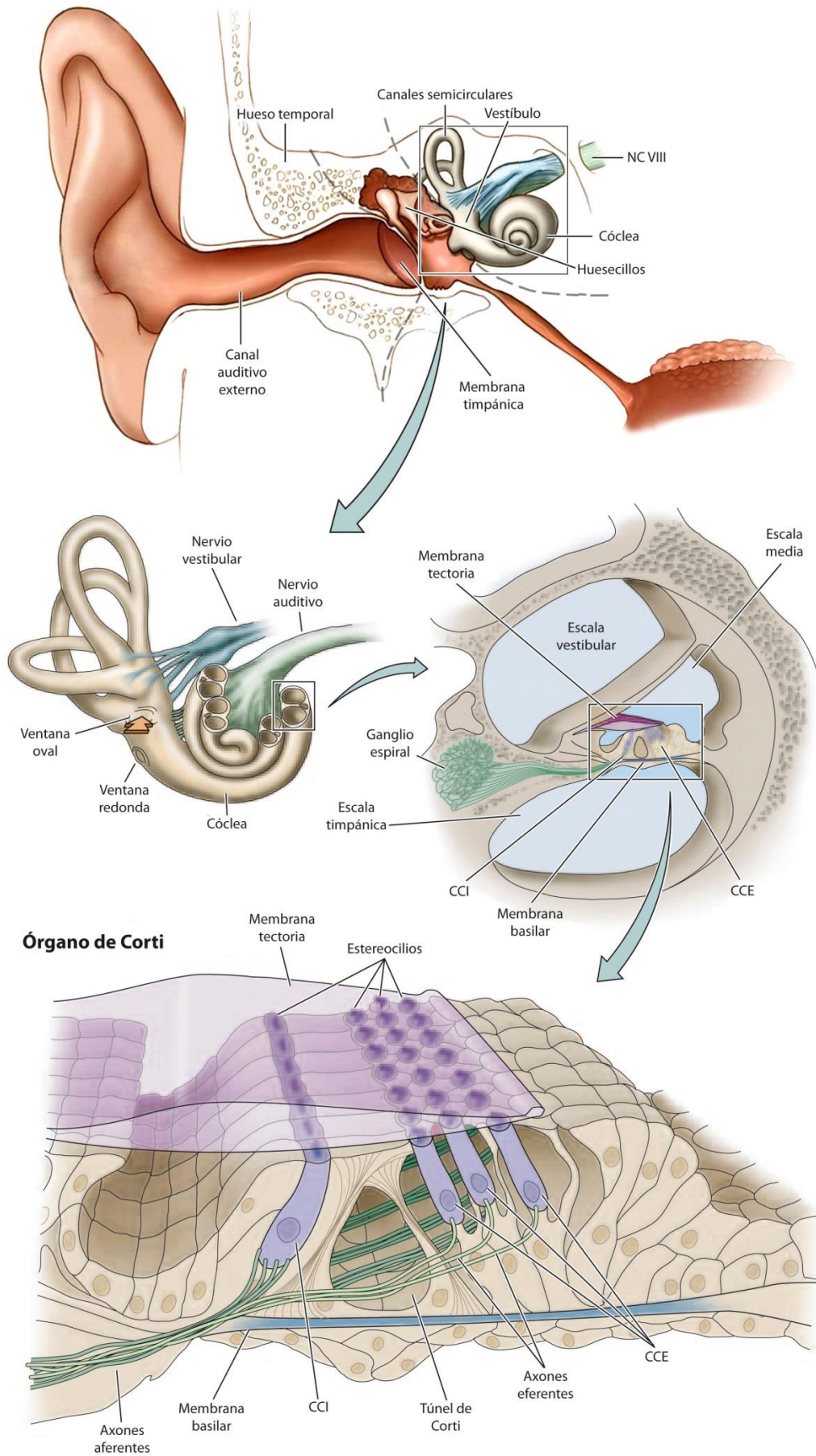


Figura 4. Estructura del oído de mamíferos. Formado por el oído externo que se compone de pabellón auricular y conducto auditivo externo, el oído medio constituido por los huesecillos martillo, yunque y estribo y el oído interno formado por vestíbulo, los canales semicirculares y la cóclea. La sección transversal de la cóclea muestra la escala media situada entre la escala vestibular y timpánica. En la ampliación del órgano de Corti se muestra que las células ciliadas se localizan entre la membrana basilar y la membrana tectoria. Las CCI reciben inputs aferentes, mientras que las CCE reciben en su mayoría inputs eferentes. Abreviaturas: CCE, células ciliadas externas; CCI, células ciliadas internas; NC VIII, VIII nervio craneal. Figura adaptada de (Purves, 2004).

El oído interno está formado por el órgano vestibular, responsable del equilibrio y el órgano auditivo, responsable de la audición (**Figura 5a**). La parte auditiva o coclear (**Figura 5b**) está dividida en tres compartimentos denominados escala vestibular (EV), escala media (EM) y escala timpánica (ET) (**Figura 5c, d**). Las EV y ET contienen un fluido similar al medio extracelular, rico en Na^+ y Ca^{++} y pobre en K^+ , denominado perilinfa. A diferencia de estas escalas, la EM se encuentra la endolinfa, un fluido rico en K^+ y pobre en Na^+ y Ca^{++} , esencial para la transducción del estímulo mecánico en estímulo eléctrico (Magariños *et al.*, 2014). La EV y la ET están separadas entre sí por la membrana de Reissner, compuesta por dos estratos celulares que conforman una membrana avascular. Mientras que la ET y la EM están separadas por la membrana basilar.

La cóclea tiene tres partes funcionales principales: el órgano de Corti (OC), la pared lateral formada por el ligamento espiral (LE) y la estría vascular (StV), y el ganglio espiral (GE) (Magariños *et al.*, 2014) que se describirán a continuación en detalle:

- **Órgano de Corti**

El OC es el receptor sensorial y está constituido por un epitelio altamente especializado formado por células ciliadas sensoriales y células de soporte que descansan sobre la membrana basilar. Las células ciliadas son células mecanorreceptoras donde se produce la transformación de la señal mecánica en la señal eléctrica que se interpretará en los centros auditivos del cerebro (Gillespie y Muller, 2009). El órgano de Corti presenta una única fila de células ciliadas internas (CCI), separada de tres filas de células ciliadas externas (CCE) (**Figura 5e, f**).

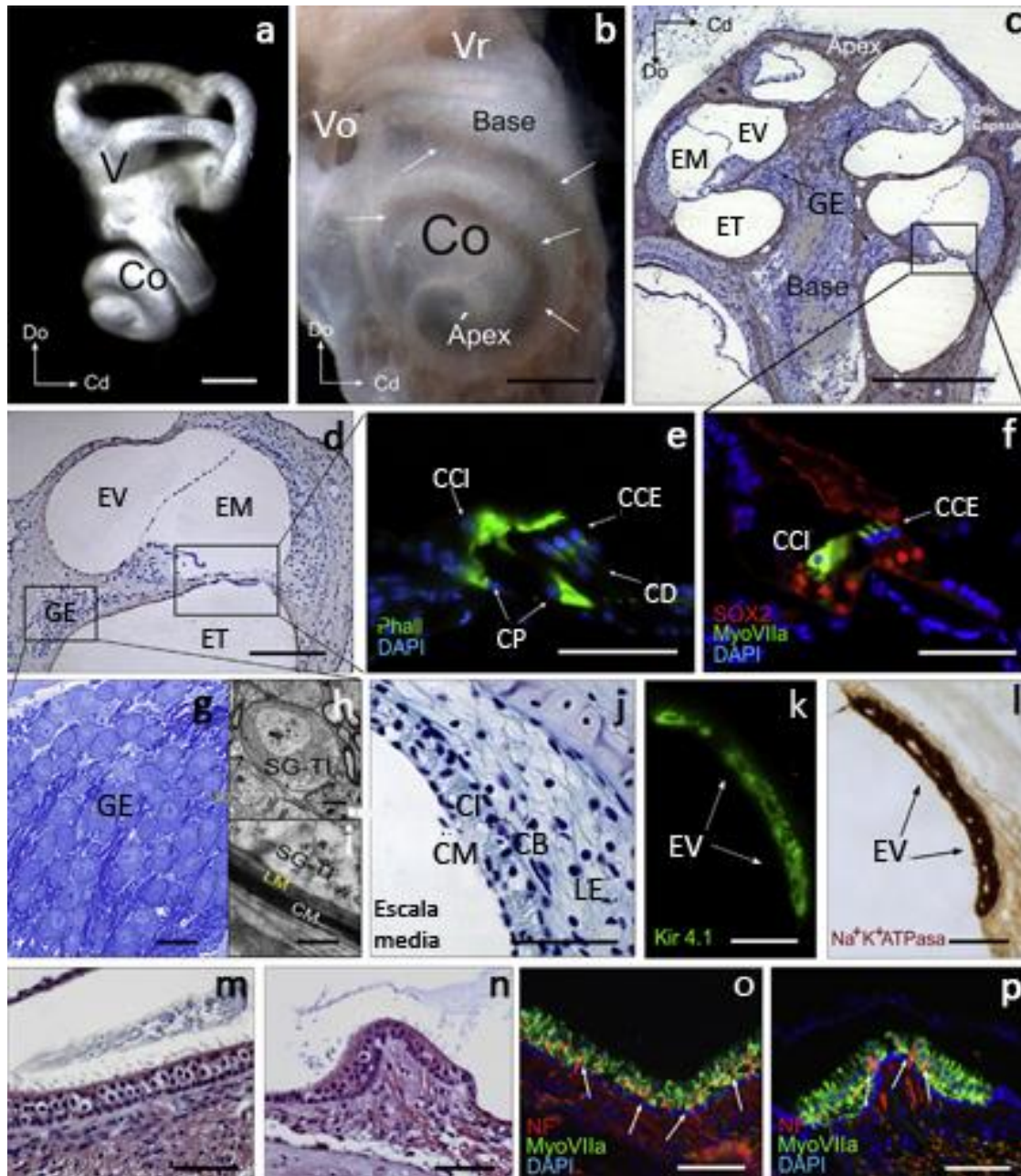


Figura 5. Citoarquitectura de la cóclea. **a)** Visión lateral del oído interno. Co, cóclea; V, vestíbulo; Do, dorsal y Cd caudal. **b)** Visión lateral de la cóclea donde se observa la estría vascular (Stv) pigmentada (flechas) y la ventana oval (Vo) y redonda (Vr). **c)** Corte transversal de la cóclea. Se muestran las tres escalas: vestibular (EV), media (EM) con el receptor auditivo (cuadrado) y timpánica (ET), y el ganglio espiral (GE). **d)** Detalle de una vuelta de la cóclea donde se observa el GE, y el órgano de Corti (OC) (cuadrado). **e)** Histoquímica de faloidina (Phal) del OC que marca las células ciliadas internas (CCI) y externas (CCE) y las células pilares (CP). **f)** Detalle del OC que muestra las CCI y CCE marcadas con miosina VIIa (MyoVIIa) y las células de soporte marcadas con SOX2. **g)** Sección semifina del GE. **h)** microscopía electrónica del GE. SG-TI, neuronas tipo I. **i)** Detalle de la mielina compacta externa (CM) y la difusa interna (LM) de las SG-TI. **j)** Detalle de la EV compuesta de las células marginales (CM), células intermedias (CI) y basales (CB). LE, ligamento espiral. **k)** Inmunohistoquímica de la expresión de Kir4.1 que marca la Stv. **l)** Inmunohistoquímica de Na²⁺-K⁺ ATPasa que marca las CM de la EV. **m)** Sección de la cóclea. **n)** Sección de la cóclea. **o)** Inmunohistoquímica de NF, MyoVIIa, DAPI. **p)** Inmunohistoquímica de MyoVIIa, DAPI.

m-n) Epitelio sensorial del vestíbulo, detalle de la mácula y la cresta. **o-p)** Detalle de la mácula (**o**) y de la cresta (**p**) marcadas con myoVIIa (células ciliadas sensoriales) y neurofilamento (NF) (fibras nerviosas). Las flechas muestran las aferencias de las células ciliadas tipo I. **Barras de escala:** a-c, k, 0,5 mm; d, 100 μm ; e,f,j,l,m, 50 μm ; g, 30 μm ; h, 5 μm ; i, 0,1 μm ; j,k,l,m,n,o,p, 50 μm . Figura adaptada de (Magariños, 2014)

Las CCI llevan a cabo la transducción e inician la despolarización de las neuronas del GE, mientras que las CCE son las responsables del aumento de la sensibilidad y selectividad de la cóclea (Raphael y Altschuler, 2003). Ambos tipos de células ciliadas presentan en su parte apical un penacho de estereocilios dispuestos linealmente en las CCI y en forma de “W” en las CCE. En su polo basal las CCI poseen numerosas terminaciones sinápticas, mientras que en las CCE la densidad de inervación es mucho menor. Las CCI y CCE están separadas por las células de soporte denominadas pilares que forman el túnel de Corti. Además, existen otras células de soporte denominadas células de Deiters, Hensen y de Claudius que participan en la homeostasis iónica y metabólica coclear (Whitfield, 2015).

- **Ganglio espiral**

Las neuronas auditivas son neuronas bipolares que tienen localizados sus somas en el GE (**Figura 5g-i**) (Nayagam *et al.*, 2011). Estas neuronas proyectan sus axones hacia los núcleos cocleares del tronco encefálico y sus proyecciones dendríticas hacia las células ciliadas. Las neuronas de tipo I son el subtipo más abundante, están mielinizadas (95%) e inervan las CCI, mientras que las neuronas de tipo II (5%) no están mielinizadas e inervan mayoritariamente las CCE. La sinapsis de la inervación aferente de las neuronas auditivas con las CCI y de las CCE es diferente. Cada neurona de tipo I hace sinapsis con una única CCI, que a su vez puede ser inervada por 10-30 neuronas. Sin embargo, las neuronas tipo II se conectan con diferentes CCE (Stover y Diensthuber, 2011). Las células ciliadas también presentan inervación eferente cuya función es de regulación frente a una estimulación exacerbada o de modulación de la señal tras la sinapsis (Guinan, 2010).

- **Pared lateral**

La endolinfa presenta unas concentraciones específicas de K^+ y Na^+ y un potencial positivo de aproximadamente +80mV, es el llamado potencial endococlear

(PE) (Morgenstern *et al.*, 1982, Stover y Diensthuber, 2011). La regulación de la concentración de K^+ , ocurre principalmente en la StV, una estructura que forma la pared lateral y que está constituida por un gran número de capilares y por tres tipos de células organizadas en capas: las células basales (CB) e intermedias (CI) que se apoyan en los fibrocitos del ligamento espiral y las marginales (CM) que limitan con la endolinfa (**Figura 5 j-l**) (Hibino *et al.*, 2010). Se ha descrito que las CI o melanocitos de la StV preservan la función coclear en situaciones de estrés (Murillo-Cuesta *et al.*, 2010), y su alteración provoca sordera (Cohen-Salmon *et al.*, 2007). Estas células presentan canales y transportadores de K^+ , encargados de determinar la concentración de iones adecuada para que se forme el PE, entre éstos cabe destacar el canal de K^+ Kir4.1 y el transportador Na^+/K^+ -ATPasa (**Figura 5k, l**). Se ha descrito que tanto la inhibición selectiva de los canales Kir4.1 (Kusakari *et al.*, 1978), como la ausencia de ellos en ratones nulos para este gen reduce drásticamente el PE (Marcus *et al.*, 2002) comprometiendo seriamente la función auditiva (Chen y Zhao, 2014). La pared lateral está formada, además de por la StV, por el ligamento espiral (LE), que está compuesto en su mayor parte por tejido conectivo (fibrocitos tipo I a tipo V) y es la zona donde existe un mayor número de capilares para el abastecimiento y drenaje del oído. Una de las funciones del LE se relaciona con el mantenimiento del equilibrio iónico en la cóclea.

La parte vestibular del oído interno contiene los receptores del equilibrio, que están formados por células ciliadas especializadas, similares a las del órgano de Corti y organizadas en varios órganos sensoriales: tres crestas situadas en la base de los conductos semicirculares y cuya función es detectar la aceleración angular, y dos maculas, que son las responsables de detectar la aceleración lineal y la gravedad (**Figura 5m-p**) (Goldberg, 1991, Highstein *et al.*, 2004).

1.1.4. La transmisión del sonido

Cuando se produce un estímulo acústico, la onda es percibida y amplificada por el oído externo, que posteriormente hace vibrar el tímpano. La vibración se transmite a lo largo de la cadena de huesecillos del oído medio (martillo, yunque y estribo), de tal forma que la base del estribo vibra en la ventana oval. Se transforman las vibraciones del aire en vibraciones de un líquido (perilinfina). La onda generada en la perilinfina viaja a lo largo de la cóclea desplazando la membrana basilar y se produce la flexión de los

cilios de las células ciliadas internas en contacto con la membrana tectoria, lo que desencadena una despolarización que activa los canales de calcio. Es en las células ciliadas donde se lleva a cabo el proceso de transducción mecanoeléctrica o conversión de la señal mecánica en electroquímica. Las células ciliadas internas transmiten su excitación a través de sinapsis químicas a los axones de las neuronas del GE. La liberación del neurotransmisor por parte de las células ciliadas modula la frecuencia de descarga de los axones, que viajan por el nervio vestibulococlear, el octavo par craneal, estableciendo sinapsis con las neuronas del núcleo coclear.

Desde aquí los impulsos nerviosos llegan al complejo olivar superior, a los núcleos del lemnisco lateral y también se transmiten hacia el colículo inferior. Posteriormente la información se transmite al cuerpo geniculado, y finalmente la información se integrará en la corteza temporal (Nelken *et al.*, 2014). La información del sonido viaja por una vía compleja que es multisináptica, paralela y ascendente (Nayagam *et al.*, 2011).

La tonotopía o selectividad frecuencial es la capacidad que posee la cóclea de separar espectralmente los sonidos en función de su frecuencia, de modo que pueden activar poblaciones concretas de fibras nerviosas auditivas. En la base de la cóclea se produce la transducción de las frecuencias altas, mientras que en el ápex se produce la transducción de las frecuencias bajas. La tonotopía se proyecta a lo largo de toda la vía auditiva (Leaver y Rauschecker, 2016).

1.2. Hipoacusia y sordera

La hipoacusia es la incapacidad total o parcial de la facultad de oír sonidos en uno o ambos oídos y se produce por alteraciones en cualquiera de los componentes de sistema auditivo. El estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015 estima que en todo el mundo hay 360 millones de personas que sufren pérdida auditiva de moderada a severa, lo que supone un 5% de la población mundial. De los afectados 32 millones son niños y casi una de cada tres personas mayores de 65 años padecen pérdida de la audición, que conlleva, si no es tratada, a una comunicación deficiente y puede agravar el aislamiento social, la ansiedad, la depresión y el declive cognitivo.

La OMS clasifica la hipoacusia en diferentes niveles de gravedad en función de dónde se sitúe el umbral de audición medido en decibelios (dB): leve (<40 dB), moderada (41-70 dB), grave (71-90 dB) y profunda (>90 dB). Se habla de sordera total o cofosis como sinónimos de hipoacusia profunda (Varela-Nieto *et al.*, 2013). Si atendemos a las frecuencias afectadas, puede tratarse de frecuencias bajas (por debajo de 500 hercios (Hz)), frecuencias medias (entre 501-2000 Hz) y frecuencias altas (por encima de 2000 Hz).

La hipoacusia puede ser hereditaria, siendo la más frecuente la autosómica recesiva (Shafique *et al.*, 2014); o adquirida, que a su vez puede ser prenatal, perinatal o postnatal. Se ha descrito que la hipoacusia adquirida en adultos puede estar producida por infecciones virales (Cohen *et al.*, 2014) o bacterianas, agentes ototóxicos y medicamentos (Schacht *et al.*, 2012), traumatismos acústicos (Mulders *et al.*, 2011) o exposición prolongada a ruido (Sanz *et al.*, 2015) y envejecimiento (presbiacusia) (Allen y Eddins, 2010). Puesto que la dieta es uno de los pocos factores de riesgo potencialmente modificables para prevenir la hipoacusia, se ha investigado también el impacto de la conducta nutricional en la audición (Martinez-Vega *et al.*, 2015).

El estudio sobre las causas que subyacen a las dos formas de pérdida auditiva neurosensorial, hereditaria y adquirida, ha avanzado enormemente en los últimos 20 años. Sin embargo, los tratamientos para la hipoacusia avanzan lentamente y generalmente consisten en la amplificación del sonido cuando la hipoacusia es leve o moderada, e implantación coclear para pérdidas graves o profundas. En la actualidad, están empezando a emerger estudios para restaurar la función normal del órgano de Corti a través de técnicas como la regeneración de las células ciliadas, terapias génicas y mediante fármacos (Muller y Barr-Gillespie, 2015, Lustig y Akil, 2012).

1.2.1 Pérdida auditiva inducida por ruido (NIHL)

La pérdida de audición inducida por ruido (NIHL) es la segunda forma más común de sordera en sociedades industriales y constituye una prioridad de salud pública importante. Se produce cuando hay una exposición a sonidos de intensidad suficiente como para dañar el oído y resultar en pérdida auditiva temporal o permanente. La gravedad de la pérdida auditiva depende de las características del ruido (nivel, frecuencia, duración y patrón temporal) y de la susceptibilidad genética (Ohlemiller *et*

al., 2011). Según la intensidad y duración del ruido podremos encontrar dos tipos de daño: trauma acústico y exposición prolongada a ruido (JAMA, Consensus conference, 1990). Se denomina trauma acústico cuando la exposición al ruido es breve, pero de gran intensidad (más de 140 dB) y ocasiona una pérdida auditiva permanente en todas las frecuencias, y exposición prolongada a ruido cuando la exposición es de intensidad moderada o alta y durante tiempos largos.

Se ha descrito que la exposición a un ruido excesivo produce sordera neurosensorial debido a la pérdida de la mayoría de las poblaciones celulares de la cóclea. Las CCI y especialmente las CCE son las más susceptibles al ruido. Además, las células situadas en la base de la cóclea son las más sensibles y las que se pierden primero y las últimas en dañarse son las situadas en el ápex. El daño en los estereocilios de las células ciliadas conduce a una alteración grave en la integridad estructural de estas células y se ha relacionado con el cambio del umbral de forma permanente en muchas especies (Hamernik y Qiu, 2000, Chen *et al.*, 2003, Hu *et al.*, 2006, Bohne *et al.*, 2007). Los estereocilios de las células ciliadas pueden romperse, fusionarse o perder las uniones *tip-link* que llevan a la pérdida de integridad estructural (Tanaka *et al.*, 2009). Además, también se han descrito defectos en la sinapsis del nervio y la pérdida de fibrocitos (Hirose y Liberman, 2003, Wang *et al.*, 2002).

1.2.2 Susceptibilidad genética a la NIHL

Uno de los factores que están implicados en la NIHL es la susceptibilidad genética. Estudios en seres humanos han evidenciado diferencias significativas entre sujetos resistentes y vulnerables al ruido. Los genes cuyos polimorfismos se han relacionado con la susceptibilidad a daño por ruido incluyen genes relacionados con la circulación de iones de K^+ , como *KCNE1* y *KCNQ4* (Malgorzata et al 2009) o con el estrés oxidativo, como *PON1*, *PON2* y *SOD2* (Fortunato *et al.*, 2004), entre otros (Sliwinska-Kowalska y Davis, 2012).

Estudios en animales modificados genéticamente también demuestran que la susceptibilidad genética es un factor fundamental en el NIHL. Los ratones con fondo genético C57BL/6 y BALB/c son particularmente vulnerables al ruido, mientras que ratones CBA/Ca parecen ser más resistentes. Este hecho se debe a que en los ratones C57BL/6 se ha determinado la presencia del alelo *Ahl*, en el cromosoma 10, e

incrementa la susceptibilidad al daño por ruido (Gratton *et al.*, 2011, Ohlemiller *et al.*, 2011, Ou *et al.*, 2000). Además, los ratones deficientes en *Sod1* y *Gpx1*, dos genes que están implicados en los mecanismos antioxidantes celulares, son más susceptibles al NIHL que los animales con genotipo silvestre (Ohlemiller *et al.*, 1999, Ohlemiller *et al.*, 2000). También se han descrito genes implicados en el NIHL como la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (*VASP*) o genes implicados en la regulación iónica (*Pmca2*, *Cp*) (Carlsson *et al.*, 2005, Gratton *et al.*, 2011, Harding *et al.*, 2005). Los genes propuestos como mediadores del daño por ruido apuntan al calcio, el hierro, las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ohlemiller, 2006), proteínas transportadoras como GLAST y proteínas del citoesqueleto como la distrofina (Chen *et al.*, 2002, Hakuba *et al.*, 2000).

1.2.3. Mecanismos moleculares de la NIHL

Las características audiológicas y la morfología coclear de la NIHL en ratones están bien caracterizadas, pero hasta la fecha el proceso molecular que subyace a la NIHL no se conoce bien.

La exposición a ruido provoca la alteración en la expresión coclear de algunas proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), como la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la proteína quinasa activada por mitógenos 14 (p38) y la quinasa c-Jun N-terminal (JNK). Se ha descrito que se produce un aumento de los niveles de MEK fosforilada (p-MEK) y de ERK fosforilada (p-ERK) a las 3-6 horas después de la exposición a ruido en ratones, como respuesta protectora al trauma acústico en el epitelio sensorial y el ligamento espiral de la cóclea (Maeda *et al.*, 2013). Está generalmente aceptado que las MAPK quinasas JNK y p38 actúan como quinasas inducidas por estrés y cuyas fosforilaciones conducen a la apoptosis. Se ha descrito que la NIHL no varía los niveles de la p-38 fosforilada (p-p38), pero sí se ha observado un aumento de los niveles de p38 total que sugiere la necesidad de síntesis de proteínas *de novo* tras un trauma acústico (Maeda *et al.*, 2013). Otra de las vías que activa la NIHL es la vía JNK. Se ha observado un incremento de la JNK fosforilada (p-JNK) en el epitelio sensorial, en el ligamento espiral y en las neuronas del ganglio espiral a las 3 horas después de la exposición a ruido (Maeda *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que utilizando inhibidores de la JNK se bloquea la apoptosis y disminuye la extensión del

daño coclear y la hipoacusia causada por el ruido (Bielefeld *et al.*, 2011, Harris *et al.*, 2005).

Los mecanismos moleculares de la NIHL también incluyen la formación de radicales libres y estrés oxidativo (Fetoni *et al.*, 2013), disminución del flujo sanguíneo coclear, excitotoxicidad por glutamato, desequilibrio de calcio e inflamación coclear (Henderson *et al.*, 2006).

1.2.3.1. NIHL e inflamación

Tradicionalmente se ha considerado que la cóclea estaba aislada inmunológicamente, sin embargo, la inflamación coclear se ha asociado con muchas situaciones que causan pérdida de la audición como la otitis, enfermedades autoinmunes de oído interno y principalmente la ototoxicidad (Abi-Hachem *et al.*, 2010, Murillo-Cuesta *et al.*, 2015). En los últimos años se ha considerado la inflamación como un proceso clave en la NIHL. Se ha descrito la participación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 beta (IL-1 β) y la interleuquina 6 (IL-6) en la cóclea después de la exposición a ruido (Fujioka *et al.*, 2006, Ichimiya *et al.*, 2000, Nakamoto *et al.*, 2012, Satoh *et al.*, 2002). La familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) está implicada en la respuesta inflamatoria de ratones adultos (Prud'homme, 2007). Se ha descrito que en las primeras 24 horas después de la exposición al ruido hay un aumento en la expresión de los genes *Tgfb1* y *TgfbR1*, y una disminución de *Tgfb2* y *TgfbR2*. También se ha descrito que el tratamiento con inhibidores de TGF- β 1 disminuye los niveles de p-38 α y aumenta la actividad de la enzima antioxidante manganeso superóxido dismutasa (MnSOD). Por lo tanto, TGF- β 1 desempeña un papel importante en la fase inflamatoria inicial y el tratamiento con los inhibidores del TGF- β 1 mejora la NIHL (Murillo-Cuesta *et al.*, 2015).

1.2.4. Funciones de la autofagia en la fisiopatología del oído interno adulto

Además de las funciones descritas durante el desarrollo, la autofagia juega un papel clave en los tejidos adultos. Se ha descrito que la inducción de la autofagia resuelve la inflamación, aminora el envejecimiento y protege de la neurodegeneración (Menardo *et al.*, 2012, Nixon, 2014, Rubinsztein *et al.*, 2011). La autofagia tiene un

papel esencial en las neuronas adultas. Las proteínas autofágicas Ambra1 y Beclin1 son esenciales para la correcta neurogénesis adulta mediante el control de la supervivencia de células precursoras neurales en la zona subventricular del cerebro de ratón (Yazdankhah *et al.*, 2014). Además, la autofagia contribuye a la homeostasis mediante la eliminación de agregados proteicos perjudiciales y organelas dañadas. Se ha descrito que la supresión de la autofagia conduce a la acumulación de agregados proteicos (Komatsu *et al.*, 2006), por tanto, la eliminación continua de proteínas difusas citosólicas mediante la autofagia basal es esencial para prevenir la acumulación de proteínas anormales, que pueden interrumpir la función neuronal y en última instancia conducen a la neurodegeneración (Hara *et al.*, 2006, Son *et al.*, 2012). Este papel citoprotector es tan importante que la autofagia se ha propuesto como un proceso esencial para la determinación de la esperanza de vida en mamíferos (Lopez-Otin *et al.*, 2013).

El papel de la autofagia en el oído interno ha sido poco estudiado hasta la fecha. Se ha descrito la presencia de autofagosomas en células ciliadas expuestas a ototóxicos. Aunque normalmente las células mueren en respuesta a este daño, no se ha podido determinar si la autofagia está promoviendo la supervivencia o la muerte de estas células (Taylor y Kirkegaard, 2008). La activación de la autofagia por rapamicina reduce el daño ótico causado por el cisplatino, un agente ototóxico, cuyo uso continuado produce sordera neurosensorial irreversible (Fang y Xiao, 2014).

1.3. Papel del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 en el desarrollo del oído interno y en la función auditiva

El factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1) pertenece a la familia de polipéptidos de la insulina, estructuralmente relacionados y altamente conservados a lo largo de la evolución. Desempeñan un papel central en el desarrollo embrionario y la homeostasis del sistema nervioso adulto mediante mecanismos endocrinos, autocrinos y paracrinos (Liu *et al.*, 2014). Los miembros de esta familia son la insulina, los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) 1 y 2 y la relaxina, entre otros, presentes en diferentes especies. Éstos péptidos se unen a receptores específicos de la membrana plasmática de las células diana, que pueden agruparse en dos categorías: los receptores tipo tirosina quinasa (el receptor de la insulina, IR, y el

receptor de alta afinidad del IGF-1, IGF1R) y el receptor tipo manosa 6 fosfato (IGF2R) (Murillo-Cuesta *et al.*, 2011).

Se ha descrito la presencia de esta familia de polipéptidos en el oído interno de mamíferos (Okano *et al.*, 2011). Se ha observado en etapas embrionarias de ratón mediante hibridación *in situ* de los genes *Igf1*, *Igf2* y *Igf1r* que el *Igf1* se expresa en la región medial de la cresta epitelial mayor de los conductos cocleares y en la futura StV. La expresión del *Igf2* se solapa con la del *Igf1* en la región medial del conducto coclear, pero no se ha observado expresión en la StV. Además, *Igf2* se expresa en el borde lateral del conducto coclear y en el mesénquima circundante. El receptor, *Igf1r*, se expresa ampliamente en el conducto coclear, incluido el dominio prosensorial, en la futura membrana de Reissner y en el ganglio espiral (Okano *et al.*, 2011).

La actividad del IGF-1, tanto su interacción con el receptor como su biodisponibilidad, está modulada por las proteínas de unión a IGF1 (IGFBP) que se expresan en la cóclea de varias especies (Cho *et al.*, 2002, Park *et al.*, 2007, Okano y Kelley, 2013). Las IGFBP son péptidos comprendidos entre 200 y 300 aa, con puentes disulfuro y carbohidratos en su interior que resultan de vital importancia para poderse unir al IGF-1 y a la superficie celular respectivamente. Se han descrito varias acciones de las IGFBP dependiendo del contexto fisiológico, entre ellas, secuestrar e inhibir al IGF-1 y actuar como reservorio del IGF-1, prolongando así su vida media en circulación. Cuatro de las IGFBP (IGFBP2-5) se expresan siguiendo patrones específicos y complementarios durante el desarrollo coclear. Se ha descrito que los niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas de unión a IGF-1, *Igfbp2* e *Igfbp3*, presentan niveles altos en cócleas de ratones E15,5, y posteriormente esta expresión disminuye. Estos datos sugieren que las IGFBP pueden actuar, en función del tipo celular, regulando de manera muy precisa la activación de la señalización del sistema IGF durante el desarrollo de la cóclea (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010, Okano y Kelley, 2013).

El IGF-1 tiene un papel fundamental en el correcto desarrollo y funcionamiento del oído interno en mamíferos y es un factor clave para la diferenciación, maduración y su mantenimiento. Se ha descrito el fenotipo de los ratones nulos para *Igf1*: presentan baja tasa de supervivencia, menor tamaño de la cóclea, y un retraso general del

desarrollo del órgano de Corti (**Figura 6**) (Murillo-Cuesta *et al.*, 2011) También se ha publicado que los ratones nulos para *Igfl* presentan un cerebro más pequeño acompañado de alteraciones en regiones cerebrales como el hipocampo, el córtex cerebral, el cerebelo y el bulbo olfatorio (Murillo-Cuesta *et al.*, 2011).

La deficiencia de IGF-1 en el oído interno del ratón afecta a la diferenciación de las neuronas auditivas, y causa la inervación anormal del órgano de Corti. También se ve afectada la mielinización del octavo par craneal y del ganglio coclear, que en ratones nulos aparece reducida. Además, en estadios postnatales, desde P5 a P20, las neuronas son dependientes de IGF-1, y se observa una gran pérdida por apoptosis de neuronas en el GE de ratones nulos (Camarero *et al.*, 2001). Además, el déficit de IGF-1, causado por mutaciones en el gen que codifica para dicha proteína, produce sordera neurosensorial profunda en el ratón y en el hombre (número del catálogo *Online mendelian inheritane in man* (OMIM) 147440) (Varela-Nieto *et al.*, 2013).

Al nivel molecular se ha descrito que los ratones nulos muestran una mayor expresión de *Igflr* respecto los silvestres. También presentan una reducción del 25% en las formas activadas de las proteínas ERK1/2 y de la proteína quinasa B (AKT) y un gran aumento en la MAPK quinasa p38 activada. Por lo tanto, la deficiencia de IGF-1 en la cóclea disminuye la actividad de las vías de señalización que regulan la proliferación y la supervivencia, y aumentan aquellas implicadas en la respuesta celular al estrés (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010).

También se ha estudiado el papel del IGF-1 en el oído interno de pollo y se ha descrito que es necesario para la supervivencia y la proliferación celular en explantes de vesículas óticas. Además, juega un papel clave en la supervivencia y la diferenciación de los neuroblastos en la VO de pollo (Frago *et al.*, 2003, Frago *et al.*, 1998, Sanz *et al.*, 1999). En cultivos organotípicos de explantes de VO, la adición de IGF-1 exógeno causa un aumento en el número de células de la VO y en el GAV asociado, y su presencia reproduce, en los explantes, el patrón de morfogénesis normal que tiene lugar en el esbozo ótico del embrión (Leon *et al.*, 1995).

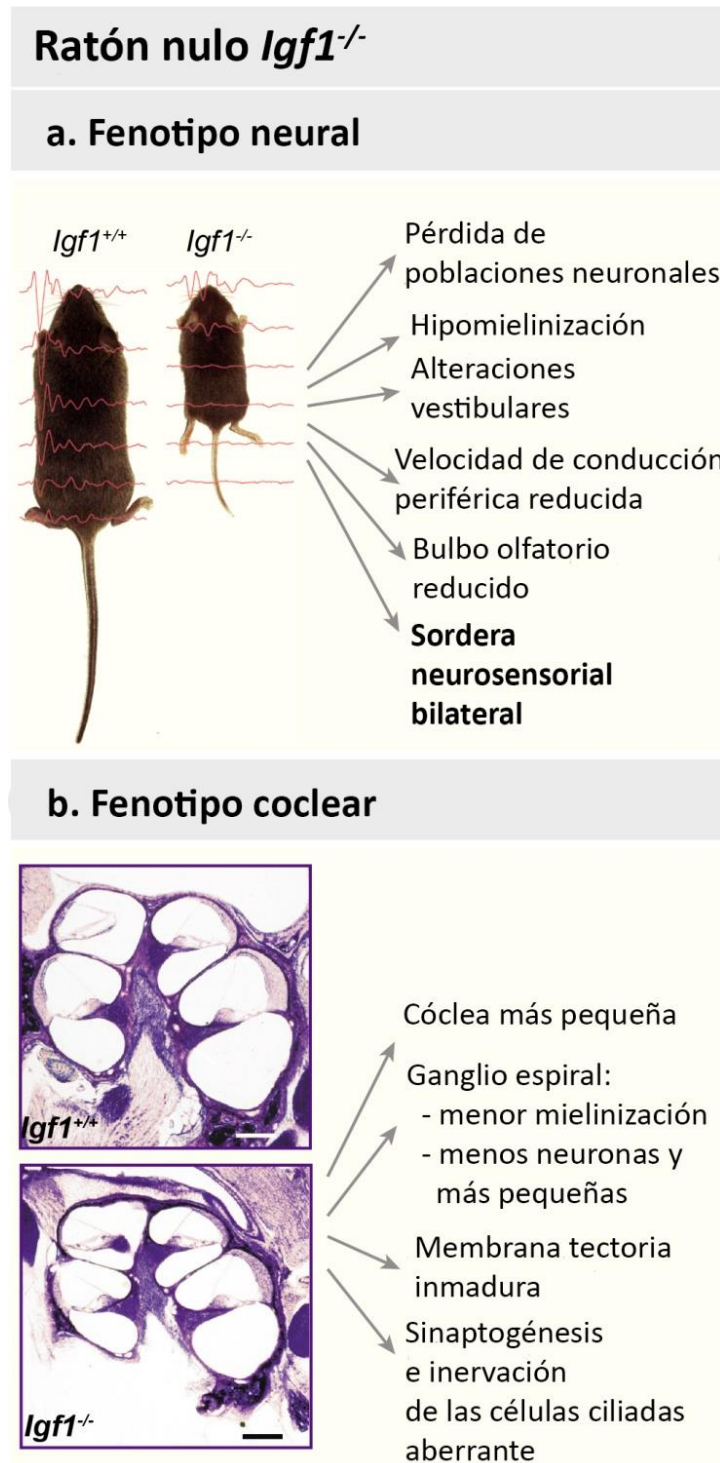


Figura 6. Principales características del fenotipo neural y coclear del ratón nulo *Igf1*. a) Los ratones nulos para *Igf1* presentan pérdida de poblaciones neuronales, hipomielinización, alteraciones vestibulares, velocidad de conducción periférica reducida, el bulbo olfatorio reducido y sordera neurosensorial profunda. b) Corte transversal de las cócleas de ratones silvestres y nulos para *Igf1* teñidas con violeta de cresilo. En los ratones nulos se observa una cóclea más pequeña, menor mielinización, menos neuronas de menor tamaño, la membrana tectoria inmadura y una innervación aberrante de las células ciliadas. Figura adaptada de (Murillo-Cuesta *et al.*, 2011).

El bloqueo de la actividad del IGF-1 endógeno en explantes de VO de pollo inhibe la formación del GAV y aumenta la muerte celular, indicando que el IGF-1 es esencial para la formación del GAV y para promover supervivencia en los precursores óticos (Camarero *et al.*, 2003). Por lo tanto, los datos existentes sugieren que la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de los progenitores neurales óticos de pollo dependen del IGF-1.

El IGF-1 en función del contexto celular tiene acciones opuestas sobre la maquinaria autofágica. El IGF-1 disminuye la autofagia en las células epiteliales mamarias mediante la activación de mTOR (Sobolewska *et al.*, 2009). Por el contrario, en cultivos de neuronas de Purkinje, el IGF-1 promueve la autofagia induciendo la fusión de autofagosomas con lisosomas (Bains *et al.*, 2009). Además, la inhibición de la señalización de los receptores de insulina e IGF-1 disminuye el número de autofagosomas tanto en cultivos celulares como *in vivo* (Renna *et al.*, 2013). Esta disminución está causada por defectos en la endocitosis, un proceso implicado en el suministro del sustrato de la membrana para formar los precursores de autofagosomas (Renna *et al.*, 2013).

1.3.1. Vías de señalización del IGF-1

El IGF-1 se une a la subunidad α de su receptor de alta afinidad IGF1R y activa vías de señalización que afectan a múltiples sustratos intracelulares que a su vez median los efectos tróficos del IGF-1 (**Figura 7**). La actividad tirosina quinasa en la subunidad β del IGF1R una vez activado produce la autofosforilación del mismo (Leroith *et al.*, 1995). Las vías de señalización activadas por el IGF-1 son la vía PI3K/AKT y la cascada de fosforilación RAF/MEK/ERK, que tienen un papel clave en la transmisión de las señales de los receptores de la membrana celular al núcleo a través de interacciones con otras proteínas. Además, se ha descrito que el IGF-1 modula otras quinasas como la MAP quinasa p38, que a su vez modula la expresión y la actividad de fosfatasas, quinasas y factores de transcripción, como el factor potenciador específico de miocito 2 (MEF2), que conduce a la regulación del ciclo celular y el metabolismo (**Figura 7**) (Cuenda y Nebreda, 2009).

1.3.1.1. Vía de señalización PI3K/AKT

El IGF1R activado se une y fosforila a una serie de proteínas adaptadoras de la familia de los sustratos para el receptor de insulina (IRS), que al activarse interaccionan con varias proteínas, entre ellas la PI3K, y se inicia la vía de señalización PI3K/AKT (**Figura 7**) (Sanchez-Calderon *et al.*, 2007). PI3K activa AKT, una molécula nodal que a su vez puede inhibir o activar la actividad de otras proteínas implicadas en la muerte celular programada y la regulación del ciclo celular. Entre las dianas de AKT se incluyen el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (p27^{Kip}), mTOR, los factores de transcripción de tipo *forkhead box* (FOX) o proteínas pro-apoptóticas como el promotor de muerte asociado a B-XL/Bcl2 (BAD) y Caspasa-9 (Faes y Dormond, 2015).

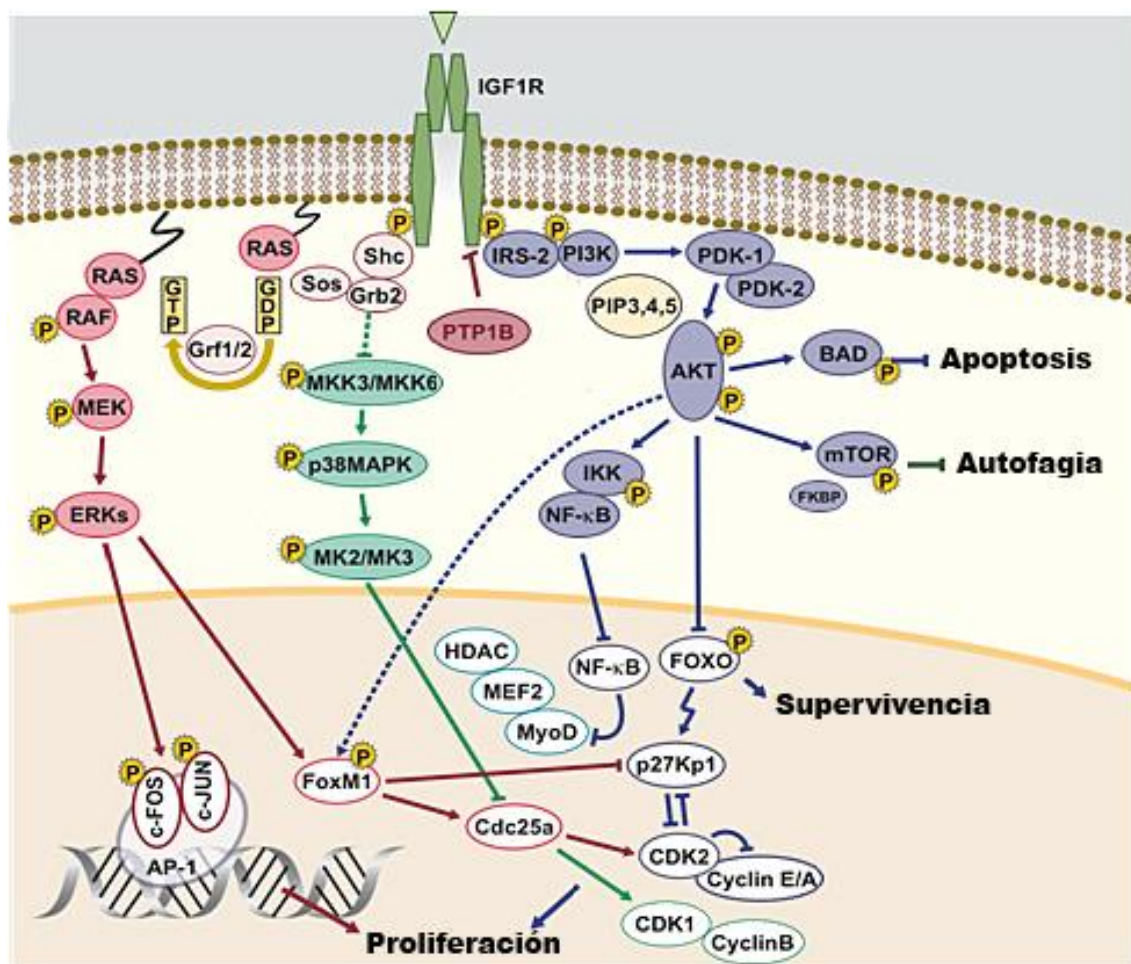


Figura 7. Mecanismos de señalización del IGF-1. Una vez activado el receptor tirosina quinasa IGF1R, tras la unión del ligando IGF-1, se activan una serie de vías de transducción de la señal interconectadas que promueven la supervivencia y la proliferación o bloquean la apoptosis, dependiendo del contexto celular (Figura adaptada de Rodríguez-de la Rosa *et al.*, 2011).

El estudio de los ratones nulos para los genes de *Akt1* y *Akt2* ha demostrado que estas proteínas tienen un papel fundamental en el crecimiento celular y la supervivencia, puesto que presentan apoptosis y una mayor susceptibilidad al daño celular (Chen *et al.*, 2006). Además, los niveles de *Akt1* regulan la supervivencia, proliferación y renovación de progenitores neuronales en respuesta a señales extrínsecas (Sinor y Lillien, 2004). Se ha descrito la importancia de la vía PI3K/AKT para la supervivencia y proliferación de los neuroblastos óticos, así como, para mantener estas células indiferenciadas durante el desarrollo temprano del oído interno de pollo (Aburto *et al.*, 2012a). Por lo tanto, la vía de la PI3K/AKT es fundamental para el control de la supervivencia celular mediante la inactivación de las rutas pro-apoptóticas y la regulación del ciclo celular.

1.3.1.2. Vía de señalización RAF/MEK/ERK

Las proteínas IRS también activan otras proteínas como GRB2 y SOS, que están implicadas en la ruta de activación de la proteína RAS. Una vez activa, RAS desencadena la cascada de fosforilaciones de las MAPK quinasas, a través de las serina treonina quinasas RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*). Las proteínas RAF quinasas fosforilan y activan a MEK, y ésta a su vez fosforila a la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), que se translocará al núcleo donde activa por fosforilación varias proteínas nucleares y citoplasmáticas (Lavoie y Therrien, 2015). Entre ellos están los factores de transcripción c-JUN, c-FOS y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que al elevarse sus niveles aumenta la proliferación celular (Chang *et al.*, 2003, Kyosseva, 2004) (**Figura 7**).

1.3.1.2.1. Familia de las RAF quinasas.

El gen *Raf* fue encontrado inicialmente en dos tipos de virus diferentes, el retrovirus común de aves Mill Hill 2 (MH2), y el sarcoma de virus de ratón (MSV) (Matallanas *et al.*, 2011). Ulf Rapp y colaboradores clonaron por primera vez *C-Raf* de mamíferos, el homólogo del oncogén *V-raf* del MSV (Rapp *et al.*, 1983), y posteriormente fueron identificados *A-Raf* y *B-Raf* (**Figura 8**). Las aves, a diferencia de los mamíferos, solo poseen dos genes, los homólogos de *B-Raf* y de *C-Raf*. Estas proteínas muestran especificidad tisular: A-RAF es ubicua y sus funciones se han asociado con el tráfico endocítico (Nekhoroshkova *et al.*, 2009), los ratones nulos *A-Raf* mueren a los 20 días después del nacimiento debido a defectos neuronales y distensión

intestinal (Pritchard *et al.*, 1996). Evolutivamente B-RAF es la isoforma más ancestral y tiene una alta expresión en sistema nervioso y gónadas (Pfeiffer *et al.*, 2013). Aunque las tres proteínas RAF pueden fosforilar su diana ERK, B-RAF es la más eficiente, y por lo tanto, desempeña un papel central en la fisiopatología de la proliferación celular (Galabova-Kovacs y Baccarini, 2010). C-RAF se expresa también de forma ubicua (Craig *et al.*, 2008, Storm *et al.*, 1990), está estrechamente asociada al cáncer (Ceteci *et al.*, 2011), desempeña un papel en la supervivencia celular (Mikula *et al.*, 2001) y se ha descrito su expresión y su papel regulador en el oído interno del pollo en desarrollo (Magarinos *et al.*, 2010, Sanz *et al.*, 1999). Un porcentaje de los ratones nulos para *C-Raf*, dependiendo del fondo genético, presentan letalidad embrionaria, y su viabilidad post-natal no excede de los cuarenta días. Experimentos con ratones mutantes muestran que la letalidad es debida a la apoptosis masiva del hígado (Polzien *et al.*, 2010).

1.3.1.2.2. Estructura y regulación de las RAF quinasas

La regulación de las RAF quinasas es compleja y requiere la integración de otras vías de señalización así como interacciones intramoleculares, procesos de fosforilación y defosforilación e interacciones proteína-proteína (Chong *et al.*, 2003). Las tres isoformas de RAF presentan homología estructural pero también muestran variaciones significativas. Las RAF quinasas presentan varias regiones conservadas denominadas CR1, CR2 y CR3 con actividad de fosforilación (**Figura 8a**) (Baljuls *et al.*, 2011, Fischer *et al.*, 2009, Osborne *et al.*, 2012). La activación de estas proteínas comienza con su reclutamiento a la membrana mediante RAS, que se une a la región CR1 de RAF. El papel de la región CR2, rica en serina y treonina, está menos estudiado, sin embargo, se sabe que la fosforilación de CR2 parece afectar a la localización y activación de RAF (**Figura 8a**). En la membrana plasmática el dominio efector de RAS unido a guanosín trifosfato (GTP) se une a RAF, y esta unión reorienta la molécula de RAF y se inducen cambios conformacionales en el dominio catalítico activo CR3, de forma que ahora ésta expone residuos que pueden ser fosforilados, regiones de unión a proteínas adaptadoras y regiones susceptibles de sufrir procesos de homo y heterodimerización (**Figura 8a**) (Leicht *et al.*, 2007). La mitad N-terminal de RAF, compuesta por CR1 y CR2, es considerada como un dominio regulador negativo, que ayuda a mantener un estado inactivo de la proteína en ausencia de estímulo. Se ha descrito que una delección en esta mitad N-terminal da lugar a proteínas

constitutivamente activas y oncogénicas en una amplia variedad de tipos celulares (Pritchard *et al.*, 1995). Las proteínas RAF también facilitar la supervivencia de la célula al interactuar directamente con otras proteínas como 14-3-3, a través de mecanismos independientes de su actividad quinasa (Cseh *et al.*, 2014, Molzan *et al.*, 2010, Polzien *et al.*, 2011). C-RAF, en su forma inactiva se halla en el citosol asociada a otras proteínas formando complejos. Una de estas proteínas es la tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (14-3-3), que tiene dominios de unión de fosfoserinas y forma dímeros, de modo que puede conectar entre sí proteínas que contienen los citados grupos. En C-RAF la 14-3-3 se une a dos fosfoserinas, una en cada dominio, contribuyendo a estabilizar la forma inactiva. Se ha descrito que la unión de C-RAF a la proteína 14-3-3 interrumpe la interacción Ras-C-RAF e inhibe el reclutamiento de la membrana plasmática mediada por Ras de C-RAF. Se han identificado en la 14-3-3 tres sitios de unión a C-RAF: en la serina (ser) 233, ser259 y ser621. La unión de la 14-3-3 a C-RAF en la ser233 y la ser259 tienen un papel inhibitorio, mientras que la unión de la 14-3-3 en la ser621 activa C-RAF (**Figura 8b**) (Molzan *et al.*, 2010, Matallanas *et al.*, 2011).

1.3.1.2.3. Funciones de las RAF quinasas

Las funciones de la familia de las RAF quinasas han sido ampliamente investigadas en todos los contextos celulares debido a que juega un papel fundamental durante el desarrollo del organismo, en la regulación del ciclo celular, proliferación y diferenciación celular, supervivencia y apoptosis. Las tres RAF quinasas presentan funciones redundantes pero también específicas dependiendo del contexto celular y temporal (Camarero *et al.*, 2006, Kern *et al.*, 2013, Wellbrock *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos con ratones transgénicos *B-Raf knockin* (ratones nulos para *B-Raf* que expresan *A-Raf* bajo el promotor de *B-Raf*) indican que hay funciones que pueden realizar las tres proteínas, pero que también cada una de ellas presenta funciones específicas, al menos en el sistema nervioso, como en procesos de migración de neuronas corticales (Camarero *et al.*, 2006). Las RAF quinasas también están implicadas en motilidad celular, cicatrización de heridas y desarrollo de células del sistema inmune (Leicht *et al.*, 2007). Además, la familia de las RAF quinasas participa en procesos tumorales. Muchos estudios se han centrado en el papel cancerígeno de las proteínas RAF (Mcarthur, 2015), tanto en su papel directo en el cáncer como en su

participación en la transformación de sus efectores, especialmente RAS y receptores de factores de crecimiento (Schreck y Rapp, 2006). Se han encontrado mutaciones de las proteínas RAF quinasas en multitud de tipos de cánceres, causadas, generalmente, por exceso de actividad de la proteína. B-RAF es especialmente susceptible a alteraciones de ganancia de función debido a presentar un residuo de serina fosforilado constitutivamente, mientras que en A y C-RAF este residuo está regulado (Zebisch y Troppmair, 2006), de hecho el gen *B-Raf* está mutado en el 40-60% de los melanomas (Fedorenko *et al.*, 2015).

Se ha descrito que las RAF quinasas juegan un papel esencial en el oído interno de vertebrados. La ruta RAF-MEK-ERK está implicada en la proliferación y la supervivencia de los precursores neuroepiteliales de la vesícula ótica de pollo (Magarinos *et al.*, 2010). Las dos isoformas se expresan en las neuronas óticas pero presentan una distribución subcelular distinta. B-RAF se expresa abundantemente en cuerpos celulares y en los procesos neuronales, mientras la expresión de C-RAF está más restringida al citoplasma (Magarinos *et al.*, 2010). B-RAF y C-RAF juegan diferentes roles en la proliferación celular y la supervivencia, respectivamente durante el desarrollo temprano del oído interno de pez y pollo (Li *et al.*, 2013, Magarinos *et al.*, 2010, Magarinos *et al.*, 2012, Sanz *et al.*, 1999). La sobreexpresión de C-RAF en cultivos organotípicos de vesículas óticas de pollo, produce un aumento de la proliferación celular y reduce la diferenciación celular, por lo que es necesario un control estricto de los niveles de C-RAF para la correcta coordinación de los procesos biológicos que operan simultáneamente en el desarrollo temprano del oído interno (Sanz *et al.*, 1999).

En ratones la proteína ERK se activa como parte de la respuesta de reparación de lesiones cocleares (Hayashi *et al.*, 2013, Maeda *et al.*, 2013). Cabe destacar que la deficiencia en C-RAF está implicada en algunos síndromes raros humanos cuyos síntomas incluyen la sordera, como son los síndromes de Noonan (NS5; OMIM 611553) y Leopard (LPRD2; OMIM 611554) (Freeman *et al.*, 2013, Molzan *et al.*, 2010, Pandit *et al.*, 2007, Tartaglia *et al.*, 2011). Hasta la fecha, los mecanismos subyacentes a las funciones que tiene C-RAF en los órganos auditivos de mamíferos no están bien estudiados, y no se ha investigado el impacto de la deficiencia crónica de C-RAF en la audición.

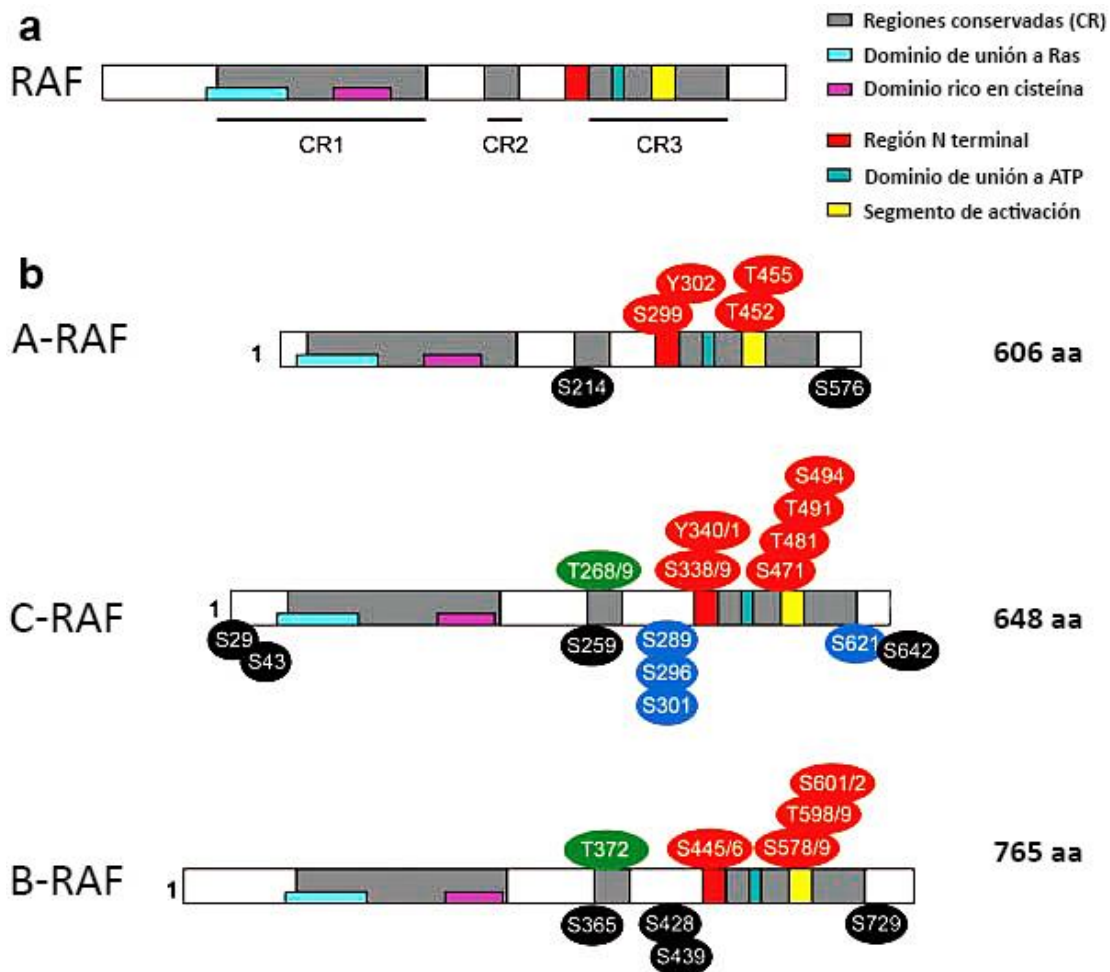
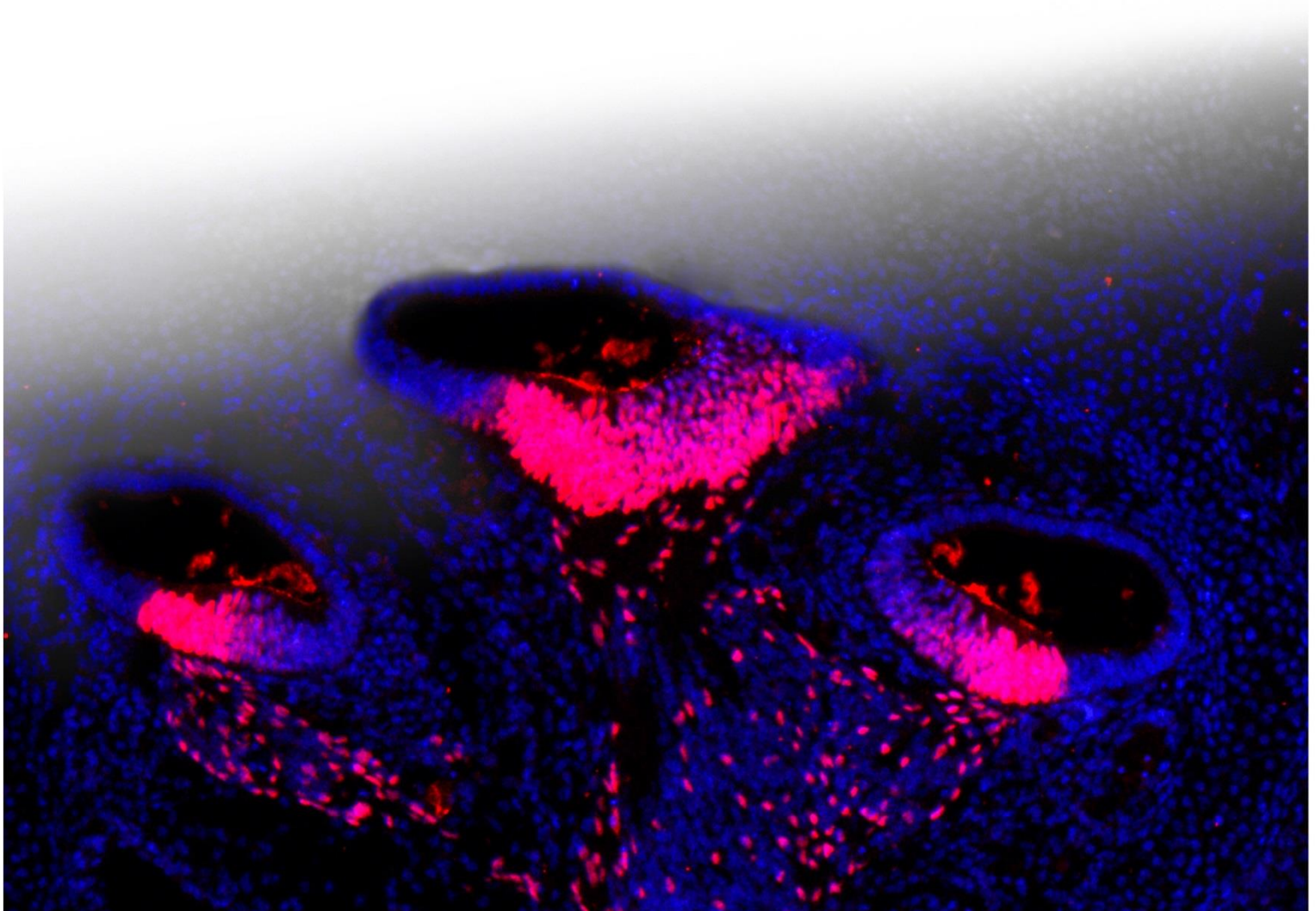


Figura 8. Estructura conservada de la familia de las RAF quinasas. a) Estructura común de las tres isoformas. Las RAF quinasas presentan tres regiones conservadas (CR) a lo largo de la evolución, iguales en todas sus isoformas y entre especies. CR1 tiene un dominio de unión a RAS y un dominio rico en cisteína, mientras que la región CR2 es rica en serina y treonina. Estas dos regiones forman la mitad N-terminal de la proteína. Por último, CR3 presenta el dominio catalítico y presenta un dominio de unión a ATP y un segmento de activación. El código de colores se indica en la figura. b) Comparación de la estructura y residuos de fosforilación entre las tres isoformas. A-RAF está formada por 606 aminoácidos (aa), C-RAF por 648 aa y B-RAF por 765 aa. En color rojo aparecen los sitios de que activan la fosforilación, en negro los sitios inhibitorios y en azul los sitios que tienen ambas funciones. Figura adaptada de (Matallanas *et al.*, 2001). Abreviaturas: aa, aminoácidos; CR, regiones conservadas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos habían demostrado la importancia de la interrelación entre el IGF-1 y las RAF quinasas en la morfogénesis del oído interno del pollo (*Gallus domesticus*). En paralelo, se evidenció la importancia de la autofagia en la formación del ganglio acústicovestibular y en el correcto desarrollo de la vesícula ótica del pollo. El IGF-1 es fundamental en el mantenimiento de la función auditiva en mamíferos, y se han descrito diferentes funciones de la autofagia y de C-RAF en el oído adulto de ratón (*Mus musculus*), particularmente durante la respuesta al estrés.

Con estos antecedentes, la hipótesis de trabajo fue que las dianas intracelulares del IGF-1, concretamente los miembros de la familia de las RAF quinasas *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf* estarían implicadas en el correcto desarrollo y en el mantenimiento de la función del oído interno en el ratón. Así como que la deficiencia de *C-Raf* causaría sordera neurosensorial profunda bilateral. Por último, se planteó que la regulación de la autofagia por IGF-1 podría ser un proceso clave en la el desarrollo perinatal del oído interno de ratón y durante el envejecimiento.

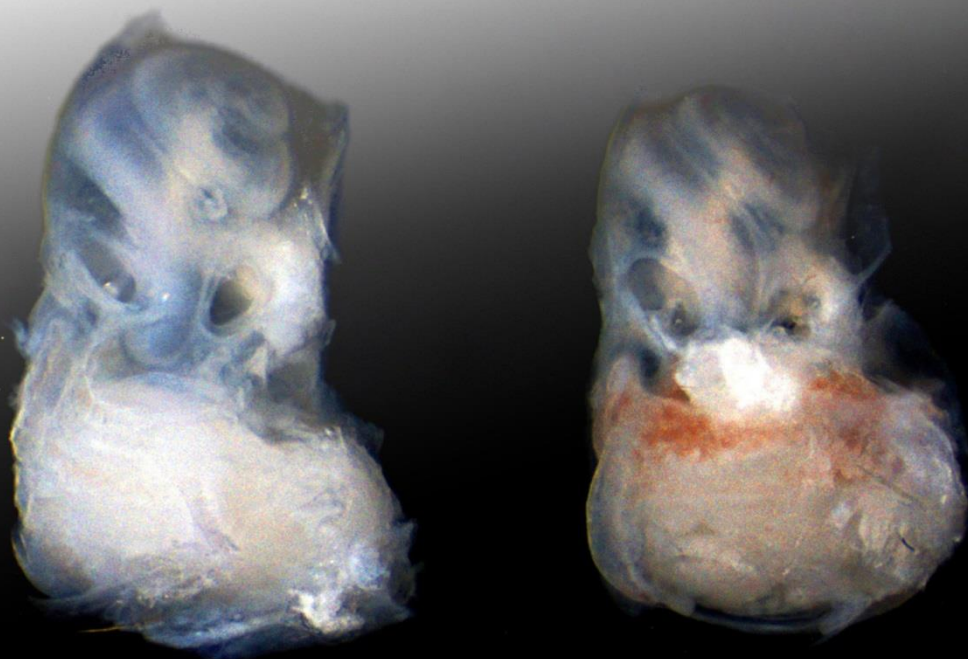
Los objetivos generales de este trabajo fueron profundizar en el estudio de las vías de señalización activadas por el IGF-1 en el desarrollo y la función del oído interno de mamíferos, utilizando para ello la especie *M. musculus*. En este contexto, se plantea el estudio del papel de C-RAF y de la evolución de la expresión de la maquinaria molecular de la autofagia en el oído interno.

Para ello se desarrollaron los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el patrón de expresión de los factores de crecimiento insulínico (IGF) y de los miembros de la familia de las RAF quinasas *A-Raf*, *B-Raf*, y *C-Raf* en ratones deficientes en *Igf1*, *C-Raf* y ratones silvestres en estadios prenatales (E15,5 y E18,5) y postnatales y adultos (P0, P5, P15, P20, P30-60, P150, P270 y P365).

2. Estudiar el nivel de activación en la cóclea de las vías PI3K/AKT y de la cascada RAF-MEK-ERK en ratones deficientes en *Igf1*, *C-Raf* y silvestres en estadios prenatales (E18,5) y postnatales (P30-60 y P270).
3. Estudiar la presencia de la maquinaria molecular de la autofagia en el oído interno en estadios prenatales (E18,5) y postnatales (P0, P30-60, P150, P270 y P365). Así como, estudiar el papel que tiene el IGF-1 en este proceso utilizando para ello ratones deficientes en *Igf1* y animales con genotipo silvestre.
4. Estudiar la morfología y citoarquitectura del oído medio y la del interno en ratones deficientes en *C-Raf* y silvestres.
5. Realizar un estudio funcional de la respuesta auditiva de los ratones deficientes en *C-Raf* comparándola con la del genotipo silvestre y determinar si la deficiencia en el gen *C-Raf* causa o no alteraciones morfológicas o celulares durante el desarrollo prenatal y postnatal.
6. Evaluar la susceptibilidad de los ratones heterocigotos en *C-Raf* al daño causado por ruido en comparación con los animales silvestres, y estudiar los potenciales mecanismos moleculares implicados.

MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados fueron de calidad analítica. Sólo se indican las casas comerciales de aquellos de especial relevancia. Si no se indica la temperatura en el método descrito es que se ha realizado a temperatura ambiente.

3.1. Mantenimiento de los ratones y determinación de su genotipo

Los animales utilizados para la realización de esta tesis doctoral han sido mantenidos y sacrificados mediante procedimientos experimentales que cumplen la legislación de la Directiva de la Unión Europea (2010/63/UE), la legislación española RD (53/2013) y cuentan con la aprobación del Comité de Bioética del CSIC. Para la realización de este trabajo se han utilizado dos modelos experimentales de ratones genéticamente modificados que se describen a continuación.

3.1.1. Colonia *Igfl*

Se han utilizado ratones que tienen interrumpidas las dos copias del gen *Igfl* (*Igfl*^{-/-}), ratones heterocigotos (*Igfl*^{+/-}) y sus hermanos de camada con genotipo silvestre (*Igfl*^{+/+}) como control. El fondo genético de los animales fue un híbrido de OlaMF1 Hscl y 129sv/Ec/Tac para aumentar la supervivencia del ratón deficiente en *Igfl* (Liu *et al.*, 1993). La supervivencia postnatal de los ratones nulos osciló entre 10-20%, y menos de un 5% sobrevivieron pasado el año de edad (Riquelme *et al.*, 2010). No se han observado diferencias que puedan interferir en nuestro estudio entre los ratones macho y hembra y ambos han sido utilizados en este trabajo. En concreto, el número de ratones macho con genotipos salvaje y nulo en este estudio han sido los siguientes: 5 y 8 de P30-60, 5 y 3 de P90, 3 y 1 de P150, 7 y 8 de P270 y 3 y 1 de P365, respectivamente. En cuanto a ratones hembras con genotipo salvaje y nulo se han utilizado 8 y 6 de P30-60, 2 y 1 de P90, 1 y 2 de P150, 8 y 7 de P270 y 0 y 3 de P365, respectivamente. La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) para la identificación del genotipo de estos animales se realizó utilizando el kit REDExtract-N-AmpTMTissue PCR (xnat, Sigma). Para ello, se cortó una porción de las colas de los ratones, y se incubaron con solución de extracción y de preparación de tejido durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó a 95°C durante 3 minutos y se añadió solución de neutralización para detener la reacción. Finalmente, se conservó a 4°C hasta su

utilización. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) posterior fue llevada a cabo con un programa de ciclos térmicos formado por:

- Desnaturalización inicial: 1 ciclo a 94°C durante 10 minutos
- 30 ciclos de:
 - ✓ Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto
 - ✓ Acoplamiento de oligonucleótidos: 59°C durante 1 minuto
 - ✓ Elongación: 72°C durante 1 minuto
- Elongación final: 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos
- Mantenimiento: 4°C

El alelo silvestre de *Igf1* fue detectado utilizando los siguientes oligonucleótidos: Igf1For (5'-GTC TAA CAC CAG CCC ATT CTG ATT) e Igf1Rev (5'-GAC TCG ATT TCA CCC ACT CGA TCG) que generan un amplicón de 250 pb. El casete de resistencia a la neomicina fue detectado utilizando los oligonucleótidos NeoF (5'-GCT TGG GTG GAG AGG CTA TCC) y NeoR (5'-CCA GCT CTT CAG CAA TAT CAC GGG) produciendo una banda de 658 pb (**Figura 9a**).

3.1.2. Colonia *C-Raf*

El segundo modelo experimental utilizado en este estudio ha sido el de ratones que tienen interrumpido el gen *C-Raf* (*C-Raf*^{-/-}), en heterocigosis (*C-Raf*^{+/-}) y sus hermanos de camada con genotipo silvestre (*C-Raf*^{+/+}) como control. Estos ratones fueron facilitados por el Dr. Ulf Rapp del Instituto de Bioquímica Max Planck, Tübingen, Alemania (Wojnowski *et al.*, 1998). El fondo genético de los animales fue OlaMF1. Para la identificación de los genotipos de los ratones se realizó la extracción de ADN mediante el kit REExtract-N-AmpTMTissue PCR (xnat, Sigma) como se ha descrito en el apartado anterior. Posteriormente se realizó una PCR que fue llevada a cabo con un programa de ciclos térmicos compuesto por:

- Desnaturalización inicial: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos
- 29 ciclos de:
 - ✓ Desnaturalización: 94°C durante 1 minuto
 - ✓ Acoplamiento de oligonucleótidos: 55°C durante 1 minuto

- ✓ Elongación: 72°C durante 1 minuto
- Elongación final: 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos
- Mantenimiento: 4°C

Los oligonucleótidos de *C-Raf* con los que se llevó a cabo el genotipado fueron los siguientes: c-rafkoA (5'-ACA GAA AGT GTA GCT GCA GTG A), c-rafkoB (5'-ATT GAT TTG ATT GCC AGG TAT GAT) y c-rafkoC (5'-TGC GTC CAA TCC ATC TTG TTC AA). Para amplificar el alelo silvestre (335 pb) los oligonucleótidos fueron c-rafkoA y c-rafkoB, mientras que para detectar un fragmento del casete de neomicina (450 pb) se utilizaron c-rafkoA y c-rafkoC (**Figura 9b**).

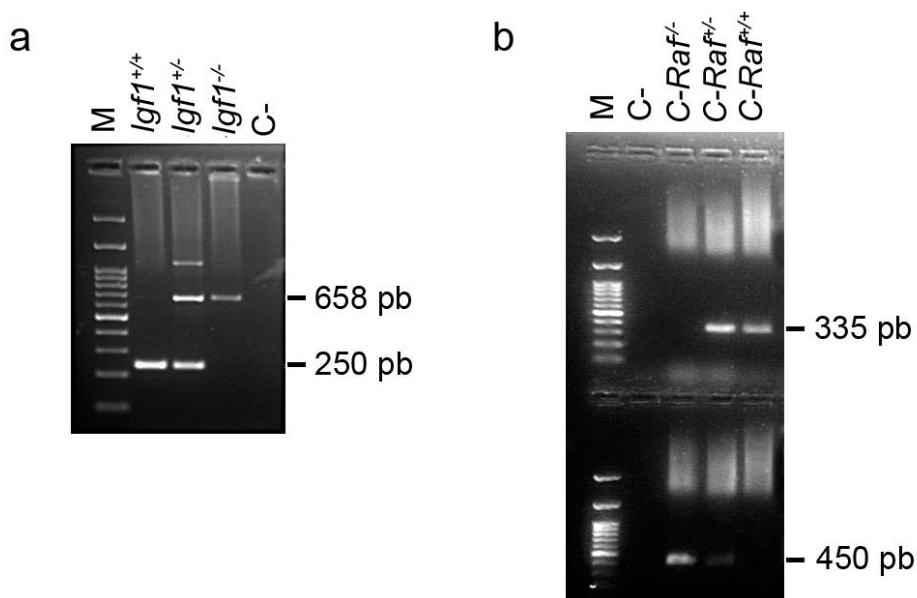


Figura 9. Análisis del genotipo de ratones mutantes *Igf1* y *C-Raf*. Imagen de un gel de agarosa al 1% con SYBR® Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific) en el que se separaron los productos de amplificación de la PCR mediante electroforesis. a) En los ratones *Igf1*^{+/-} se observó el amplicón del alelo silvestre (250pb) y el amplicón del fragmento del casete de neomicina (658 pb), mientras que en los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} sólo se amplificó un gen, *Igf1* o *Neo* respectivamente. b) En los ratones *C-Raf*^{+/-} se observó el amplicón del alelo silvestre (335pb) y el amplicón del fragmento del casete de neomicina (450 pb), mientras que en los ratones *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{-/-} se observó únicamente el amplicón del alelo silvestre (335pb) o el amplicón del fragmento del casete de neomicina (450 pb), respectivamente. M, marcador de peso molecular (100pb); C-, control negativo.

3.2. Evaluación *in vivo* de la respuesta auditiva

El grado de audición de los ratones se evaluó mediante la técnica de potenciales evocados auditivos del tronco cerebral o ABR (*Auditory Brainstem Responses*). La prueba de audición ABR es una técnica neurofisiológica no invasiva que permite la determinación del umbral auditivo y de la velocidad de conducción nerviosa entre las diferentes regiones del tronco cerebral. Se basa en la estimulación auditiva con sonidos de características conocidas (frecuencia, intensidad, velocidad de estimulación, etc) y el posterior registro de la actividad eléctrica generada por las neuronas en varias estaciones de la vía auditiva mediante electrodos colocados en posiciones estándar: en el vertex (electrodo activo), en el área ventrolateral al oído de registro, en este caso el derecho (electrodo de referencia) y en la región lumbar (electrodo de tierra).

El registro consta de una serie de ondas que aparecen a los 10 milisegundos siguientes a la presentación del estímulo sonoro. En el ratón se pueden observar 5 picos correspondientes a la actividad sináptica de los núcleos consecutivos a lo largo de la vía auditiva en el tronco del encéfalo: la cóclea y nervio auditivo (I), núcleo coclear (II), complejo olivar superior (III), lemnisco lateral (IV) y colículo inferior (V) respectivamente (Parham et al 2001).

Para la realización de esta técnica se anestesiaron los animales mediante una inyección intraperitoneal con una mezcla anestésica de ketamina (100 mg/kg; Imalgene, Merial) y xilacina (10 mg/kg; Rompun, Laboratorios Bayer). Posteriormente, se colocaron los ratones dentro de una caja de registro insonorizada, con el pabellón auditivo a una distancia fija de 5 cm respecto al altavoz. Se utilizaron dos estímulos auditivos distintos, tipo click formado por una mezcla de frecuencias desde 0 a 48 kilohercios (kHz), y tonos puros que van de 8 a 40 kHz, generados por el programa SigGenRPTM (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA). Los estímulos tipo click y tonos puros fueron presentados con una frecuencia de 30 y 50 pulsos por segundo respectivamente. Las ondas de ABR fueron recogidas en intervalos de 5 y 10 dB del nivel de presión sonora (dB SPL) a partir de la intensidad máxima de 90 dB SPL hasta 10 dB SPL y la respuesta eléctrica fue amplificada, registrada, promediada y analizada con el programa BioSigRPTM (Tucker-DavisTM Technologies). Esta técnica se realizó por el servicio ENNI (servicio de Evaluación Neurosensorial No Invasiva) del

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM), (<http://www.iib.uam.es/servicios/nine/en/intro.en.html>).

3.3. Pérdida auditiva inducida por ruido

Para el estudio de la respuesta a ruido en animales *C-Raf^{+/+}* y *C-Raf^{+/-}* de dos meses de edad se realizó un ABR basal, como se ha descrito en el apartado anterior, para confirmar que los ratones presentaban una función auditiva normal. Un par de días después, se introdujeron los ratones despiertos en una cámara reverberante, diseñada para alcanzar el máximo nivel de ruido con la mínima desviación en la zona central de la exposición (Cobo y Cuesta, 2009), y fueron expuestos a un ruido de alta frecuencia durante 30 minutos a una intensidad de 110 dB SPL. Este ruido fue diseñado por el programa Wavelab Lite (Wavelab Lite, Steinberg Media Technologies GMBH, Hamburg, Germany). Para determinar la magnitud de la alteración en el umbral de audición (dB SPL) y en las latencias de la onda (en milisegundos, ms) de los animales expuestos a ruido se realizaron pruebas de ABR, como se describe en el apartado anterior, a los 2, 14, 28 y 35 días después de la exposición al ruido (Sanz *et al.*, 2015). Estas pruebas se realizaron en paralelo con animales *C-Raf^{+/+}* y *C-Raf^{+/-}* no expuestos a ruido.

3.4. Evaluación de la función vestibular

Se realizó la evaluación de la función vestibular de ratones nulos para el gen *C-Raf*, ratones heterocigotos y ratones de genotipo silvestre de edad P20-40. Primero, se observaron los ratones para comprobar si presentaban patrones anormales en el comportamiento asociado a trastornos vestibulares como girar sobre sí mismo, tener la cabeza inclinada, o presentar una marcha anormal. Posteriormente, se evaluó el comportamiento de los ratones con los test que se describen a continuación. Esta técnica se realizó por el servicio ENNI del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM). Se realizó mediante la adaptación de protocolos estándares (<http://Empress.har.MRC.AC.uk>).

3.4.1. Prueba de la curvatura del tronco

Esta prueba se realizó cogiendo a los ratones por la cola y presentándoles una superficie horizontal. Los ratones que no presentaban trastornos vestibulares alcanzan la

superficie mientras que los ratones con un deterioro vestibular presentan un enrollamiento hacia su abdomen, conocido como avance abdominal.

3.4.2. Prueba de reposicionamiento

Para la realización de esta prueba se colocaron los ratones en un tubo de metacrilato de 3 cm de diámetro para que sus cuatro patas estuvieran en contacto con la parte inferior del tubo y la parte dorsal de los animales estuviese en contacto con la parte superior del tubo. Posteriormente se giró el tubo 180°, volcando el animal y se observó si los ratones volvían a la posición original. Por lo contrario, los animales que presentan alguna disfunción vestibular permanecen invertidos.

3.4.3. Prueba de natación

Se colocaron los ratones en un recipiente con al menos 15 cm de profundidad con agua a 24-26°C, lo cual permite nadar al ratón. Se observó durante un minuto a cada ratón y se evaluó su capacidad para nadar. Los animales con disfunciones vestibulares presentan comportamientos de natación anormales tales como nadar de forma circular, nadar de lado o presentar flotación inmóvil.

3.5. Obtención y preparación de las muestras para el análisis morfológico de la cóclea

Los ratones adultos de diferentes estadios: P5, P15, P20, P30-60, P90, P150, P270 y P365 se anestesiaron profundamente con una mezcla de pentobarbital sódico (Dolethal 100 ml, Vétoquinol) y posteriormente fueron perfundidos con paraformaldehído (PFA) al 4% con tampón salino fosfato (PBS; pH 7,4). A continuación se aislaron los oídos internos, se realizó una post-fijación en solución de fijación (PFA al 4%) durante 24 horas y se descalcificaron durante 8-10 días con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,3M [pH 6,5] a 4° C. Los embriones de estadios E15,5 y E18,5 fueron sacrificados mediante decapitación, después de anestesiar y perfundir a la madre como se describió anteriormente, y las cabezas de los embriones fueron post-fijadas en solución de fijación (PFA al 4%) durante 24 horas.

3.5.1. Inclusión en gelatina y congelación

Se lavaron las muestras varias veces en PBS (pH 7,4) durante 24 horas y se realizó un tratamiento para criopreservar los tejidos, sumergiendo los oídos internos y las cabezas de embriones en una solución de sacarosa al 15% en PBS (pH 7,4) a 4° C durante toda la noche, y posteriormente en una solución de sacarosa al 30% en PBS a 4° C durante toda la noche. A continuación, se sumergieron en una solución de 15% de sacarosa (Sigma) y 10% de gelatina (Panreac) en PBS (pH 7,4) durante 30 minutos a 37° C. Se orientó adecuadamente la muestra en moldes para realizar los bloques de gelatina y se dejó solidificar a 4° C. Una vez cortados los bloques de gelatina, se congelaron a -70° C en alcohol isopropílico (2-propanol), al que se añadió hielo seco para alcanzar dicha temperatura. Las criosecciones se obtuvieron con un micrótopo criostático (Leica CM 1900) con un grosor de 10 µm.

3.5.2. Inclusión en parafina

Se lavaron las muestras en agua destilada dos veces durante 30 minutos. Posteriormente se introdujeron en una serie de etanoles (Merck) de concentración creciente (70%, 80%, 96%, 100%) durante 1 hora en cada uno de ellos. A continuación, se sumergieron los oídos internos de ratones adultos y las cabezas de los embriones en xilol (Scharlau) 2 veces durante 1 hora y posteriormente se introdujeron las muestras en parafina durante toda la noche para llevar a cabo el proceso de inclusión. Posteriormente se realizó el bloque mediante el dispensador de parafina, introduciendo la pieza con la orientación deseada en el casete. Las secciones de 5 µm se obtuvieron con un microtopo automático Leica RM 2255.

3.6. Análisis morfológico y funcional de la cóclea

3.6.1. Análisis morfológico e inmunohistoquímica en secciones en parafina

Las secciones realizadas en parafina se utilizaron para el análisis de la citoarquitectura mediante tinción con hematoxilina-eosina y violeta de cresilo al 0,1% (Fluka; Sigma-Aldrich Quimica). Para ello se desparafinaron e hidrataron las secciones, primero en xilol, después en etanoles con concentraciones decrecientes (100%, 95%, 70%, 50%) y finalmente sumergiéndolas en agua destilada. A continuación, para la tinción con hematoxilina-eosina se tiñeron las secciones durante 1 minuto con

hematoxilina, se viró en agua durante 5 minutos y se sumergió en eosina 30 segundos. Para la tinción de violeta de cresilo al 0,1% se sumergieron las secciones en este colorante durante 5 minutos. Posteriormente, se volvieron a hidratar las secciones en concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 95%, 100%), xilol y finalmente se montaron utilizando Entellan (Merck Millipore). Las tinciones se analizaron con un microscopio Axiophot (Zeiss) de luz transmitida y epifluorescencia y se realizó la captura de imágenes con la cámara acoplada al microscopio DP70 (Olympus) con el sistema de captura de imágenes DP Controller.

Las secciones realizadas en parafina también fueron destinadas para estudios de inmunohistoquímica, en los cuales, después de desparafinar las secciones y rehidratarlas como se ha descrito anteriormente, se inhibió la peroxidasa endógena mediante PBS + agua oxigenada H₂O₂ (5%). Posteriormente, se realizó el bloqueo de los lugares inespecíficos en solución de bloqueo (PBS-Tritón 0,05%, suero bovino adulto (BSA) 3%, suero normal de cabra (NGS) 3%, pH 7) y se incubó con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en PBS-Tween 0,05%, Tritón 0,1%, pH 7,4 durante toda la noche a 4°C. Tras esto, se incubó con el apropiado anticuerpo secundario biotinilado (1:200, CHEMICON) durante 2 horas, seguido de una tercera incubación (1:200, streptavidin-HRP, Sigma) de 1 hora. Por último, se reveló con diaminobencidina (DAB), se deshidrataron, como se describió anteriormente, y se montaron utilizando Entellan (Merck Millipore). Estas inmunohistoquímicas se analizaron con un microscopio Axiophot (Zeiss) de luz transmitida y epifluorescencia y se realizó la captura de imágenes con la cámara acoplada al microscopio DP70 (Olympus) con el sistema de captura de imágenes DP Controller.

Las fotos fueron tomadas con objetivos de 4X, 20X, 40X y 63X usando los mismos parámetros de iluminación para cada objetivo y capturadas mediante el programa DPController (v.1.1.1.65, Olympus Optical). Posteriormente, se utilizó el programa informático Photoshop CS4 y CS6 (Adobe systems) para el procesamiento final de las fotos.

3.6.2. Inmunohistofluorescencia en criosecciones

Para estudios de inmunohistofluorescencia se utilizaron secciones en criostato. Después de permeabilizar con PBS-T (0,05%) pH 7,4, las secciones se bloquearon en

solución de bloqueo (PBS-Tritón 0,05%, BSA 3%, NGS 3% pH 7) durante 1 hora. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 1**), diluidos en PBS-Tween 0,05%, Tritón 0,1%, pH 7,4 durante toda la noche a 4°C. Después, se incubaron con los anticuerpos secundarios (1:200, Alexa 546; Alexa 488, Invitrogen). Por último, se llevó a cabo el montaje con el medio Prolong Gold con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen) para identificar los núcleos. La fluorescencia en secciones se analizó de dos formas distintas:

- A) Con un microscopio de fluorescencia Nikon 90i utilizando los filtros para DAPI, FITC y TexasRed. Las imágenes fueron capturadas por la cámara digital acoplada (DS-QiMc) con objetivos de 4X, 20X, 40X, 63X y 100X usando los mismos parámetros para cada objetivo y procesadas mediante el programa NisElements 3.01.
- B) Con un microscopio confocal espectral LSM710 (Zeiss). Se utilizaron los objetivos 20, 40 y 63X y se tomaron imágenes de planos cada 2 µm en el eje Z para cada uno de los fluorocromos utilizados (láseres 488 y 561). El programa de adquisición y análisis de imagen que se utilizó fue el Zen2009.

Posteriormente, se utilizó el programa informático Photoshop CS4 y CS6 (Adobe systems) para el procesamiento final de las fotos.

3.6.3. Cuantificación de la inmunohistofluorescencia

La cuantificación de las inmunohistofluorescencias se realizó, al menos, en 3 animales de cada genotipo/grupo experimental, y de cada animal se analizaron 1 ó 2 portas con cuatro cortes equivalentes en cada porta. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio de fluorescencia Nikon 90i utilizando los filtros para FITC y TexasRed por la cámara digital acoplada (DS-QiMc). Se utilizaron los objetivos de 10X y 20X usando los mismos parámetros para cada objetivo. Posteriormente se procesaron las imágenes mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). La cuantificación con ImageJ se realizó de dos formas distintas según el tipo de anticuerpo utilizado, como se describe a continuación:

3.6.3.1. Cuantificación por intensidad de señal

Se realizó este tipo de cuantificación para los anticuerpos neurofilamento, sinaptofisina, Kir4.1, mielina P0, KCNQ1 y LC3b. Primero se substrajo el fondo de todo el conjunto de imágenes de cada anticuerpo por igual, para visualizar exclusivamente la señal específica. Posteriormente, se eliminaron los puntos brillantes (*outliers*) que no forman parte de la señal. Seguidamente, se seleccionó en una de las imágenes el área correspondiente de interés en la cóclea originando así una “región de interés” o ROI (región of interest) y se trasladó dicho ROI al resto de las imágenes. Finalmente, se obtuvieron los datos de la intensidad de señal por cada pixel, que varía de 0 a 255, dentro del ROI generado para cada imagen.

3.6.3.2. Cuantificación por número de células positivas

Se realizó este tipo de cuantificación para los anticuerpos Sox2 y miosina VIIa. Primero se substrajo el fondo de todo el conjunto de imágenes de cada anticuerpo por igual, para visualizar exclusivamente la señal específica. Posteriormente, se seleccionaron las células positivas para la señal y se obtuvieron los datos del número de células seleccionadas en el área de interés para cada imagen.

3.7. Extracción y análisis de proteínas

3.7.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas de cóclea, vestíbulo y cerebro se utilizaron 3-6 ratones por cada grupo experimental de distintos estadios (E18,5, P20, P90 y P270). Para ello se utilizó el kit Ready Prep Protein Extraction (BioRad 163-2086). Se homogeneizaron en 100-150 μ l de buffer de extracción (2-D Rehydration-Sample Buffer) al que se le añadió 0,01% del agente reductor tributilfosfina (TBP), y 0,01% de inhibidores de proteasas (P8340) y fosfatasa (P5726) (Sigma). Posteriormente, se centrifugaron a 16.000 g durante 30 minutos, y se guardó el sobrenadante a -80°C hasta su posterior utilización.

Tabla 1. Resumen de los anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica y Western blotting.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Tipo</i>	<i>Proveedor/Cat #</i>	<i>Concentración</i>
Anti-14-3-3 ζ/δ D7H5	RbP	Cell Signaling/7413	1:1000 (WB)
Anti- β -actina	Mou	Sigma/A5441	1:5000 (WB)
Anti-Akt1/2	GP	Santa Cruz/sc-1619	1:1000 (WB)
Anti- Akt ^{Ser473} fosforilada	RbP	Cell Signaling/9271	1:1000 (WB)
Anti-A-RAF	RbP	Santa Cruz/sc-408	1:1000 (WB)
Anti-B-RAF H145	RbP	Santa Cruz/sc-9002	1:1000 (WB)
Anti-B-RAF fosforilada	RbP	Cell Signaling/ 2696	1:1000 (WB)
Anti-C-RAF fosforilada	Mou	BD/ 610152	1:500 (WB)
Anti- C-RAF	RbP	Cell Signaling/9427	1:1000 (WB)
Anti-ERK	RbP	Cell Signaling/9102	1:1000 (WB)
Anti- ERK fosforilada	RbP	Cell Signaling/ 9101	1:1000 (WB)
Anti-SAPK/JNK	RbP	Cell Signaling/ 9252	1:1000 (WB)
Anti-SAPK/ fosforilada	RbP	Cell Signaling/ 4668	1:1000 (WB)
Anti-KCNQ1	RbP	Santa Cruz/sc-20816	1:200 (IHC)
Anti-Ki 67	Rb	Master Diagnostica/0264-02	1:200 (IHC)
Anti-Kir4.1	RbP	Chemicon/AB5818	1:200 (IHC)
Anti-LC3B	RbP	Cell Signaling/ 2775	1:100 (IHC)
Anti-LC3	RbP	MBL/ PD014	1:1000 (WB)
Anti-mielina P0	ChP	NOVUS Biologicals/NB100-	1:100 (IHC)
Anti-miosina VIIa	RbP	Proteus/ PT-25-6790	1:150 (IHC)
Anti-Na ⁺ /K ⁺ - ATPasa	RbP	Upstate/06-171	1:400 (IHC)
Anti-neurofilament	Mou	Millipore	1:100 (IHC)
Anti-P38 MAP kinase	RbP	Cell Signaling/9212	1:2000 (WB)
Anti- P38 MAP fosforilada	RbP	Cell Signaling/9211	1:5000 (WB)
Anti-PARP-1	RbP	Santa Cruz/sc-7150	1:1000 (WB)
Anti-sinaptofisina	RbP	DAKO/IR776	1:100 (IHC)
Anti-Sox2	GP	Santa Cruz/sc-17320	1:50 (IHC)
Anti-SQSTM1/p62	RbP	MBL/PM045	1:1000 (WB)

Tipo de anticuerpo: RbP, policlonal de conejo; RbM, monoclonal de conejo; MouM, monoclonal de ratón; GP, policlonal de cabra; ChP, policlonal de pollo. Abreviaturas: IHC, inmunohistoquímica; WB, Western blotting.

3.7.2. Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína de las muestras se determinó con el kit RC DC-protein assay (BioRad 500-0119) utilizando BSA como muestra estándar para calcular la recta patrón. Las medidas de absorbancia, con una longitud de onda de 750 nm, fueron obtenidas utilizando VERSAmax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices) y el programa Softmax Pro (Molecular Devices).

3.7.3. Determinación de los niveles de proteína y su grado de activación mediante *Western blotting*

El análisis de los niveles de proteínas y/o su grado de activación fue llevado a cabo mediante *Western blotting* (WB). Se llevó a cabo la electroforesis en geles “Mini-Protean-TGX”, AnyKd o del 10% (BioRad), cargando la misma cantidad de proteína. El tampón de electroforesis utilizado consta de 10% de Tris-glicina, 1% de dodecilsulfato sódico al 10% (SDS) y 89% de agua destilada, pH 8,3. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a una membrana Trans-Blot Turbo, Midi Format, 0,2 um PVDF (Biorad 456-9033), utilizando el equipo Trans Blot Turbo (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Para comprobar si la transferencia se realizó correctamente, se tiñeron los geles durante 10 minutos en agitación con azul de Coomassie y posteriormente se destiñeron con una solución que contiene 20% metanol y 8% ácido acético. Después, se bloquearon las membranas en solución de bloqueo formada por 5% leche en polvo deshidratada o BSA (Sigma) según indique la casa comercial del anticuerpo utilizado y tampón tris salino (TBS), 0,05% Tween, pH 7, durante 1 hora y seguidamente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 1**) diluidos en una solución compuesta por 1% leche en polvo o BSA, TBS 1X, 0,05% Tween, pH 7, durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, se lavaron las membranas y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxidase) (1:3000, anti-mouse-HRP, ATOM; 1:3000, anti-rabbit-HRP, BioRad; 1:3000, anti-goat-HRP, Santa Cruz) durante una hora. A continuación, se llevó a cabo el revelado utilizando un sistema de quimioluminiscencia con el kit ECL-Plus (Clarity Western ECL Substrate, BioRad 170-5060) y se visualizó y se capturaron las imágenes en el equipo ImageQuant LAS 4000 mini (GE, Healthcare). Las bandas se cuantificaron por densitometría con el programa de procesamiento ImageQuantTL 8.1

(GE, Healthcare). Se utilizaron distintos tiempos de exposición para asegurarnos de que las bandas no estuviesen saturadas.

3.8. Análisis del transcriptoma de la cóclea mediante arrays

3.8.1. Extracción de ARN

Para el análisis del transcriptoma coclear se diseccionaron las cócleas de 6 ratones *Igfl*^{+/+} y de 6 ratones *Igfl*^{-/-} de estadio E18,5 y se realizó la extracción de ácido ribonucleico (ARN). Se realizaron 3 experimentos independientes por cada genotipo que constaron de 2 ratones cada uno. Se extrajo el ARN total y se homogenizó el tejido de cada muestra en 1 ml de Trizol (Invitrogen) por cada 50-100 mg de tejido y se incubó durante 5 minutos. Se añadió cloroformo (0,2 ml, v:v Trizol), se agitó durante 15 segundos y se incubó 3 minutos. Después, se centrifugó a 11.200 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4° C y se separó la interfase de ARN. Se añadieron 7,5 µg de glucógeno (Sigma), para co-precipitar el ARN. Después se añadieron 0,5 ml, v:v Trizol y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 11.200 rpm durante 10 minutos a 4° C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se realizó un lavado con etanol al 75 % y se centrifugó a 7.200 rpm durante 5 minutos a 4° C. Se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 25 µl de agua libre de ARNasas. Se incubó durante 10 minutos a 60° C y se eliminó el ADN residual mediante un tratamiento con ADNasa, utilizando el kit TURBO DNA-free kit (Applied Biosystems), según las instrucciones del fabricante. La integridad y concentración del ARN se determinaron con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies).

3.8.2. Hibridación de los arrays

A continuación, se generó el ADN complementario (ADNc) con el Kit “one-Cycle cDNA Synthesis” a partir del ARN extraído. Posteriormente el ADNc fue purificado y utilizado como una plantilla para las reacciones de transcripción *in vitro* posteriores que se llevaron a cabo mediante la ARN polimerasa T7 y en presencia de nucleótidos biotinilados para la amplificación del ARN complementario (ARNc) y su marcaje con biotina. El ARNc fue hibridado a los arrays MOE430A Genechips® (Affymetrix, Santa Clara, CA). Por último, los chips se tiñeron con el complejo estreptavidina-ficoeritrina y se escanearon para digitalizar la señal (GeneChip® Scanner

3000 7G 4C, Affymetrix). La calidad de la hibridación se validó mediante controles de calidad internos utilizando genes constitutivos. El perfil de expresión coclear se analizó por triplicado utilizando GeneChip® Mouse Genome 430A2.0 Array (Affymetrix). Los resultados se depositaron en el repositorio de datos de genómica funcional pública GEO (Gene expresión Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) con número GSE11821. Esta técnica se realizó en la unidad de genómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (CSIC-Universidad de Salamanca), (<http://www.cicancer.org/es/unidad-de-genomica>).

3.8.3. Análisis de los niveles de expresión génica

Para realizar la estimación de los niveles de expresión génica de los datos de arrays obtenidos con el GeneChip primero se realizó el análisis preliminar con el programa MAS5.0 (Affymetrix) y “Robust Multiarray Average” (RMA). Este análisis calcula la señal de expresión a partir de los datos crudos generados por los arrays de alta densidad de oligonucleótidos e indicó que había una variabilidad muy alta, que fue asociada a la variabilidad biológica y a la hibridación no específica. Esto se debe a que la mayoría de los genes específicos de tejido se expresa en niveles bajos en esta etapa del desarrollo y la señal de fondo de los genes comunes con otros tejidos genera una relación señal/ruido muy alta. Posteriormente, junto con la colaboración de la Dra. Marta Milo (Universidad de Sheffield), se utilizó el paquete de software PUMA del inglés “Propagating Uncertainty in Microarray Analysis” (<http://www.bioconductor.org>), en concreto el modelo Multi-mgMOS (multi-chip modified gamma model for oligonucleotide signal). La expresión génica se analizó de forma más exhaustiva mediante una combinación del análisis del *fold change* (FC) y del método de Probabilidad de cociente de registro positivo o PPLR (probability of positive log ratio) para reducir el número de falsos positivos. Esta probabilidad es una medida de las detecciones de falsos positivos en la expresión diferencial y permite la selección de los genes diferencialmente expresados (DE) seleccionados según la robustez de la predicción. En este estudio definimos los genes diferencialmente sobre-expresados en los ratones *Igf1*^{-/-} como aquellos que presentan un FC positivo mayor que 1 asociado con una probabilidad superior a 0,95. Por el contrario, definimos a los genes disminuidos diferencialmente expresados como aquellos que presentan un valor de FC negativo menor de -1 con una probabilidad asociada menor a 0,05.

3.9. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

3.9.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN de cócleas, vestíbulo, núcleos cocleares y cerebro se realizó en 3-6 embriones o ratones adultos postnatales, de diferentes estadios: E15,5, E18,5, P5, P15, P20, P30-60, P90, P150, P270 y P365. Fue llevada a cabo mediante el kit RNeasy (Quiagen). Se extrajo el ARN total y se homogeneizó el tejido de cada muestra en Tissue Lyser. Posteriormente, se incubó el homogeneizado durante 5 minutos y se añadieron 200 µl de cloroformo. Se volvió a incubar durante 2-3 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se transfirió el sobrenadante que contiene el ARN a un tubo nuevo y se añadió 600 µl de etanol al 70%. Seguidamente, se transfirieron 700 µl de la muestra a una columna de RNeasyMini Spin y se centrifugó a 8.000 g durante 15 segundos, descartando el líquido generado. Se agregó 700 µl de Buffer RW1 a la columna RNeasy y se centrifugó a 8.000 g durante 15 segundos descartando el líquido generado. Posteriormente, se añadieron 500 µl de Buffer RPE a la columna y se centrifugó a 8.000 g durante 15 segundos y se repitió este paso dos veces descartando el líquido generado. Finalmente, se añadieron 50 µl de agua libre de RNasa a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 g para diluir el ARN. La integridad y concentración del ARN se determinaron con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies).

3.9.2. RT-qPCR

Posteriormente, se analizó la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR). El ADNc se generó mediante transcripción inversa (RT) con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), y se hibridó con las sondas TaqMan® especificadas en la **Tabla 2**. Como control de la RT se utilizaron el gen endógeno que codifica para el ARN ribosómico (ARNr) *18S* eucariótico y el gen endógeno de la proteína ribosomal grande P0 (*Rplp0*). La reacción se llevó a cabo con el equipo de Real-Time PCR 7900HT (Applied Biosystem). Esta técnica se realizó por el servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM) (<https://www.iib.uam.es/portal/web/genomica>). Los valores de la cuantificación relativa de la expresión génica (RQ) fueron calculados utilizando el

método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Posteriormente se realizó una representación gráfica de los datos expresados como la media de los valores $RQ \pm SEM$.

Tabla 2. Sondas TaqMan®.

<i>Gen</i>	<i>Referencia de la sonda</i>
<i>18s</i>	Hs03003631_g1
<i>Atg4b</i>	Mm01701111_m1
<i>Atg5</i>	Mm00504340_m1
<i>Atg9a</i>	Mm01265461_m1
<i>Becn</i>	Mm01265461_m1
<i>Cox2</i>	Mm03294838_g1
<i>Foxm1</i>	Mm00514924_m1
<i>Foxg1</i>	Mm02059886_s1
<i>Gap43</i>	Mm00500404_m1
<i>Gmf-b</i>	Mm01322969_m1
<i>Igf1r</i>	Mm00802831_m1
<i>Igf2</i>	Mm00439564_m1
<i>Ins2</i>	Mm00731595_gH
<i>Mapk14</i>	Mm00442498_m1
<i>Mash1</i>	Mm03058063_m1
<i>Mef2d</i>	Mm00504931_m1
<i>MPz</i>	Mm00485141_g1
<i>Ntn1</i>	Mm00500896_m1
<i>p27kip1/Cdkn1b</i>	Mm00438168_m1
<i>A-Raf</i>	Mm00550186_m1
<i>B-Raf</i>	Mm01165837_m1
<i>C-Raf</i>	Mm00466513_m1
<i>RbFox3</i>	Mm01248771_m1
<i>Rplp0</i>	Mm00725448_s1

Resumen de las sondas TaqMan utilizadas en el ensayo de análisis génico mediante RT-qPCR.

3.10. Detección de la muerte celular mediante la técnica de TUNEL

La muerte celular se detectó mediante la técnica de TUNEL (*Terminal Transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labelling*) que va a marcar el ADN genómico fragmentado, característico de la muerte celular programada. Se utilizó el kit ApopTag (Millipore). Se fijaron criosecciones de 10 μm utilizando PFA 1%, pH 7.4 durante 10 minutos y posteriormente se post-fijaron en etanol/ácido acético (2:1, v:v) durante 5 minutos a -20°C . Se bloqueó en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS, durante 5 minutos. Las criosecciones se incubaron con el tampón de equilibrado (Equilibration buffer) del kit durante 10 minutos. A continuación, se incubaron con la encima TdT (Working strength TdT enzyme) a 37°C durante 1 hora y se aplicó un buffer para parar la reacción agitando durante 15 segundos e incubando durante 10 minutos. Posteriormente, se aplicó a las criosecciones peroxidasa conjugada con anti-digoxigenina en cámara húmeda durante 30 minutos. Las células apoptóticas fueron visualizadas mediante el revelado con DAB. Por último, una vez revelado el DAB, se deshidrataron las muestras pasándolas a tres cubetas de xileno durante 2 minutos cada una y se montaron utilizando Entellan (Merck Millipore). El marcaje de TUNEL en las criosecciones se analizó con un microscopio Axiophot (Zeiss) de luz transmitida y epifluorescencia y se realizó la captura de imágenes con la cámara acoplada al microscopio DP70 (Olympus) con el sistema de captura de imágenes DP Controller. La cuantificación de los núcleos positivos a TUNEL en el Órgano de Corti se realizó mediante el programa ImageJ, como se describió anteriormente, en 6 portas de animales $C-Raf^{+/+}$ no expuestos a ruido, 10 de $C-Raf^{+/+}$ expuestos a ruido, 8 de $C-Raf^{+/-}$ no expuestos a ruido y 10 de $C-Raf^{+/-}$ expuestos a ruido. Para ello se utilizaron al menos 3 ratones de cada genotipo y grupo experimental.

3.11. Disección del oído medio

Para la disección del oído medio se utilizaron 3 ratones adultos de estadio P30 de cada genotipo $C-Raf^{-/-}$, $C-Raf^{+/-}$ y sus hermanos de camada con genotipo salvaje $C-Raf^{+/+}$ como control. En cada caso, se decapitó al animal y se separó la cabeza en dos mitades. Se extrajo el cerebro, se retiró el músculo y se diseccionaron los huesecillos del oído medio: martillo, yunque y estribo. Una vez extraídos se lavaron con PBS (pH7,4) y se almacenaron en formalina al 10% (Sigma). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital asociada a un estereomicroscopio Leica MZ8 (Leica).

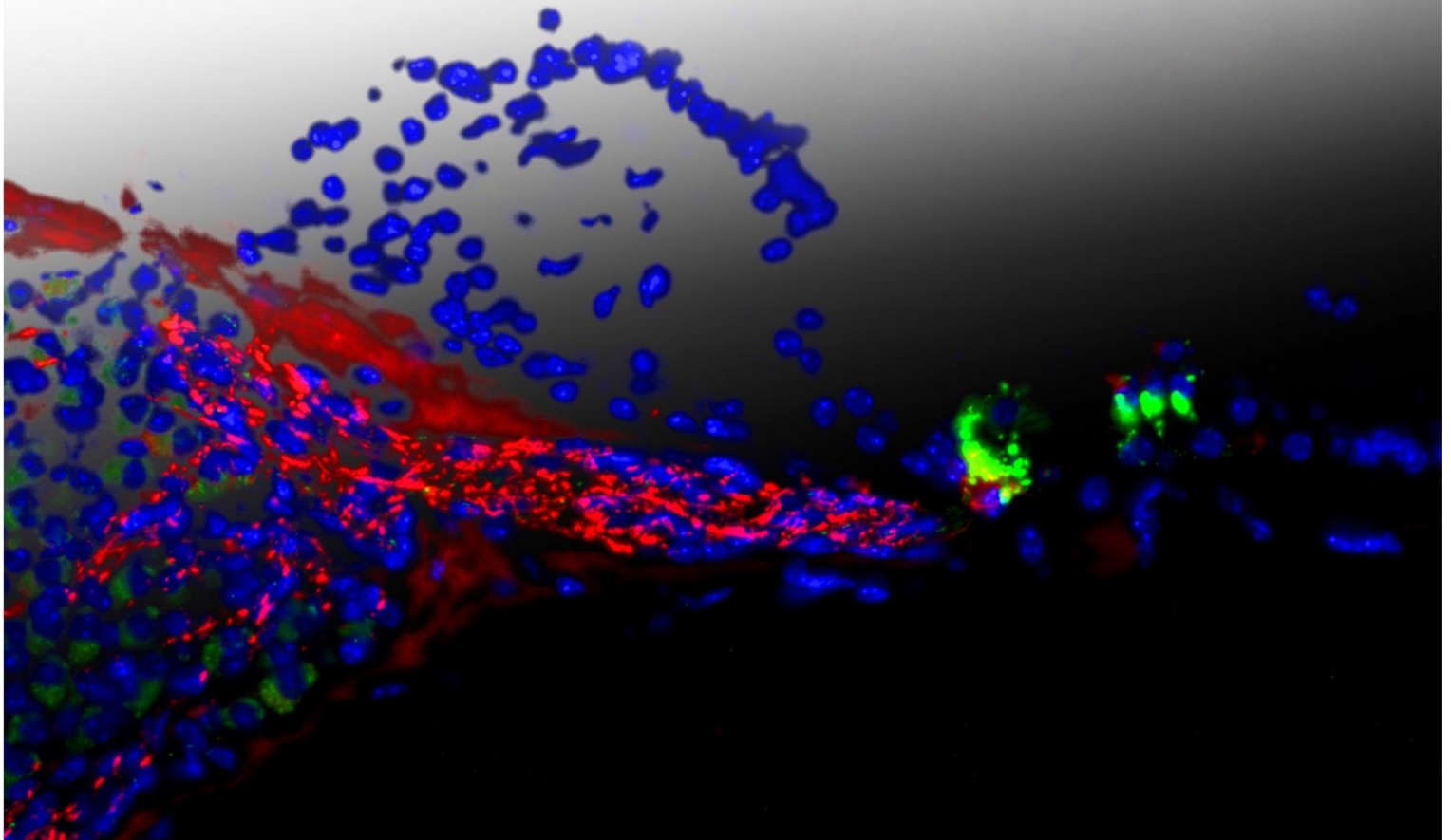
3.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico general se llevó a cabo mediante la prueba *t* de Student correspondiente para muestras pareadas o independientes cuando se comparan dos grupos y el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos colas para comparar las medias de tres o más grupos. Para ello se utilizó el programa SPSS v19.0 (*Software Package Sigmastat-Sigmaplot*; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se realizaron las pruebas de rango Post-Hoc para identificar subconjuntos homogéneos de medias que no difieren entre sí. Entre estas pruebas se realizó el test de Bonferroni, la prueba de Tukey y el método de la Diferencia Mínima de Fisher cuando se asume que las varianzas son iguales.

Para la comparación global de la expresión génica entre los grupos de los órganos, genotipos y edades de los ratones *Igf1^{+/+}* y *Igf^{-/-}*, se realizó un estudio mediante un análisis de varianza multivariante de tres vías (MANOVA), seguido del estudio por pares con la prueba *t* de Student para definir los efectos significativos de los niveles individuales y de las pruebas Post-Hoc, como se describe anteriormente.

Los valores presentados en este trabajo se muestran como la media±SEM. Los niveles de significación mínimos estadísticos se definieron como significativos para $p < 0,05$ y se estableció como se detalla a continuación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Patrón temporal de expresión de los componentes del sistema IGF y su señalización intracelular

4.1.1 La expresión de los elementos del sistema IGF aumenta con el déficit de *Igf1* en la cóclea del ratón adulto

EL IGF-1 es un factor clave para la diferenciación, maduración y mantenimiento funcional del oído interno en mamíferos. Además, se ha descrito que el déficit en IGF-1 causa sordera neurosensorial y alteraciones celulares en el ratón adulto (Murillo-Cuesta *et al.*, 2011). Para profundizar en el estudio del papel de los elementos del sistema IGF en el oído interno de ratón, se analizaron los perfiles de expresión temporal de los genes del receptor de alta afinidad del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (*Igf1r*), el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 2 (*Igf2*), y la insulina tipo 2 (*Ins2*). Este estudio se llevó a cabo mediante RT-qPCR a partir del ARN extraído de las cócleas de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} de edades E18,5, P30-60, P270 y P365.

Se observó una disminución significativa del transcrito de *Igf1r* a lo largo de las edades estudiadas en animales *Igf1*^{+/+}. Los valores RQ de los ratones P30-60, P270 y P365 fueron $0,79 \pm 0,12$, $0,56 \pm 0,09$ y $0,12 \pm 0,07$, respectivamente, comparándolos con los ratones E18,5. Cuando se compararon los ratones nulos para *Igf1* respecto a los silvestres de edades P30-60 y P270 (**Tabla 3**) se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm del *Igf1r*. Estos resultados sugieren que el déficit de *Igf1* se está compensando a nivel de su receptor a partir del mes de vida mediante un aumento en la expresión de éste.

La expresión de *Igf2*, se mantuvo elevada en la cóclea de los ratones silvestres durante el desarrollo embrionario (E18,5) y disminuyó significativamente después del nacimiento (P0). Los valores de RQ observados en los ratones P30-60, P270, P365 fueron $0,07 \pm 0,02$, $0,05 \pm 0,00$ y $0,01 \pm 0,00$, respectivamente, al compararlos con los ratones E18,5. Además, los resultados del estudio revelaron un aumento significativo en los niveles de expresión de *Igf2* en los ratones P270 nulos para *Igf1* cuando los comparamos con los silvestres de la misma edad (**Tabla 3**), lo que sugiere que la ausencia de *Igf1* también se está compensando con el *Igf2* a la edad de P270. El transcrito de la insulina de tipo 2, *Ins2*, no fue detectado en ninguno de los estadios estudiados (**Tabla 3**).

Tabla 3. Patrón temporal de la expresión de los genes del sistema IGF en la cóclea.

Edad (días)	Gen	Cuantificación relativa (RQ)
E18,5	<i>Igf1R</i>	1,09±0,09
	<i>Igf2</i>	0,62±0,02
	<i>Ins2</i>	ND
P30-60	<i>Igf1R</i>	2,06±0,16*
	<i>Igf2</i>	2,98±0,68
	<i>Ins2</i>	ND
P270	<i>Igf1R</i>	2,88±0,21**
	<i>Igf2</i>	2,84±0,57*
	<i>Ins2</i>	ND
P365	<i>Igf1R</i>	0,72±0,18
	<i>Igf2</i>	0,81±0,26
	<i>Ins2</i>	ND

Niveles de expresión de los genes *Igf1r*, *Igf2* e *Ins2* en ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* de edades E18,5, P30-60, P270 y P365 utilizando la RT-qPCR. Los valores del RQ fueron calculados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como el RQ±SEM de los niveles la expresión relativa de los ratones *Igf1^{-/-}* respecto a los *Igf1^{+/+}*. Se evaluaron al menos tres ratones de cada genotipo por triplicado. *P<0,05 versus *Igf1^{+/+}* y **P<0,01 versus *Igf1^{+/+}*. ND: No detectado.

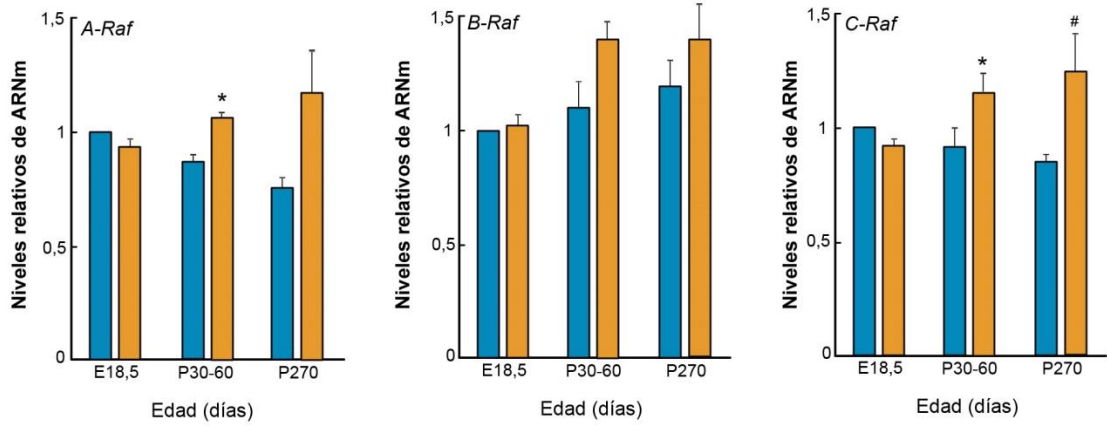
4.1.2 Patrón temporal de la actividad de quinasas moduladas por IGF-1

Cuando el IGF-1 se une a su receptor de alta afinidad se activan las vías de señalización PI3K/AKT, fundamental para el control de la supervivencia celular (Yin *et al.*, 2013) y la vía RAF-MEK-ERK que induce la proliferación y la diferenciación celular (Suojun *et al.*, 2012).

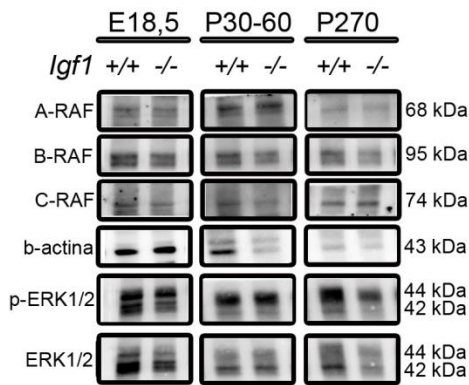
Con el fin de analizar el papel de las RAF quinasas, se estudió el patrón temporal de expresión de los genes que codifican para sus tres isoformas, *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf*, mediante RT-qPCR a partir del ARN extraído de las cócleas de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* de edades E18,5, P30-60, P270 (**Figura 10a**). Se observó un patrón temporal de expresión, normalizado frente a la edad E18,5, de *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf* similar en las tres edades estudiadas en los animales con genotipo silvestre (**Figura 10a**). Cuando comparamos los ratones *Igf1^{-/-}* respecto a los silvestres se observó que el nivel de expresión del transcrito de *A-Raf* en ratones P30-60 presentó un aumento significativo. También se observó un aumento significativo en los niveles de *C-Raf* de los ratones *Igf1^{-/-}* cuando los comparamos con los ratones *Igf1^{+/+}* en las edades P30-60 y P270 (**Figura 10a**). Sin embargo, el transcrito de *B-Raf* no presentó diferencias significativas entre genotipos en las edades estudiadas (**Figura 10a**). Estos resultados sugieren que el déficit de *Igf1* causa un aumento en los niveles del transcrito de las isoformas *A-Raf* y *C-Raf*.

Se analizaron los extractos de proteína de las cócleas de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}* de edades E18.5, P30-60, P270 mediante WB (**Figura 10b y c**). Como cabía esperar con los resultados del ARNm, no se observaron diferencias en el patrón temporal de expresión de A-RAF, B-RAF y C-RAF en las tres edades estudiadas de ratones con genotipo silvestre. Sin embargo, se observó un aumento significativo de 3,6 veces en la expresión de la proteína A-RAF en los animales nulos para *Igf1* P30-60 cuando los comparamos con los de genotipo silvestre, y un aumento de 5 veces y 1,5 veces en la expresión de C-RAF en los ratones *Igf1^{-/-}* P30-60 y P270, respectivamente. B-RAF no presentó diferencias significativas entre genotipos en ninguna de las edades estudiadas (**Figura 10b y c**). El estudio de la fosforilación de la principal diana de las RAF quinasas, ERK fosforilado, mostró que la ruta está activada en las edades estudiadas, pero no se observaron diferencias entre los dos genotipos estudiados (**Figura 10b y c**).

a



b



c

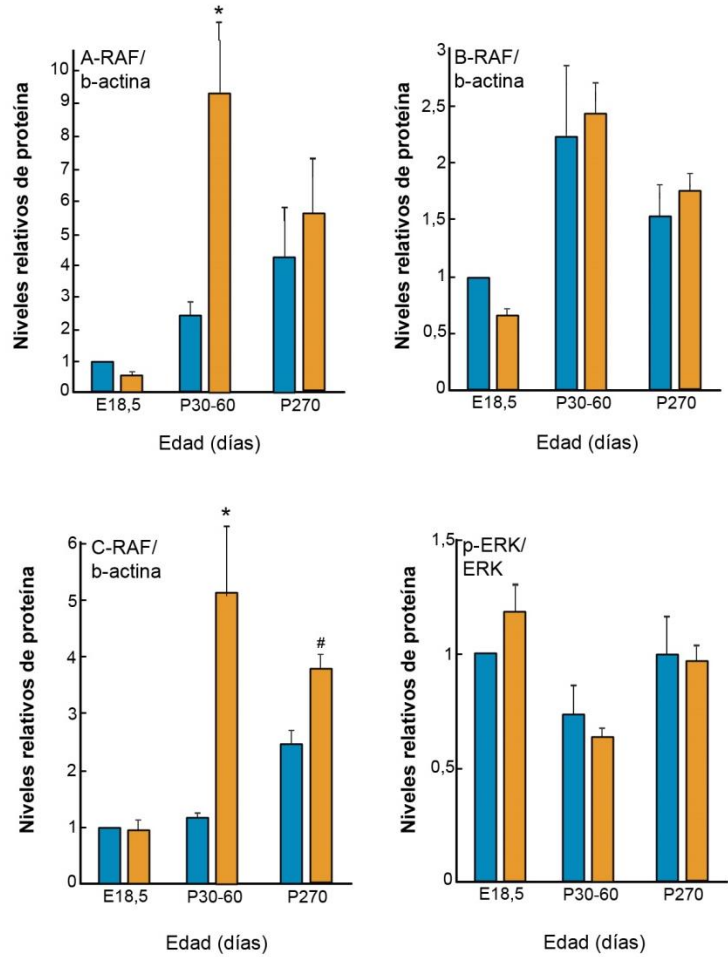


Figura 10. La expresión de los genes *A-Raf* y *C-Raf* aumenta en los animales nulos para *Igf1*. a) Niveles de la expresión coclear en distintas edades (E18,5, P30-60 y P270) de los genes *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf* en ratones *Igf1*^{+/+} (azul) e *Igf1*^{-/-} (naranja). Se utilizó el gen del ARNr *18s* eucariótico como gen endógeno control. Se estudiaron muestras de 3-6 ratones de cada genotipo por triplicado para las edades indicadas. La expresión génica fue calculada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los datos se normalizaron frente a los ratones E18,5 y se expresaron como la media \pm SEM. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando la prueba t de Student. *P<0,05 versus P30-60 *Igf1*^{+/+} y #P<0,05 versus P270 *Igf1*^{+/+}. b) Bandas representativas de los niveles de A-RAF, B-RAF y C-RAF empleando como control la β -actina y de la activación de p-ERK/ERK en ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}. c) Cuantificación de los niveles de A-RAF, B-RAF y C-RAF y de la relación p-ERK/ERK obtenida tras densitometrar los resultados de WB con el programa ImageJ. Los datos se normalizaron frente a los ratones E18,5 y se expresaron como la media \pm SEM. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando la prueba t de Student. *P<0,05 versus P30-60 *Igf1*^{+/+} y #P<0,05 versus P270 *Igf1*^{+/+}.

Posteriormente, se analizaron mediante WB otras quinasas reguladas por IGF-1 implicadas en supervivencia y estrés celular: p-AKT, p-p38. Este estudio se realizó con los extractos de proteína de las cócleas de ratones *Igf1*^{+/+} y *Igf1*^{-/-} de edades E18,5, P30-60, P270 (**Figura 11a**). No se observaron diferencias significativas en la expresión de p-AKT entre los animales de genotipo silvestre en las diferentes edades estudiadas, sin embargo, se produjo una disminución significativa de la expresión de p-AKT en animales *Igf1*^{-/-} de edades E18,5 y P30-60, al compararlos con los *Igf1*^{+/+} (**Figura 11b**). El patrón temporal de la expresión de p-p38 en animales con genotipo silvestre varió con una disminución significativa en el estadio P30-60 al compararlo con E18,5, y un aumento significativo de los animales P270 respecto de P30-60. Además, la expresión de p-p38 aumentó en los animales *Igf1*^{-/-} de edad E18,5 cuando los comparamos con los de genotipo silvestre (**Figura 11c**).

También se analizó la expresión de la MAPK quinasa JNK, implicada en la apoptosis, y no se observaron diferencias significativas en la expresión de p-JNK en el patrón temporal de los animales con genotipo silvestre, ni entre los dos genotipos estudiados (**Figura 11d**).

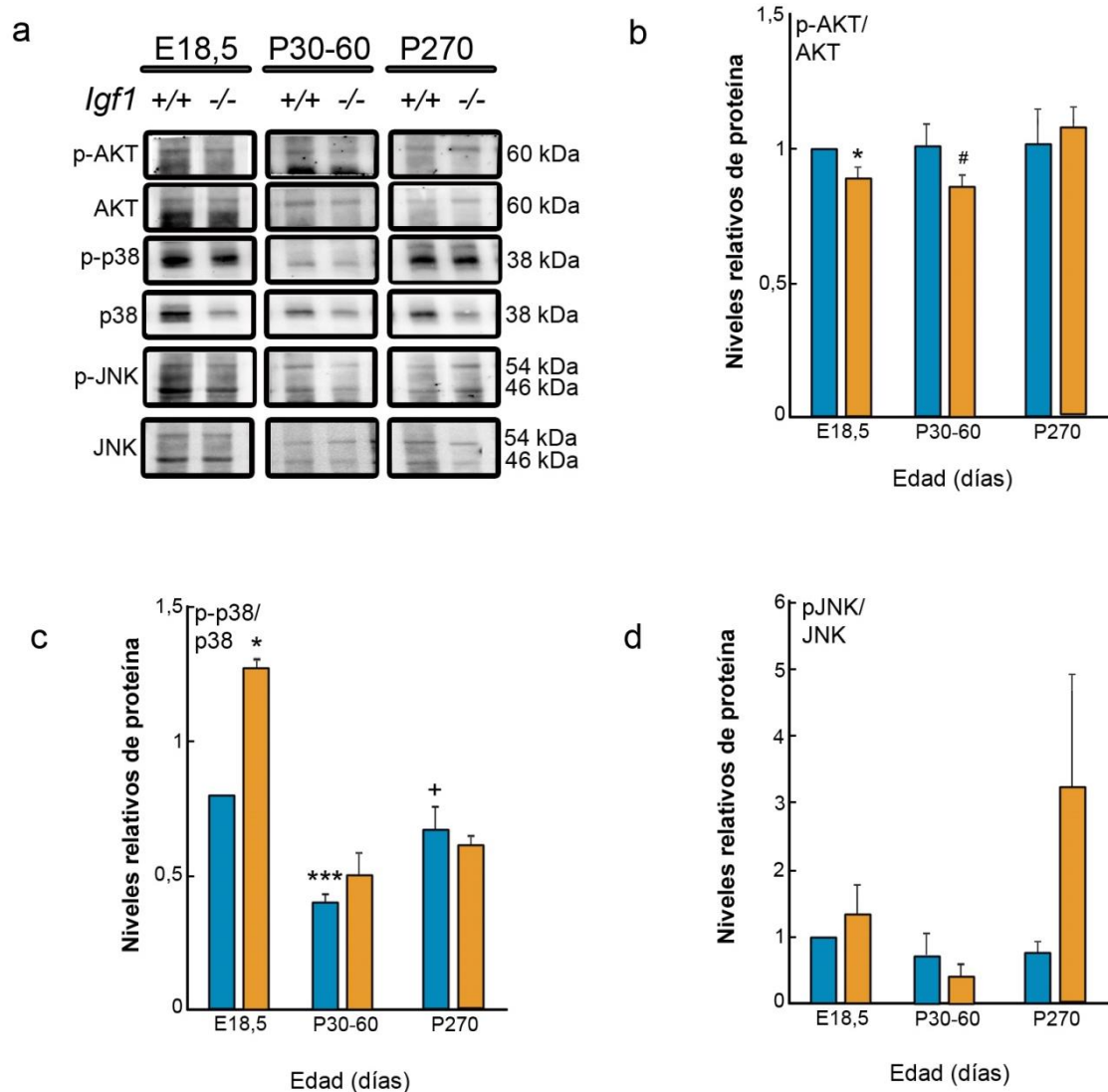


Figura 11. Modulación de la actividad de las quinasas AKT, p38 y JNK en el ratón nulo para *Igfl*. **a**) Bandas representativas de la relación p-AKT/AKT, p-p38/p38, p-JNK/JNK en ratones *Igfl*^{+/+} e *Igfl*^{-/-}. **b**) Cuantificación de la relación p-AKT/AKT en ratones *Igfl*^{+/+} (barras azules) e *Igfl*^{-/-} (barras naranjas). **c**) Cuantificación de la relación p-p38/p38 en ratones *Igfl*^{+/+} e *Igfl*^{-/-}. **d**) Cuantificación de la relación p-JNK/JNK en ratones *Igfl*^{+/+} e *Igfl*^{-/-}. Estos datos (b, c y d) fueron obtenidos tras densitometrar los resultados de WB con el programa ImageJ. Los datos se normalizaron frente a los ratones E18,5 y se expresaron como la media \pm SEM. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando la prueba t de Student. * $P < 0,05$ versus E18,5 *Igfl*^{+/+}; *** $P < 0,001$ versus E18,5 *Igfl*^{+/+}; + $P < 0,01$ versus P30-60 *Igfl*^{+/+} y # $P < 0,05$ versus P30-60 *Igfl*^{+/+}.

4.2 Presencia y regulación de la autofagia en el oído interno de ratón: Papel del IGF-1

4.2.1 Los principales genes autofágicos se expresan en la cóclea de ratones E18,5

Varios estudios han relacionado al IGF-1 con la autofagia, y se ha descrito que tiene distintas funciones según el contexto celular (Sobolewska *et al.*, 2009, Bains *et al.*, 2009). Así mismo, se ha relacionado la autofagia con el desarrollo del oído interno en pollo (Aburto *et al.*, 2012b). Para estudiar si la autofagia estaba presente durante el desarrollo coclear del ratón de edad E18,5 se analizó la expresión de genes autofágicos en ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} utilizando para ello arrays de ARN [GEO: GSE11821] (**Tabla 4**). Para este estudio se seleccionaron y se categorizaron los genes implicados en la autofagia según se ha publicado previamente en otros trabajos (Chen y Klionsky, 2011).

No se observaron diferencias significativas de expresión entre los ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} en la mayoría de los genes estudiados (**Tabla 4A y B**), excepto en los transcritos de los genes *Ndp52*, *Tlr1* y *Tlr6*. El gen *Ndp52* desempeña un papel fundamental en la inmunidad mediante la modulación de la autofagia (Kraft *et al.*, 2010, Thurston *et al.*, 2009) y se observó una disminución significativa en la expresión génica del ratón nulo para *Igf1*. TLR1 y TLR6 son miembros de la familia de receptores TLR, que tienen un papel clave en el sistema inmune (Hamidzadeh y Mosser, 2016). La activación de TLR1 a través de MydD88, junto con otros miembros de la familia TLR, incluyendo TLR6, activa la autofagia en macrófagos (Shi y Kehrl, 2008). Los datos de arrays de ARN muestran un aumento significativo de la expresión de *Tlr1* y una disminución significativa en la expresión de *Tlr6* en los ratones *Igf1*^{-/-} cuando los comparamos con los *Igf1*^{+/+}. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de otros miembros de la familia TLR entre genotipos.

Tabla 4A. Expresión comparada de los genes de la maquinaria autofágica.

Genes	Expresión <i>Igfl</i> ^{+/+}	Expresión <i>Igfl</i> ^{-/-}	Fold Change
Genes implicados en la formación del autofagosoma			
<i>Atg12</i>	5,41	5,36	-0,053
<i>Atg16l1</i>	7,44	7,44	-0,002
<i>Atg4b</i>	7,09	7,09	-0,001
<i>Atg4d</i>	5,42	5,39	-0,023
<i>Atg5</i>	6,79	6,79	-0,001
<i>Becn1</i>	7,16	7,16	0,006
<i>Gabarap</i>	10,95	10,95	-0,003
<i>Gabarapl1</i>	8,46	8,45	-0,004
<i>Gabarapl2</i>	8,25	8,24	-0,016
<i>Map1lc3a</i>	9,81	9,81	-0,001
<i>Rgs19</i>	7,20	7,10	-0,104
<i>Ulk1</i>	6,28	6,22	-0,057
Genes implicados en el transporte autofágico			
<i>Atg10</i>	6,19	6,19	-0,006
<i>Atg16l1</i>	7,44	7,44	-0,002
<i>Atg3</i>	4,54	4,49	-0,051
<i>Atg4b</i>	7,09	7,09	-0,001
<i>Atg4d</i>	5,42	5,39	-0,023
<i>Atg7</i>	4,39	4,41	0,027
<i>Gabarap</i>	10,95	10,95	-0,003
<i>Gabarapl2</i>	8,25	8,24	-0,016
<i>Rab24</i>	7,65	7,54	-0,109
Genes implicados en la fusión del autofagosoma-lisosoma			
<i>Lamp1</i>	10,51	10,51	-0,003
<i>Npc1</i>	7,70	7,70	-0,005
Genes implicados en autofagia y ubiquitinación			
<i>Bag3</i>	7,35	7,12	-0,233
<i>Atg7</i>	4,39	4,41	0,027
<i>Foxo3</i>	7,57	7,56	-0,004
<i>Hdac6</i>	8,01	8,01	0,006

Maquinaria autofágica

<i>Nbr1</i>	8,55	8,35	-0,204
<i>Ndp52</i>	3,21	2,11	-1,099
Genes con actividad proteasa			
<i>Atg4b</i>	7,09	7,09	-0,001
<i>Atg4d</i>	5,42	5,39	-0,023

Tabla 4B. Expresión comparada de los genes de la red reguladora de la autofagia.

Genes	Expresión <i>Igfl</i> ^{+/+}	Expresión <i>Igfl</i> ^{-/-}	<i>Fold</i> <i>change</i>
Genes reguladores de la autofagia y la apoptosis			
<i>Atg12</i>	5,41	5,36	-0,053
<i>Atg5</i>	6,79	6,79	-0,001
<i>Bad</i>	7,02	7,03	0,010
<i>Bak1</i>	3,43	3,42	-0,010
<i>Bax</i>	8,09	8,08	-0,004
<i>Bcl2</i>	5,06	5,02	-0,033
<i>Becn1</i>	7,16	7,16	0,006
<i>Bid</i>	4,87	4,87	0,004
<i>Casp3</i>	7,73	7,68	-0,041
<i>Casp8</i>	7,12	6,89	-0,227
<i>Ctsb</i>	8,48	8,45	-0,031
<i>Dapk1</i>	7,79	7,79	-0,005
<i>Fadd</i>	6,11	6,05	-0,059
<i>Mapk8</i>	6,74	6,73	-0,007
<i>Pik3c3</i>	6,80	6,80	0,008
<i>Pik3cg</i>	3,48	3,37	-0,111
<i>Sqstm1</i>	9,67	9,67	-0,002
<i>Uvrag</i>	7,70	7,48	-0,219
Genes reguladores de la autofagia y del ciclo celular			
<i>Cdkn1b</i>	5,70	5,73	0,030
<i>Cdkn2a</i>	3,74	3,56	-0,175
<i>Eif4ebp1</i>	7,04	7,04	0,006
<i>Eif2ak4</i>	6,05	6,32	0,278
<i>Ulk1</i>	6,28	6,22	-0,057

Genes reguladores de la autofagia en otros procesos celulares			
<i>Ctsd</i>	9,95	9,95	-0,001
<i>Ctss</i>	7,71	7,71	0,000
<i>Mapk14</i>	5,26	5,13	-0,131
<i>Pik3r4</i>	7,53	7,52	-0,007
<i>Rps6kb1</i>	6,08	6,05	-0,028
<i>Tlr1</i>	1,42	3,04	1,615
<i>Tlr6</i>	3,49	1,17	-2,314
Inducción de la autofagia por patógenos intracelulares			
<i>Eif2ak3</i>	7,29	7,21	-0,082
<i>Ifng</i>	0,48	0,49	0,005
<i>Lamp1</i>	10,51	10,51	-0,003

Tabla 4. Niveles de expresión de genes autofágicos en las cócleas de ratones *Igf1^{+/+}* e *Igf1^{-/-}*. El transcriptoma coclear de ambos genotipos se estudió mediante el GeneChip[®] Mouse Genome 430A2.0 Arrays (Affymetrix). Los genes autofágicos fueron identificados y clasificados según su función biológica. **A)** Genes de la maquinaria autofágica y **B)** regulación de los genes autofágicos. Se utilizó un método probabilístico (PPLR), para calcular los niveles de expresión de los genes seleccionados que aparecen como el *fold change* (FC; expresión de *Igf1^{-/-}* menos expresión de *Igf1^{+/+}*). El método PPLR reduce el número de falsos positivos en la estimación de la expresión diferencial de los genes. Los valores en negrita representan un valor positivo de FC superior a una unidad de log₂ (FC>1 con P>0.05) y un valor negativo de FC menor que -1 (FC<-1 con P<0.95).

4.2.2 Patrón temporal de la expresión de genes autofágicos en la cóclea del ratón nulo *Igfl*.

A continuación, se estudió el curso temporal de la expresión de los genes autofágicos *Atg4b*, *Atg5*, *Atg9a* y *Becn1* en la cóclea de ratones de edades E18,5, P0, P30-60, P270 y P365 (**Figura 12**). Cuando comparamos la expresión de estos genes en los ratones perinatales E18,5 y P0, que fueron similares entre sí, con las edades postnatales se observó un aumento significativo de 2 veces en la expresión de *Becn1* en ratones de edad P30-60 y P270 y de 3,5 y 5 veces en el transcrito de *Atg9a* de las cócleas de ratones de edad P30-60 y P270 respectivamente. Los niveles de ARNm de *Atg4b* y de *Atg5* siguieron un patrón similar al observado en *Becn1* y *Atg9a*, aunque con aumentos menores (alrededor de 1,2 veces). En la edad P365 se observó una disminución significativa respecto a las edades P30-60 y P270 en la expresión de *Atg4b*, *Atg5* y *Becn1*.

Se observó que estos genes se expresan de forma similar en los ratones E18,5 de ambos genotipos, confirmando así, los datos obtenidos con los arrays descritos en el apartado anterior. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los genotipos estudiados en ninguna de las edades estudiadas, las cócleas de los ratones P270 mostraron una mayor dispersión en los valores de ARNm de *Atg4b*, *Atg5* y *Becn1* de los ratones nulos al compararlos con los silvestres (**Figura 13**). Estos resultados sugieren la presencia de dos subpoblaciones en los ratones nulos de 9 meses (P270). Así, se observó un aumento de la expresión de los genes *Atg4b*, *Atg5* y *Becn1* en 3 de los 6 ratones nulos estudiados, en comparación con los ratones de tipo silvestre. Esta dispersión precede a una disminución significativa en *Becn1*, *Atg4b*, *Atg5* en las cócleas de ratones P365 (**Figura 12**). Por lo tanto, estos datos demuestran que la expresión de los genes autofágicos está regulada desde los inicios de la maduración coclear hasta la edad más avanzada estudiada.

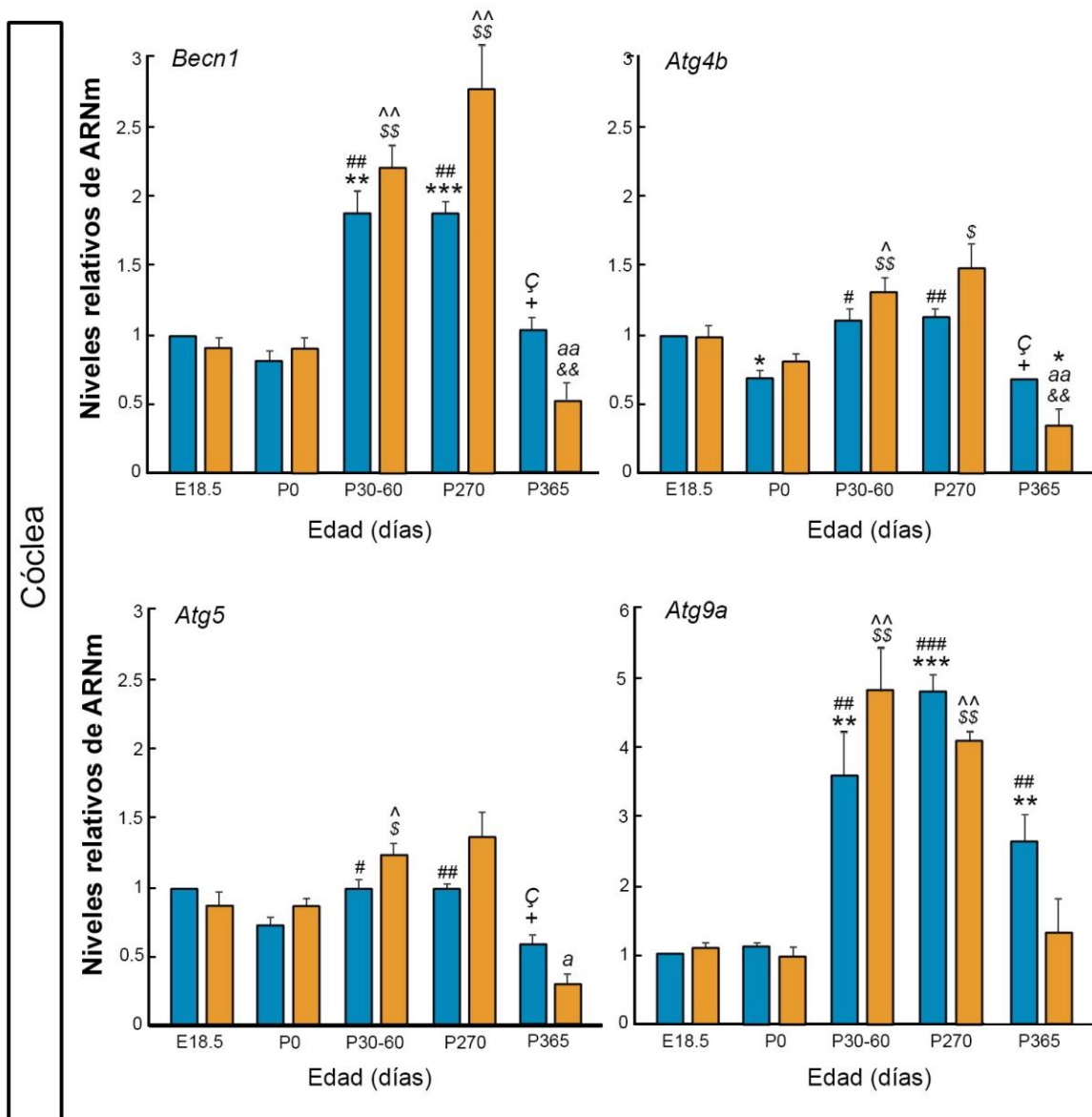


Figura 12. Expresión de genes autofágicos en la cóclea del ratón nulo para *Igfl*. Para determinar la expresión de los genes *Becl1*, *Atg4b*, *Atg5* y *Atg9a* se utilizaron cócleas de ratones *Igfl*^{+/+} (barras azules) e *Igfl*^{-/-} (barras naranjas). Se realizó una RT-qPCR y se utilizó el gen ARNr 18s como control endógeno. Se estudiaron 3- 6 ratones de cada genotipo por triplicado de las edades indicadas. Los datos se normalizaron frente a los niveles de E18,5 y se expresaron como la media \pm SEM del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. Los datos respecto a los animales silvestres fueron los siguientes: *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 versus E18,5, #P<0,05, ##P<0,01 y ###P<0,001 versus P0, ^cP<0,05 versus P30-60, ⁺P<0,05 versus P270. La comparación con respecto a los ratones nulos *Igfl* fue la siguiente: [^]P<0,05, ^{^^}P<0,01 y ^{^^^}P<0,001 versus E18,5, ^{\$}P<0,05, ^{\$\$}P<0,01 y ^{\$\$\$}P<0,001 versus P0, ^aP<0,05 y ^{aa}P<0,01 versus P30-60, ^{&&}P<0,01 versus P270.

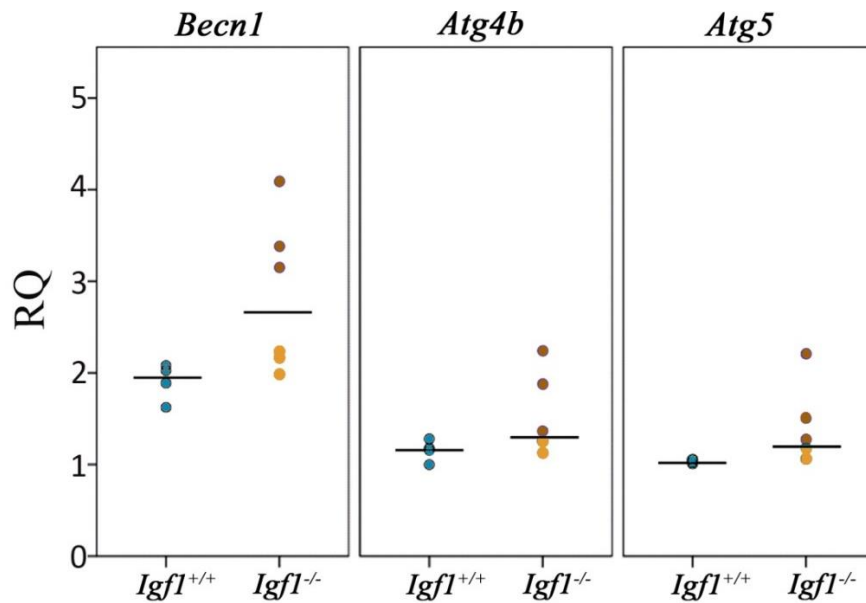


Figura 13. Heterogeneidad de la expresión de genes autofágicos en la cóclea del ratón P270 nulo para *Igf1*. Se analizaron los niveles de expresión de *Becn1*, *Atg4b* y *Atg5* en la cóclea de ratones de edad P270 mediante RT-qPCR. Se utilizó como gen endógeno control el ARNr 18s eucariótico. Los valores de cuantificación relativa de la expresión génica fueron calculados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El diagrama representa los valores individuales de cada ratón para cada gen y su mediana (barra). Se observaron dos subpoblaciones en los valores correspondientes a los ratones *Igf1*^{-/-}, una representada con círculos naranjas claros semejantes a los ratones *Igf1*^{+/+} (círculos azules) y otra representada con círculos naranjas oscuros con valores de expresión más altos que los *Igf1*^{+/+}.

Posteriormente, para estudiar si el estado inflamatorio podría ser uno de los estímulos que activan el proceso de la autofagia en la cóclea, se estudió el curso temporal de la expresión de *Cox2*, un gen que codifica para una enzima de la cascada inflamatoria cuya participación se ha relacionado anteriormente con autofagia en otros contextos celulares (Ricciotti y Fitzgerald, 2011). Los resultados obtenidos en nuestro estudio (**Figura 14**) mostraron que el transcrito de *Cox2* presenta unos patrones temporales paralelos a los observados en los genes de autofagia descritos anteriormente. Además, se observó un aumento significativo de 1,5 veces en los niveles de expresión de *Cox2* de los ratones P0 al compararlos con las cócleas de los ratones E18,5. Cuando comparamos estos estadios, E18,5 y P0, con los ratones adultos P30-60, P270 y P365 se observó un incremento significativo de 9, 12,5 y 5 veces, respectivamente. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos en los ratones P365 (**Figura 14**). Estos datos sugieren que *Cox2* podría ser un indicador de la autofagia en la cóclea, puesto que la autofagia y la inflamación tienen un patrón temporal similar.

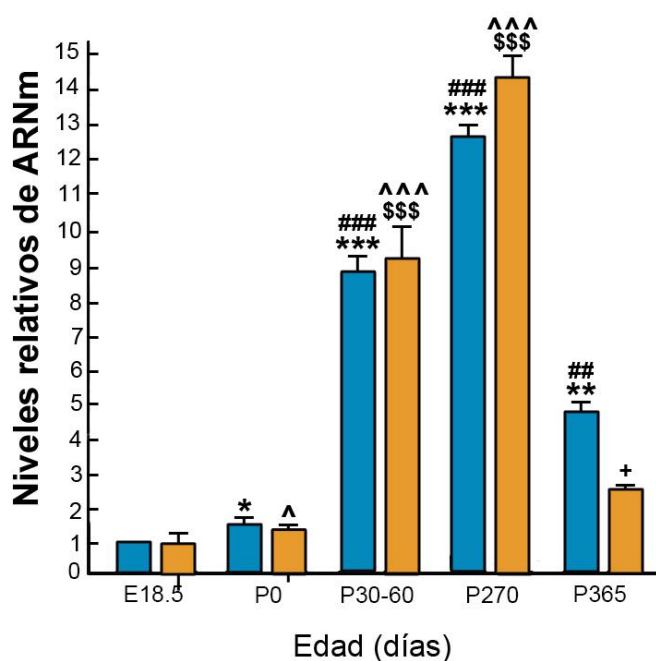


Figura 14. Las cócleas de ratones de edades avanzadas presentan mayores niveles de expresión de *Cox2*. Se analizaron los niveles de expresión del gen *Cox2* en la cóclea de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} de las edades indicadas mediante RT-qPCR. Se utilizó como gen endógeno control el ARNr 18S eucariótico. Los valores de cuantificación relativa de la expresión génica fueron calculados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y representados como la media \pm SEM. La significación estadística se evaluó utilizando la prueba t de Student. *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 versus *Igf1*^{+/+} E18,5; #P<0,01 y ##P<0,001 versus *Igf1*^{+/+} P0; ^P<0,05 y ^^P<0,001 versus *Igf1*^{-/-} E18,5; \$\$\$P<0,05 versus *Igf1*^{-/-} P0 y +P<0,05 versus *Igf1*^{+/+} P365.

4.2.3. Los genes de la maquinaria autofágica *Becn1*, *Atg4b* y *Atg5* se expresan en el vestíbulo y el cerebro de ratones *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}

Para comprobar si la maquinaria autofágica muestra este patrón de regulación temporal en otros tejidos, se estudió la expresión de *Atg4b*, *Atg5* y *Becn1* en vestíbulo y homogeneizados de cerebro. Para ello se utilizaron ratones *Igf1*^{+/+} y *Igf1*^{-/-} de edades E18.5, P0, P30-60 y P270 (**Figura 15**). También se determinaron los niveles de expresión de estos genes en los núcleos cocleares en ratones P150 (**Figura 15, barras rayadas**).

Se observó que el vestíbulo presentaba un patrón muy similar al descrito en la cóclea, con incrementos significativos en los transcritos de *Atg4b*, *Atg5* y *Becn1* asociados con la edad (**Figura 15**). No se observaron diferencias entre genotipos en ratones de edades comprendidas entre E18,5 y P60, sin embargo, los ratones P270 nulos para *Igf1* presentaron un aumento significativo en la expresión de los tres genes cuando se compararon con los de genotipo silvestre.

Posteriormente, se analizó la maquinaria autofágica en homogeneizado de cerebro, utilizado como tejido neural de referencia, y no se observaron diferencias llamativas entre las edades y los genotipos estudiados (**Figura 15**). Para evaluar específicamente la vía auditiva central, se disecaron los núcleos cocleares de ratones P150 *Igf1*^{+/+} y *Igf1*^{-/-} y se comparó la expresión génica de *Atg4b*, *Atg5* y *Becn1* (**Figura 15, barras rayadas**). En esta parte del cerebro, se encontró un aumento significativo en los niveles de expresión de *Becn1* y *Atg5* de los ratones *Igf1*^{-/-} cuando los comparamos con los de genotipo silvestre.

Estos datos analizados en conjunto, indican que hay un aumento en el proceso de autofagia en el oído interno de ratones adultos desde el momento del nacimiento (P0) hasta los nueve meses de edad (P270).

Por último, se realizó un análisis global mediante el análisis de la varianza multivariante de tres vías para comparar la expresión génica de la autofagia en los tres órganos (cóclea, vestíbulo y cerebro), los dos genotipos (*Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-}) y en las cuatro edades comunes (E18,5, P0, P30-60 y P270). Se observó que los niveles de expresión de *Becn1*, *Atg4b* y *Atg5* fueron significativamente diferentes entre los órganos. Los niveles de expresión más bajos se observaron en el vestíbulo, seguido de la cóclea y por último el

cerebro, cuyos niveles de expresión fueron 1,5 veces superiores a los de la cóclea y 2 veces respecto al vestíbulo. Cuando se analizó el parámetro edad se observó que las edades postnatales P30-60 y P270 presentaban un aumento significativo de aproximadamente 1,5 veces en la expresión génica cuando se comparaban con las edades perinatales E18,5 y P0 en los tres órganos estudiados. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos.

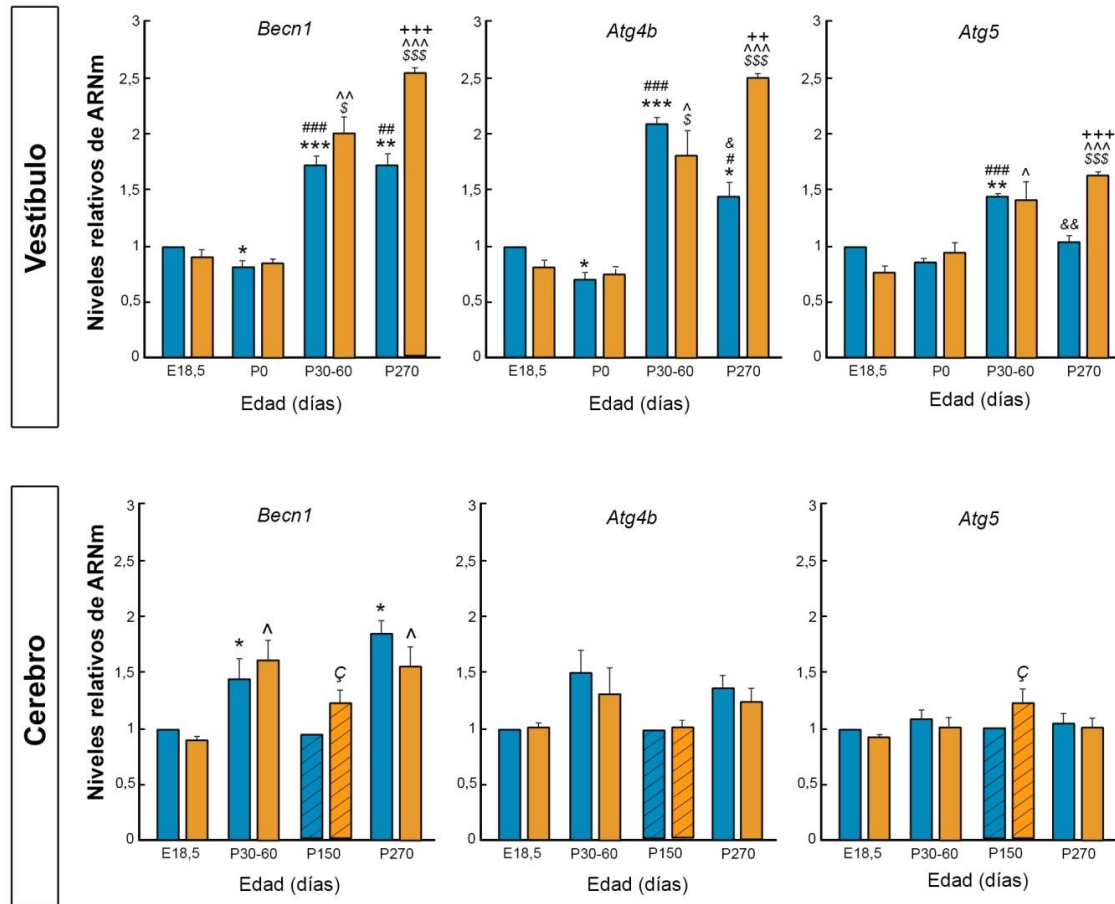


Figura 15. Los genes de la maquinaria autofágica *Becn1*, *Atg4b* y *Atg5* se expresan en el vestibulo y el cerebro de ratones *Igfl*^{+/+} e *Igfl*^{-/-}. Se analizó la expresión génica de *Becn1*, *Atg4b* y *Atg5* en el vestibulo, en homogeneizado de cerebro y los núcleos cocleares (barras rayadas) de ratones *Igfl*^{+/+} (barras azules) e *Igfl*^{-/-} (barras naranjas). Se realizó una RT-qPCR y se utilizó el gen ARNr 18s como control endógeno. Se estudiaron de 3 a 6 ratones de cada genotipo por triplicado de las edades indicadas. Los datos se normalizaron frente a los niveles de E18,5 y se expresaron como la media \pm SEM del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. Los datos respecto a los animales silvestres fueron los siguientes: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ versus E18,5, # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ y ### $P < 0,001$ versus P0, & $P < 0,05$ y && $P < 0,01$ versus P30-60, ^C $P < 0,05$ versus P150, + $P < 0,05$ y ++ $P < 0,01$ versus P270. La comparación con respecto a los ratones nulos *Igfl* fue la siguiente: ^ $P < 0,05$, ^^ $P < 0,01$ y ^^ $P < 0,001$ versus E18,5, \$ $P < 0,05$, \$\$ $P < 0,01$ y \$\$\$ $P < 0,001$ versus P0.

4.2.4 El flujo autofágico está modulado en el oído interno con la edad.

Para confirmar si el flujo autofágico está modulado con la edad de forma equivalente se compararon los niveles relativos de LC3-II y de SQSTM1p62 en ratones perinatales (E18,5) y adultos (P270) en la cóclea, el vestíbulo y el cerebro (**Figura 16**). Como se ha mencionado anteriormente, la relación LC3-II/LC3-I es el principal marcador de autofagosomas y los niveles de expresión de SQSTM1p62 correlacionan inversamente con los de LC3-II. El estudio de estos dos marcadores permite comprobar la presencia de autofagosomas y, por tanto, si el proceso autofágico está activo.

En la cóclea se observó que los ratones de edad P270 presentaron un aumento significativo de 2 veces en los niveles de LC3-II cuando los comparamos con los ratones de edad E18,5, independientemente del genotipo. Por otro lado, se analizó la expresión de la proteína SQSTM1p62 y se observó una disminución significativa en los niveles de expresión en ratones de edad P270 respecto a ratones de edad E18,5, también independiente del genotipo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las edades estudiadas al comparar los ratones nulos para *Igf1* con los silvestres (**Figura 16a**).

En el vestíbulo se observó un aumento significativo en los niveles relativos de LC3-II en los ratones P270 *Igf1*^{-/-} respecto a los animales silvestres. No se apreciaron diferencias significativas en los niveles relativos de LC3-II asociados con la edad en ratones *Igf1*^{+/+}. Se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de la proteína SQSTM1p62 en los ratones P270 cuando los comparamos con los ratones E18,5, pero no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} en ninguna de las edades estudiadas (**Figura 16b**).

En el homogeneizado de cerebro, al igual que en el vestíbulo, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles relativos de LC3-II con la edad ni entre genotipos. Los niveles de la proteína SQSTM1p62 presentaron una disminución significativa en los ratones P270 cuando los comparamos con los ratones E18,5, pero no se observaron diferencias significativas entre los genotipos *Igf1*^{+/+} e *Igf1*^{-/-} en ninguna de las edades estudiadas (**Figura 16c**).

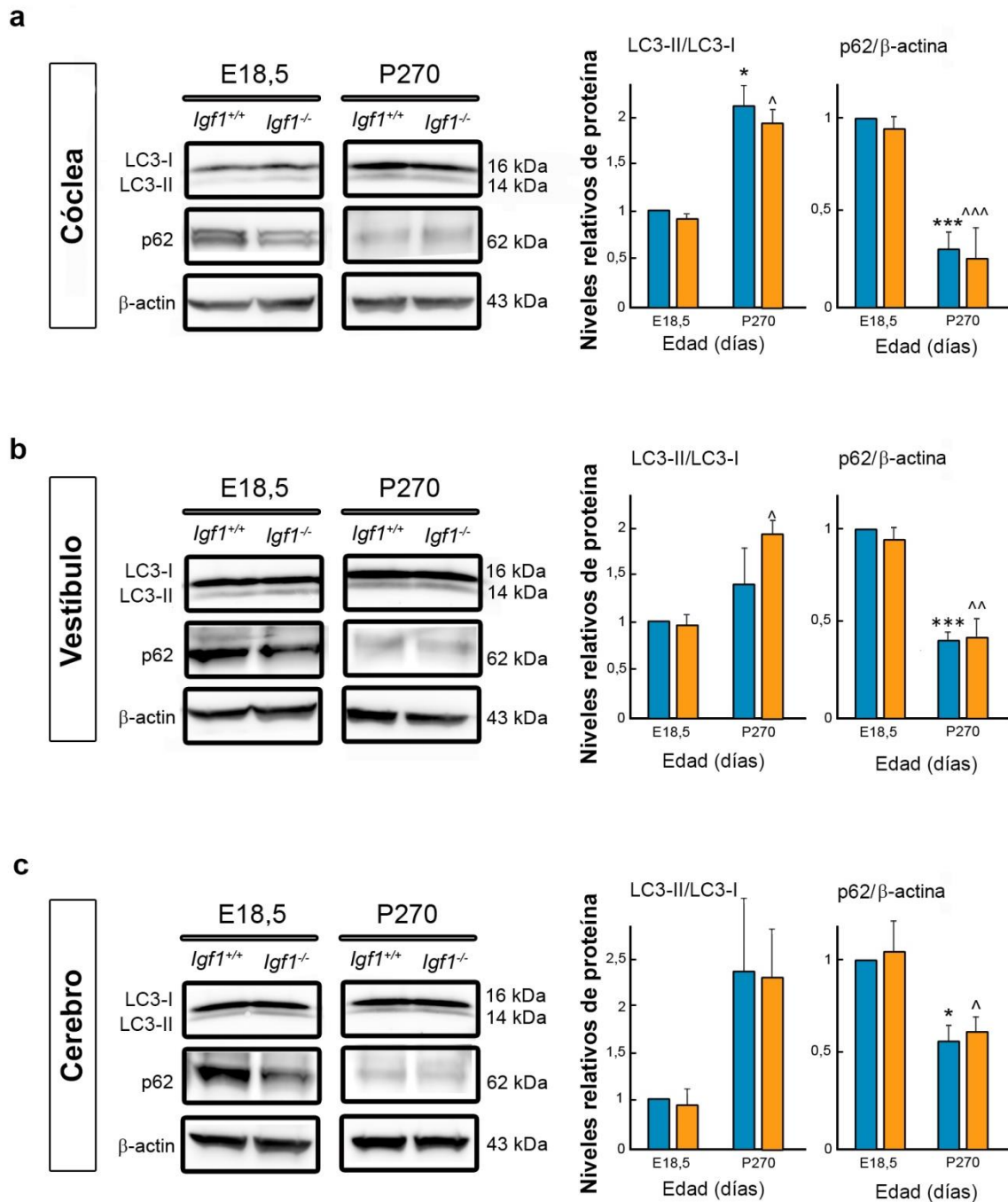


Figura 16. El flujo autofágico está modulado con la edad en el oído interno del ratón. Se determinaron mediante WB la relación de LC3-II/LC3-I y los niveles de SQSTM1/p62 (p62) de cócleas (a), vestíbulos (b), y cerebro (c), de ratones *Igf1*^{+/+} (barras azules) e *Igf1*^{-/-} (barras naranjas) de las edades indicadas. Se estudiaron de 3-6 ratones de cada edad y genotipo por triplicado. Se muestran bandas representativas de los niveles de LC3-I, LC3-II y p62. Los niveles de p62 se normalizaron con los niveles de la β -actina. En la gráfica se muestra la cuantificación de la relación LC3-II/LC3-I y los niveles de p62. Estos datos fueron obtenidos tras densitometrar los resultados de WB con el programa ImageJ y expresados como la media \pm SEM. La significación estadística se calculó mediante la prueba t de Student. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ versus E18,5 *Igf1*^{+/+}; ^ $P < 0,05$ y ^^ $P < 0,01$ versus E18,5 *Igf1*^{-/-}.

4.2.5. La autofagia es muy activa en las neuronas del ganglio espiral

Para estudiar la localización celular de la autofagia se analizó la expresión de LC3B mediante inmunohistofluorescencia. LC3B es una de las isoformas de la proteína LC3, que se encuentra en la membrana del autofagosoma y es, por tanto, un indicador de la presencia de autofagosomas. La localización de LC3B se llevó a cabo en secciones congeladas de cócleas de ratones *Igf1^{+/+}* y *Igf1^{-/-}* de edades E18,5 y P30-90 (**Figura 17**). Se observó que las neuronas auditivas eran inmuno-positivas (en verde) a las edades estudiadas (**Figura 17a, d, g y j, asteriscos**). Para confirmar que las células LC3B positivas eran neuronas se utilizó un marcador de células gliales, el factor de transcripción SOX2 (en rojo) que se expresa también durante el desarrollo embrionario en las células ciliadas y las células de soporte (Lang *et al.*, 2011). Se ha descrito anteriormente que cuando la autofagia está activa el marcaje típico de LC3B aparece como un punteado muy brillante en el citoplasma (Koike *et al.*, 2005). En nuestro estudio, se observó que las neuronas embrionarias presentaban un marcaje difuso y de baja intensidad (**Figura 17b, c, h e i**). En cambio, el marcaje de LC3B en las neuronas del ganglio espiral de ratones adultos P30-90 correspondió al punteado brillante citoplasmático (**Figura 17e, f, k y l**). Se realizó la cuantificación de la intensidad de la señal de expresión de LC3B (**Figura 17m**) y se confirmó un aumento significativo en los ratones P30-90 respecto a los E18,5. No se encontraron diferencias significativas entre genotipos en ninguna de las edades estudiadas.

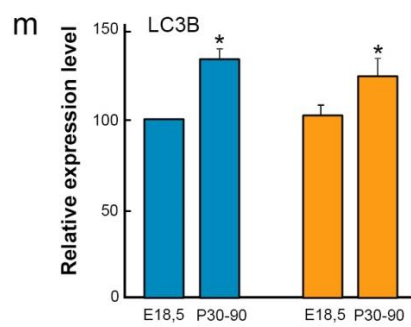
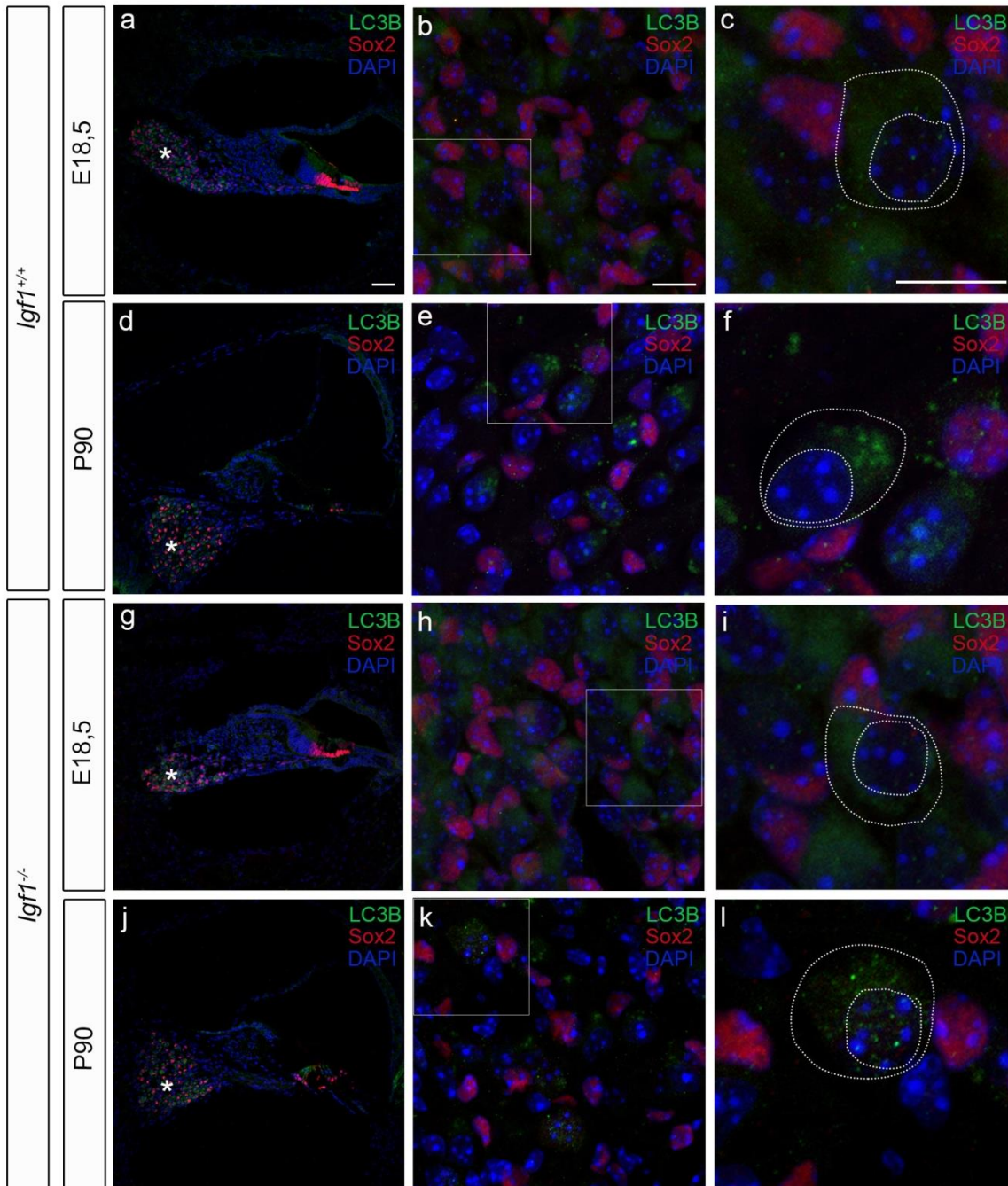


Figura 17. La autofagia está activa en las neuronas del ganglio espiral del ratón. Se determinó mediante la inmunohistoquímica de LC3B que la autofagia está localizada en las neuronas del ganglio espiral (**a, d, g y j**; asteriscos; **ampliación en b, e, h y k, respectivamente**). LC3B se expresa en el citoplasma de las neuronas (**b, e, h y k**); las neuronas de ratones de edad E18,5 muestran un marcaje de LC3B disperso y de baja intensidad (**c e i**), los ratones P30-90 muestran un punteado de alta intensidad (**f y l**). Se utilizó Sox2 (en rojo) para identificar las células gliales y DAPI (en azul) para marcar los núcleos. La intensidad de la inmunofluorescencia fue cuantificada utilizando ImageJ. Barra de aumento: 25 μm (**a, d, g y j**); 10 μm (**b, c, e, f, h, i, k y l**). Se analizó la expresión relativa de la proteína LC3B en el ganglio coclear de ratón de edades E18,5 y P30-90 (**m**). Los niveles relativos de expresión de la proteína LC3B fueron normalizados frente a los de E18,5 silvestres. La significación estadística fue estimada utilizando la prueba t de Student. El histograma representa la media de la intensidad relativa de la expresión \pm SEM. * $P < 0,05$ versus E18,5 *Igfl*^{+/+}.

4.3 Caracterización del ratón mutante nulo para *C-Raf*

Como se ha mencionado anteriormente, las acciones de IGF-1 están mediadas por rutas de señalización intracelular entre las que se encuentra la cascada RAF-MEK-ERK. Este trabajo y otros (Sanz *et al.*, 1999, Magarinos *et al.*, 2010), han demostrado que C-RAF es una diana del IGF-1 durante el desarrollo. Hemos caracterizado el ratón nulo para *C-Raf* para profundizar en el estudio del papel de esta proteína en el desarrollo y función del oído interno en el ratón.

4.3.1. Las RAF quinasas se expresan en el oído interno del ratón en etapas de desarrollo embrionario y en el ratón adulto.

La expresión de los transcritos de las RAF quinasas, A-RAF, B-RAF y C-RAF, se estudió mediante la técnica de RT-qPCR, a partir de ARN extraído de oído interno de ratones con genotipo silvestre en las edades E18,5 y P20 (**Figura 18a**). En la **Figura 18b** se muestra que los transcritos de *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf* están presentes en los estadios estudiados con niveles de expresión semejantes.

Se realizó un análisis del extracto de proteína de oído interno de ratón en los mismos estadios mediante WB. Se observó la presencia de las proteínas, A-RAF, B-RAF y C-RAF, en ambas edades con una disminución significativa en los niveles de expresión de las tres isoformas en el estadio P20 respecto al E18,5 (**Figura 18c**). Curiosamente, la relación entre los niveles de p-B-RAF/B-RAF no disminuyó en la cóclea P20 respecto a la E18,5 (**Figura 18c**). Posteriormente, se estudió el nivel de fosforilación de ERK, la diana principal de las RAF quinasas. El estudio de p-ERK/ERK, un indicador de actividad de la ruta RAF-MEK-ERK (Alessi *et al.*, 1994, Chao *et al.*, 1994), indicó que la ruta se mantiene con una actividad similar en ambas edades.

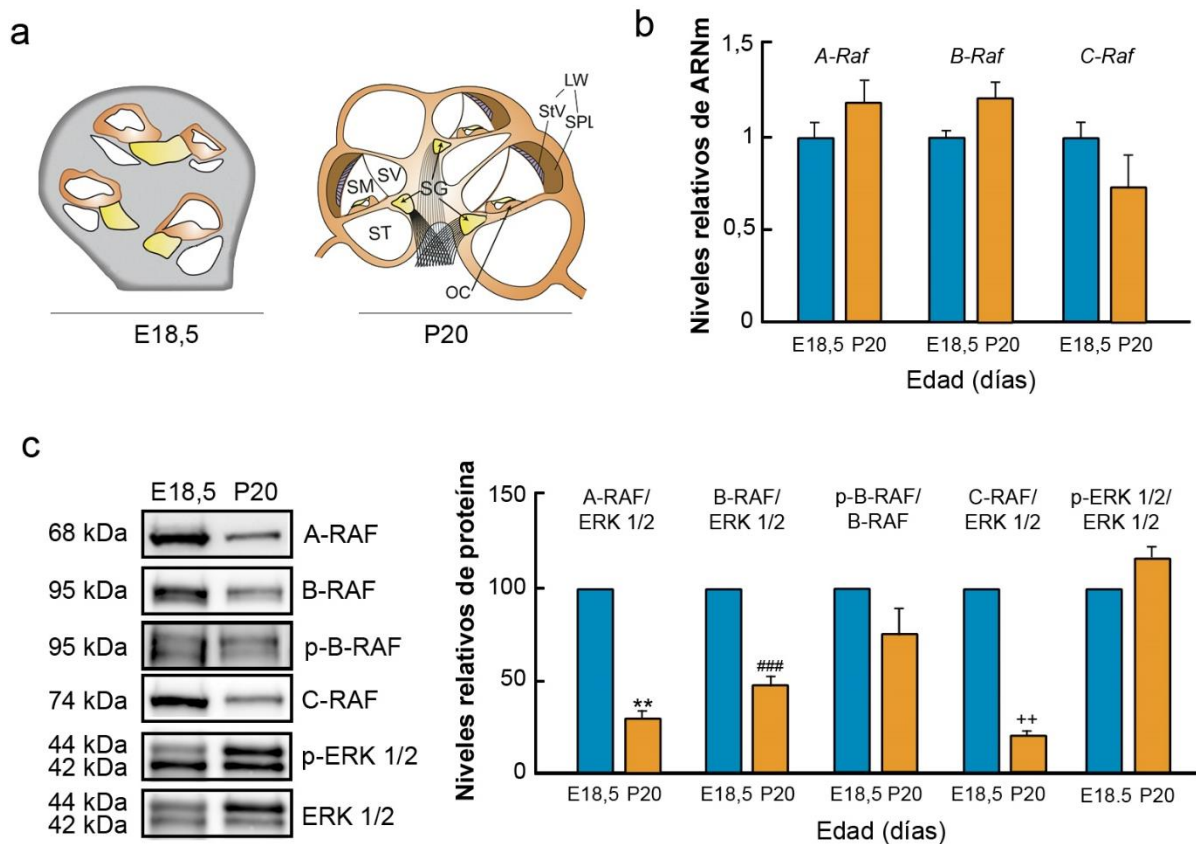


Figura 18. Las RAF quinasas se expresan en el oído interno de ratón. **a)** Ilustración esquemática de secciones cocleares de ratones E18,5 y P20. SV: escala vestibular, SM: escala media, ST: escala timpánica, OC: órgano de Corti, SG: ganglio espiral, LW: pared lateral, StV: estría vascular, SPL: ligamento espiral. **b)** Se analizaron los niveles de expresión de ARNm de *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf* en cócleas de ratones E18,5 y P20 mediante RT-qPCR. Se utilizó el gen 18S como gen control endógeno. Se analizaron al menos 3 ratones de cada edad estudiada por triplicado. Los datos se normalizaron frente a E18,5 y se expresaron como la media \pm SEM de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante la prueba t de Student. **c)** Se analizaron los niveles de A-RAF, B-RAF, C-RAF, y la relación de p-ERK1/2/ERK1/2 en la cóclea por *Western Blottig*. Se normalizaron frente a los niveles de ERK, excepto p-B-RAF que se normalizó utilizando los niveles de B-RAF. Se muestran bandas representativas de los niveles de proteína y se calcularon los valores promedio tras densitometrar los resultados de WB mediante el programa ImageJ. Los resultados se expresan como media \pm SEM. La significación de las diferencias se evaluó mediante la prueba t de Student. ** $P < 0,01$ versus A-RAF E18,5; ### $P < 0,001$ versus B-RAF E18,5; y ++ $P < 0,01$ versus C-RAF E18,5.

4.3.2. Los ratones nulos para *C-Raf* presentan sordera neurosensorial profunda

Para estudiar la función auditiva de ratones *C-Raf*^{+/+}, ratones *C-Raf*^{+/-} y ratones *C-Raf*^{-/-}, se analizó su respuesta frente a estímulos sonoros mediante la técnica de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral o ABR (**Figura 19a**). El registro típico de ABR en roedores de laboratorio presenta 5 ondas correspondientes a diferentes estaciones nerviosas de la vía auditiva, periférica y central (tronco cerebral): la cóclea y nervio auditivo (I), núcleo coclear (II), complejo olivar superior (III), lemnisco lateral (IV) y colículo inferior (V) respectivamente (**Figura 19b**).

Se realizó el ABR a ratones de edades comprendidas entre 3 y 5 semanas, que es la viabilidad máxima de los ratones nulos *C-Raf*^{-/-}. La estimulación auditiva se realizó mediante el sonido tipo click que es un estímulo auditivo inespecífico compuesto por el espectro de frecuencias audibles y que activa a todas las neuronas del receptor auditivo. La intensidad inicial a la que se sometió a los animales fue de 90 dB SPL y fue disminuyendo hasta los 35 dB SPL (**Figura 19a**). Como se observa en la **Figura 19c**, los ratones silvestres *C-Raf*^{+/+} y los ratones heterocigotos *C-Raf*^{+/-} presentaron un umbral de respuesta semejante (35-40±5 dB SPL, respectivamente), que se corresponde con el habitual en ratones de su mismo fondo genético. Sin embargo, los ratones nulos para *C-Raf*, no respondieron a ninguna intensidad, ni siquiera a la intensidad de sonido probada más alta (90 dB SPL). La falta de respuesta auditiva se produce en todas las ondas, estos resultados indican que la sordera se debe a un fallo neurosensorial que se produce en la cóclea.

Para analizar si esta falta de respuesta presenta especificidad de frecuencia se realizó un audiograma en el que se expuso a los animales a tonos puros. Se observó que los ratones silvestres y heterocigotos respondieron a todas las frecuencias (4-40 kHz) con distintos umbrales de respuesta (40-60 dB SPL). Mientras que los ratones nulos para *C-Raf*^{-/-} no respondieron a ninguno de los estímulos estudiados (**Figura 19d**).

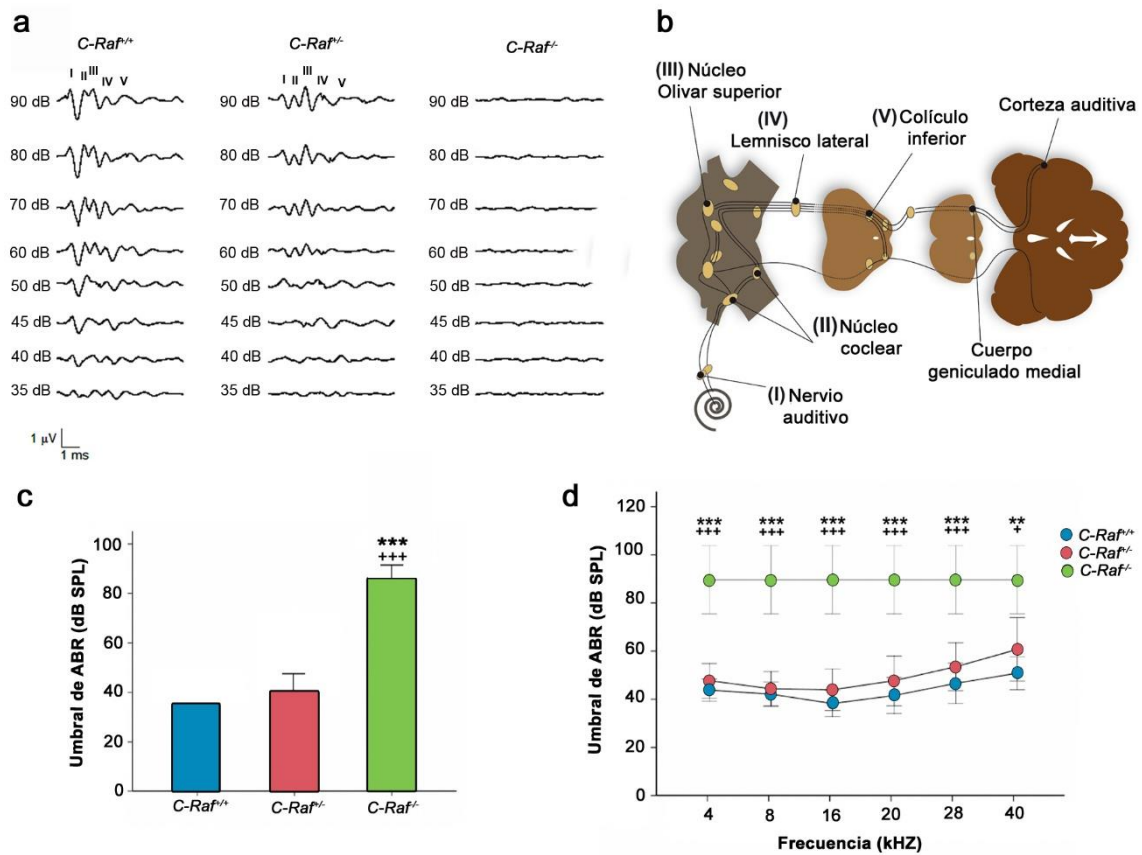


Figura 19. Los ratones nulos para *C-Raf* presentan sordera neurosensorial profunda. **a)** Análisis de la respuesta frente a estímulos auditivos medida a través de la técnica de potenciales ABR, en ratones con *C-Raf*^{+/+}, *C-Raf*^{+/-} y nulos *C-Raf*. Se observa que los animales *C-Raf*^{+/-} presentan un umbral de respuesta parecido a los ratones *C-Raf*^{+/+} mientras que los ratones con genotipo *C-Raf*^{-/-} no responden a ninguna intensidad. **b)** El perfil de ABR típico son 5 ondas que corresponden a distintos centros de procesamiento de la vía auditiva, I, nervio auditivo; II, núcleo coclear; III, núcleo olivar superior; IV, lemnisco lateral; V, colículo inferior. **c)** Histograma representando la media±SEM de los valores umbrales de respuesta a un sonido de tipo click de los ratones *C-Raf*^{+/+} (azul), *C-Raf*^{+/-} (rojo) y *C-Raf*^{-/-} (verde). **P<0.01 y ***P<0,001 versus *C-Raf*^{+/+}; +P<0,05 y +++P<0,001 versus *C-Raf*^{+/-}. **d)** El audiograma muestra el umbral de respuesta a los estímulos con distintas frecuencias de los animales con genotipo silvestre (azul), heterocigoto (rojo) y nulo para *C-Raf* (verde). Se observa que los ratones nulos *C-Raf*^{-/-} no responden a ninguna frecuencia.

A continuación, se estudiaron las posibles diferencias en la conducción del estímulo entre las estaciones del sistema auditivo de ratones *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{+/-}. Se observó que la latencia, entendida como el tiempo medido transcurrido desde la estimulación hasta la aparición de la onda correspondiente en el registro de ABR, medida en los animales *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{+/-} no presentó diferencias significativas excepto en el pico IV, que corresponde al núcleo del lemnisco lateral (**Figura 20a**). Además, se cuantificaron las latencias interpico (I-II y II-IV), definidas como el tiempo que tarda la señal nerviosa en recorrer el trayecto entre dos estaciones determinadas de la vía auditiva. No hubo diferencias significativas en el pico I-II, mientras que en la latencia del pico II-IV se observó un aumento significativo en los ratones con genotipo heterocigoto respecto a silvestres (**Figura 20b**). Además, se realizó un estudio de las amplitudes de cada uno de los picos y como se puede observar en la **Figura 20c** no se apreciaron diferencias significativas entre los animales *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{+/-}.

Los animales nulos para *C-Raf* presentaron sordera neurosensorial profunda, pero mostraron una respuesta normal a los test estándar de análisis de función vestibular. No se observaron patrones anormales en el comportamiento en ninguno de los tres genotipos estudiados, como girar sobre sí mismos, tener la cabeza inclinada, o una marcha anormal, indicadores de trastornos vestibulares (datos no mostrados).

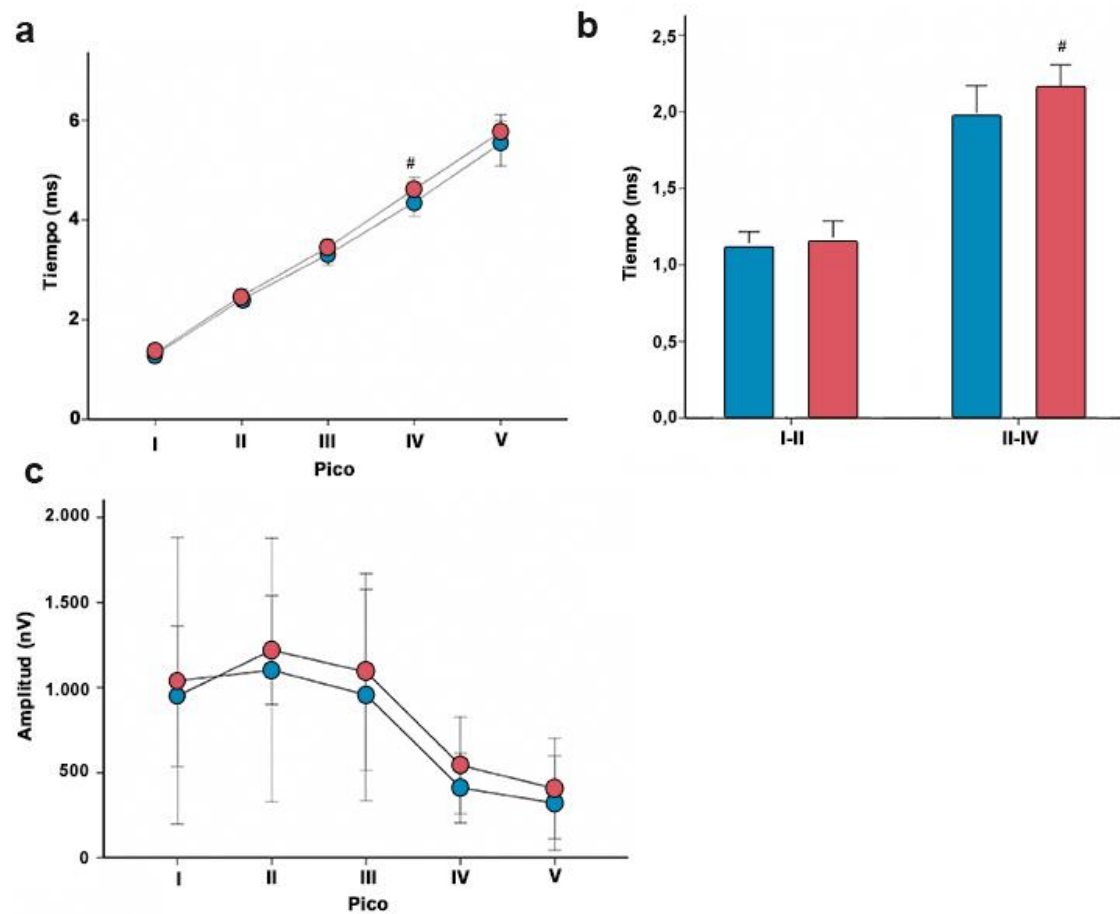


Figura 20. Los ratones heterocigotos para *C-Raf* presentan alteraciones en la transmisión del estímulo a lo largo de la vía auditiva central. **a)** La gráfica muestra la latencia de respuesta a los estímulos que corresponde a cada una de las ondas de la vía auditiva de los animales con genotipo silvestre (azul) y heterocigoto (rojo). Se observa que los ratones $C-Raf^{+/-}$ presentan una mayor latencia en el pico IV que corresponde al núcleo del lemnisco lateral, [#] $p < 0,05$ frente a los ratones $C-Raf^{+/+}$. **b)** Cuantificación de la latencia interpico (I-II y II-IV). Se observa que no hay diferencias significativas en el pico I-II, mientras que en pico II-IV puede observarse una disminución significativa en los ratones $C-Raf^{+/-}$, [#] $p < 0,05$ versus $C-Raf^{+/+}$. Estos resultados indican que los ratones $C-Raf^{+/-}$ presentan alteraciones en la vía auditiva central. **c)** La gráfica muestra la amplitud de cada una de las ondas expresada como la media de voltaje \pm SEM de los animales $C-Raf^{+/+}$ y $C-Raf^{+/-}$.

4.3.3 El oído medio y el oído interno de los ratones nulos para *C-Raf* presentan una morfología normal

Se estudió a continuación si el fenotipo auditivo observado se correspondía con alteraciones morfológicas o celulares. Para ello, se estudió la anatomía general del oído medio y la del oído interno. Como se ha descrito previamente, los ratones nulos para *C-Raf* muestran una alta mortalidad embrionaria debido a defectos en la vascularización placentaria y una apoptosis hepática masiva (Mikula *et al.*, 2001). Sin embargo, un 1% de los ratones mutantes nulos pudieron ser estudiados a la edad de P30. El tamaño del cuerpo de los ratones nulos para *C-Raf* era más pequeño cuando se comparó con los ratones de genotipo silvestre (70% de reducción en el tamaño corporal; **Figura 21a**). Pero sorprendentemente, no se observaron diferencias significativas en el tamaño del oído interno entre ambos genotipos (**Figura 21b y c**), ni diferencias en el número de vueltas de la cóclea (**Figura 21d y e; línea discontinua**).

Se realizó, además, un estudio complementario de los huesecillos del oído medio de estos ratones, puesto que se han descrito numerosas sorderas en vertebrados asociadas a malformaciones o fusiones del martillo, yunque y estribo (Cordas *et al.*, 2012). Se observó que no hay alteraciones morfológicas apreciables en los huesecillos de los animales *C-Raf*^{-/-} en relación con los *C-Raf*^{+/+} (**Figura 21f y g**).

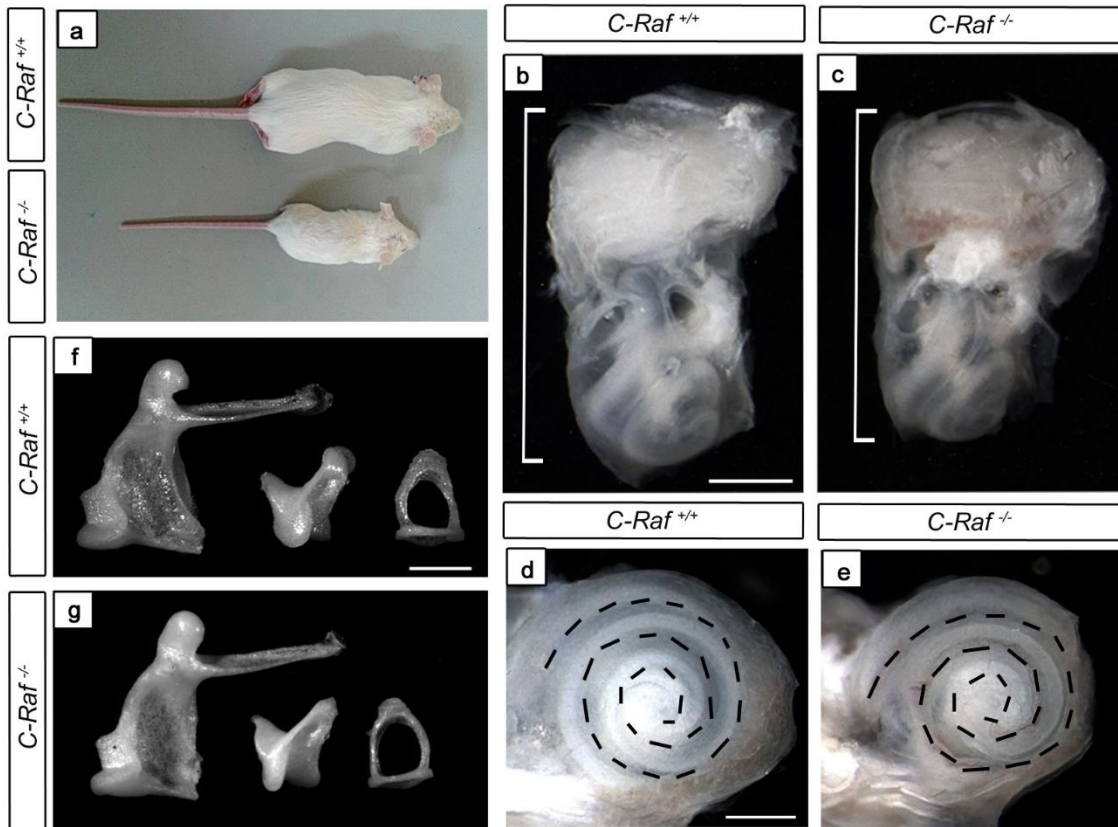


Figura 21. Los ratones nulos para *C-Raf* presentan una morfología normal de los oídos medio e interno. **a)** Los ratones *C-Raf*^{-/-} presentaron una reducción corporal del 70%. **b-e)** Los oídos internos de los ratones *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{-/-} no presentaron diferencias ni en tamaño ni en el número de vueltas de la cóclea. **f, g)** Los huesecillos del oído medio, martillo, yunque y estribo, presentaron tamaños y estructuras similares en los dos genotipos estudiados. Barra de aumento: 1 mm (b, c); 0,5 mm (d-g).

4.3.4. La citoarquitectura coclear y vestibular de los ratones nulos *C-Raf* no presenta alteraciones

Se analizó la histología general de la cóclea mediante tinción con hematoxilina y eosina de secciones de oído interno en ratones *C-Raf*^{+/+} y ratones nulos para *C-Raf*. El estudio se realizó en animales de diferentes edades: E15,5, P5 y P30.

Los embriones nulos para *C-Raf* E15,5 no presentaron alteraciones morfológicas respecto de los silvestres en los conductos cocleares (**Figura 22a, e**). Tampoco se observaron diferencias entre genotipos en la edad postnatal temprana P5, donde se puede observar que la membrana tectoria está pegada a las células ciliadas y el túnel de Corti está cerrado (**Figura 22b, f**). El órgano de Corti de los ratones P30 *C-Raf*^{-/-} presentó todos los tipos celulares: tanto la fila de CCI, como las tres filas de células CCE (**comparar Figura 22 paneles c, d con g, h**), como se confirma con el patrón de expresión de la miosina VIIa (en verde) en las células ciliadas (**cuantificación en h'**). El número de células de soporte en los ratones de ambos genotipos también fue muy similar, como indica la intensidad del factor de transcripción SOX2 (en rojo) (**Figuras 22d, h, cuantificación en h'**).

Se realizó, además, un análisis comparativo de distintos marcadores del ganglio espiral. El ganglio espiral está formado por neuronas bipolares que conectan las células ciliadas con las neuronas centrales de los núcleos auditivos del tronco cerebral. Su funcionalidad es esencial para la transmisión de la señal desde del órgano de Corti. El análisis histológico de esta estructura no mostró diferencias evidentes en la disposición de las neuronas y la densidad de éstas entre ambos genotipos (**Figura 22i, l**). Se ha descrito que los ratones nulos para los genes *Igfl* e *Irs2* presentan una mielinización aberrante (Varela-Nieto *et al.*, 2013, Murillo-Cuesta *et al.*, 2012) y por lo tanto, se realizó un estudio de la expresión de la mielina P0 pero no se han observado diferencias significativas entre estos genotipos (**Figura 22j, m, cuantificación en m'**). No se observaron diferencias significativas entre los genotipos en las fibras aferentes (neurofilamento, rojo) ni en las regiones sinápticas (sinaptofisina, verde) (**Figura 22k, n, cuantificación en n'**).

Finalmente, se estudiaron las estructuras vestibulares y, como se muestra en la **Figura 22 (comparar paneles o-r con s-v)**, no se observaron diferencias entre

genotipos ni en el epitelio sensorial vestibular ni en las fibras nerviosas que inervan la mácula y las crestas vestibulares. No se observaron alteraciones anatómicas o celulares en el sistema vestibular de los ratones *C-Raf*^{-/-}, lo que concuerda con los resultados obtenidos de las pruebas funcionales vestibulares ya descritas.

4.3.5. La expresión del canal de potasio Kir 4.1 disminuye en los ratones nulos para *C-Raf*

La estría vascular es una estructura fundamental para el correcto funcionamiento del oído interno, puesto que los transportadores iónicos que presenta mantienen la concentración adecuada de iones para la formación del potencial endococlear. El estudio histológico de la estría vascular en las secciones de ratones *C-Raf*^{-/-} y silvestres mostró una morfología aparentemente normal y una red capilar similar en ambos genotipos (**Figura 23a y f**).

El transportador Na⁺/K⁺-ATPasa y el canal de potasio KCNQ1 se expresan en las células marginales de la StV. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de la Na⁺/K⁺-ATPasa y el KCNQ1 entre los genotipos estudiados (**Figura 23b, c, g, h, cuantificación en h'**) lo que indica que la ausencia de *C-Raf* no afecta a la expresión ni de este transportador ni de este canal de potasio.

Sin embargo, el nivel de expresión proteica del canal de potasio Kir4.1, localizado en las células intermedias, disminuyó un 75% de forma significativa en la StV de los ratones nulos para *C-Raf* en comparación con los silvestres (**Figura 23d, i, cuantificación en i'**). Para excluir un defecto en la migración de los melanocitos, se identificó la presencia de las células intermedias en la StV de los ratones nulos para *C-Raf* (**Figura 23e, j, líneas de puntos**).

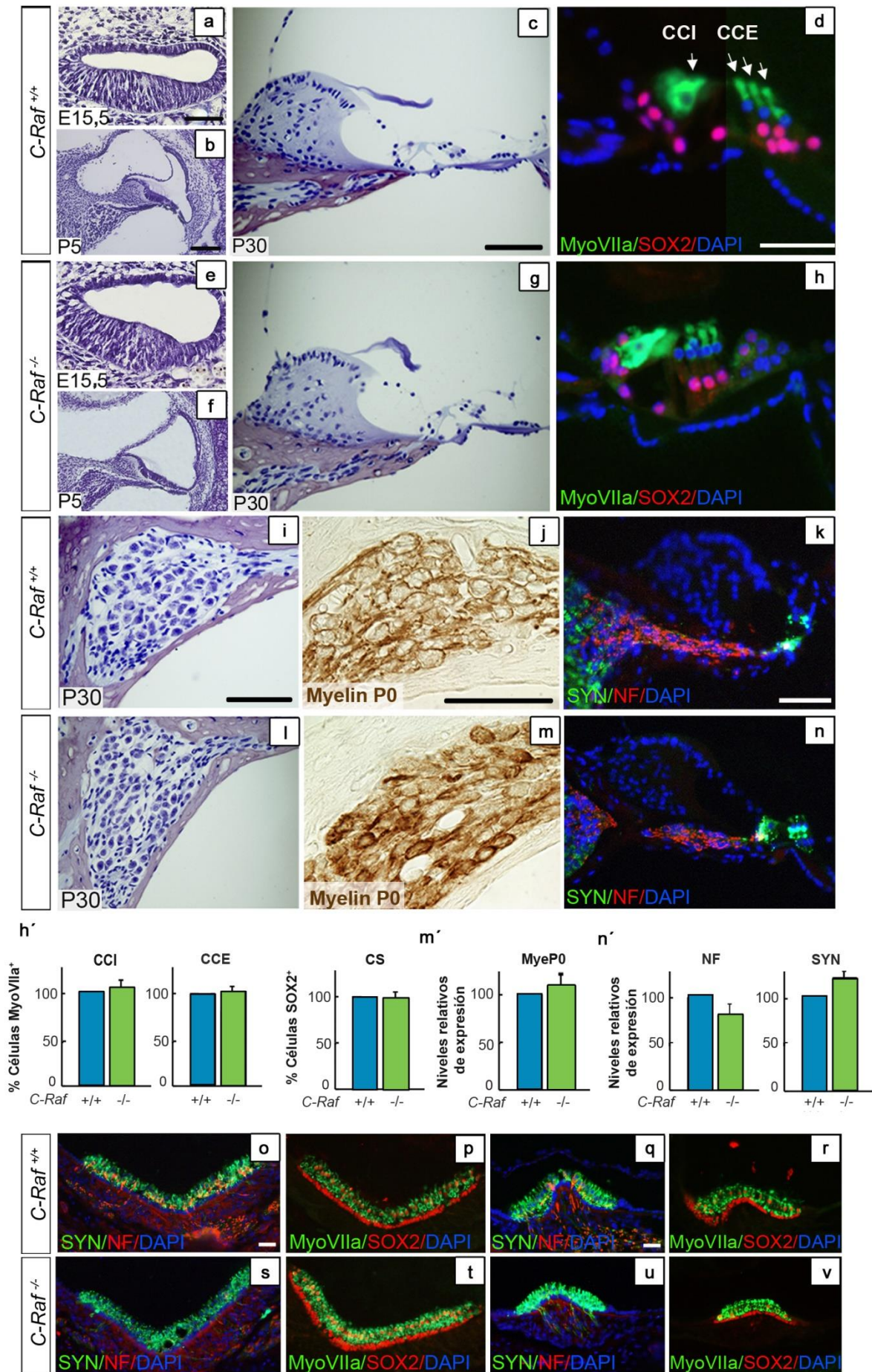


Figura 22. Citoarquitecturas coclear y vestibular de los ratones nulos para *C-Raf*. a-c, e-g) Secciones de la cóclea de ratones *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{-/-} de las edades indicadas teñidas con hematoxilina y eosina. La distribución de las células en el órgano de Corti es aparentemente normal. **d, h y h')** Cuantificación de la intensidad de los marcadores de las células ciliadas internas (CCI) y las células ciliadas externas (CCE) (Myo VIIa, verde) y de las células de soporte (SOX2, rojo). No se observaron diferencias entre genotipos. **i, I)** Se observó que la densidad y posición de las neuronas en el ganglio espiral fue normal en ratones P30 nulos para *C-Raf*. **j, m y M')** No se observaron diferencias significativas entre genotipos en la cuantificación de la intensidad de la Mye P0. **k, n y n')** Las cuantificaciones del marcaje de la intensidad de neurofilamento (NF, rojo) y sinaptofisina (SYN, verde) indicaron que no hay diferencias entre genotipos. **o-v)** No se observaron diferencias entre genotipos ni en el epitelio sensorial de la mácula y la cresta vestibular (Myo VIIa, verde; Sox2, rojo), ni en las fibras nerviosas (NF, rojo; SYN, verde). Las cuantificaciones se llevaron a cabo evaluando 4-12 cortes de al menos 3 ratones de cada genotipo. Los valores se han representado como la media±SEM. La significación estadística se calculó utilizando la t de Student. Barras de aumento: 10 µm (a, b, e, f, d, h); 25 µm (c, g, i, j, k, l, m, n); 20 µm (o-v).

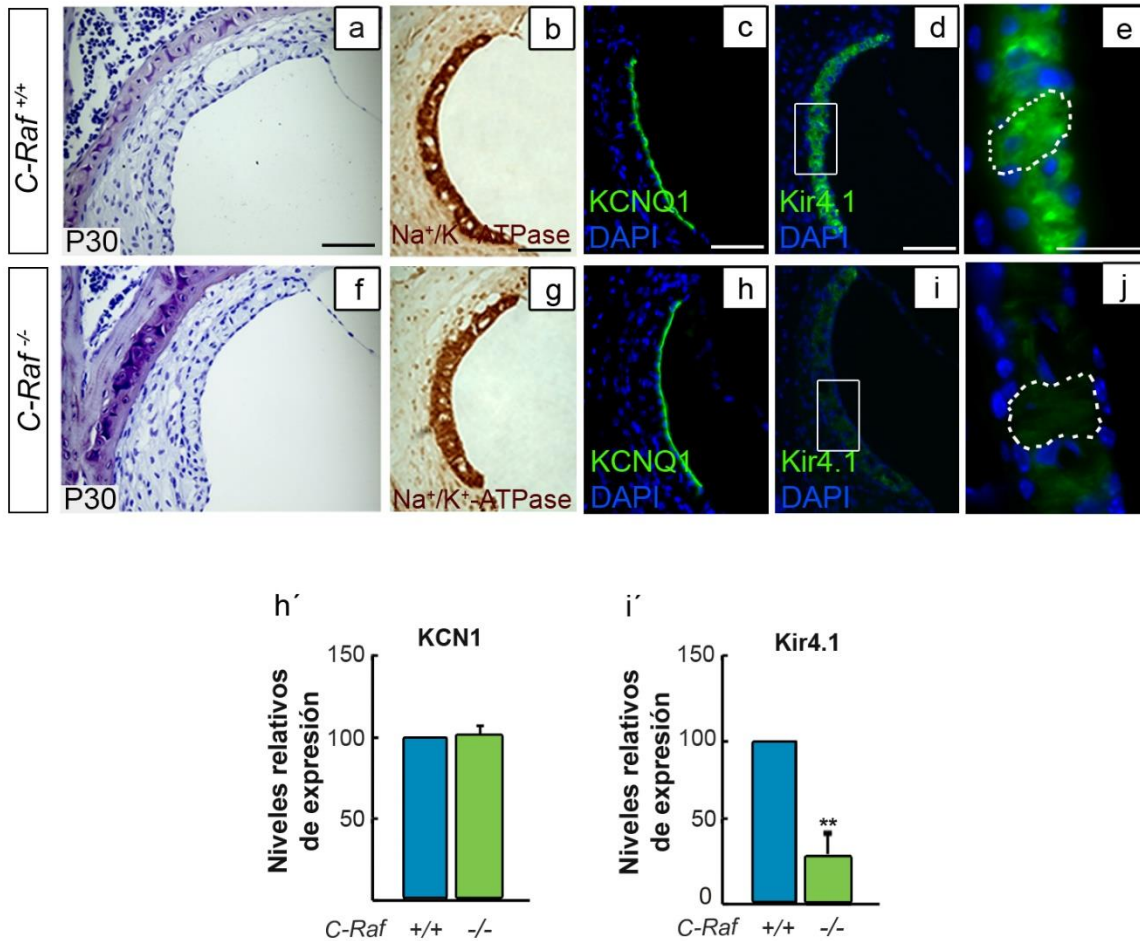


Figura 23. La expresión del canal de potasio Kir4.1 disminuye en ratones nulos para *C-Raf*.

a, f) Secciones cocleares, teñidas con hematoxilina y eosina, de ratones P30 nulos para *C-Raf* y silvestres. No se observaron diferencias en la distribución de las células de la estría vascular entre genotipos. **b, g, c y h)** No se observaron diferencias significativas en la expresión de la Na⁺/K⁺-ATPasa y el canal KCNQ1 en los animales nulos para *C-Raf* respecto los silvestres. **d, e, i, j, i')** Se observó una disminución significativa en los niveles de expresión del canal de potasio Kir4.1 de las células intermedias de la estría vascular. Las cuantificaciones se llevaron a cabo evaluando 4-12 cortes de al menos 3 ratones de cada genotipo. Los valores se han representado como la media ± SEM. La significación estadística se calculó utilizando la t de Student. **P < 0,01 versus *C-Raf*^{+/+}. Barra de aumento: 25 μm (a-d, f-i); 10 μm (e, j).

4.3.6. El perfil molecular de la cóclea de ratones nulos para *C-Raf* E18,5 muestra un aumento en la expresión de *FoxG1*

Se estudiaron los niveles de expresión de 13 genes cocleares de interés en ratones nulos para *C-Raf* y silvestres mediante la RT-qPCR. Los genes seleccionados incluyeron: i) genes que codifican para los miembros de las RAF quinasas, *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf* (**Figura 24a**); ii) dianas de la vía de señalización del IGF1, incluyendo *Igf1r*, *FoxM1*, *p27kip1*, *Mapk14*, *Gap43*, y *Ntn1* (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010, Hayashi *et al.*, 2014) (**Figura 24b; Tabla 5**) y; iii) genes implicados en el desarrollo del oído interno como *FoxG1* (Pauley *et al.*, 2006), *Sox2* (Neves *et al.*, 2007) (**Figura 24b; Tabla 5**), *Mef2D*, *Mash1* (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010) y *Gmfb* (Nishiwaki *et al.*, 2001) (**Tabla 5**). No se observaron diferencias significativas entre genotipos en los niveles de expresión de estos genes, con la excepción de *FoxG1*, un factor de transcripción que favorece la supervivencia neuronal (Pauley *et al.*, 2006, Dastidar *et al.*, 2011), cuya expresión está aumentada 2,5 veces en la cóclea de los ratones nulos para *C-Raf* respecto los silvestres (**Figura 24b**).

A continuación, se evaluaron los niveles y el estado de fosforilación de C-RAF, B-RAF, ERK1/2 y de las proteínas adaptadoras 14-3-3, así como las quinasas PI3K/AKT, p38 y JNK. No se observaron diferencias entre ambos genotipos (**Figura 25c**), lo que concuerda con los datos citológicos observados en los ratones nulos para *C-Raf*.

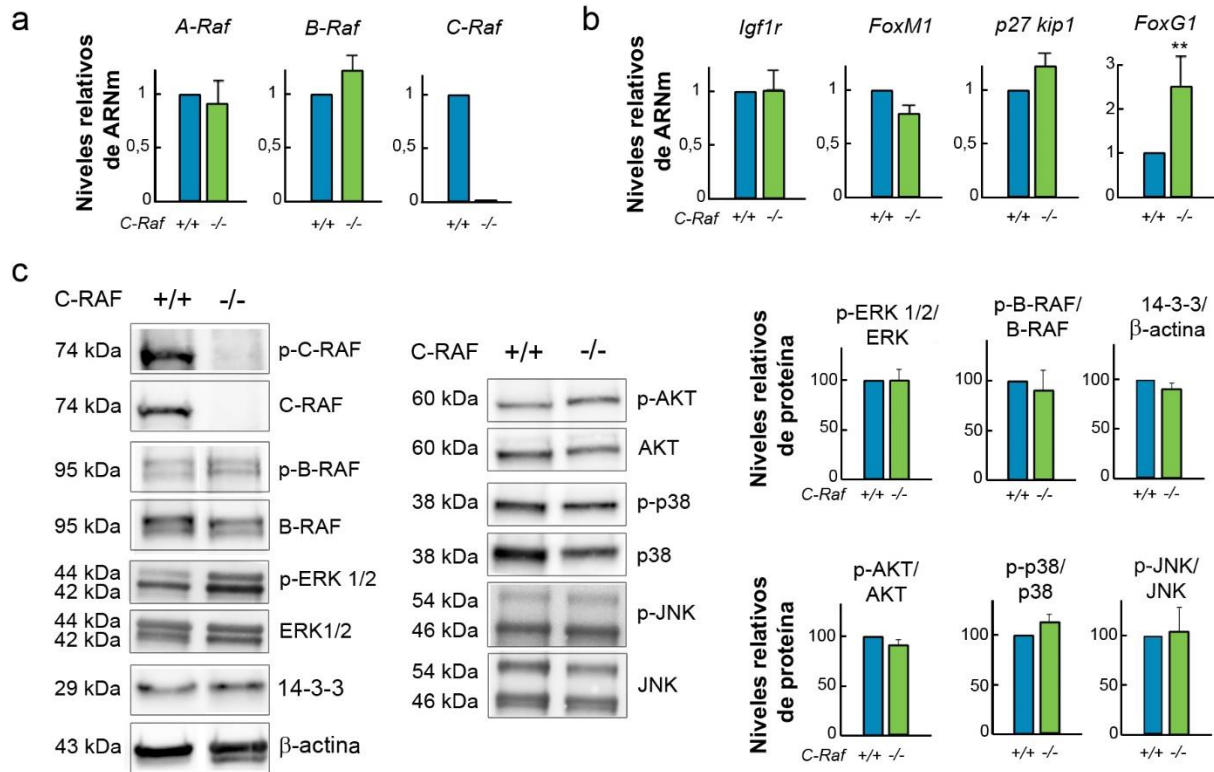


Figura 24. El análisis del perfil molecular de la cóclea de ratones nulos para *C-Raf* E18,5 muestra un aumento en la expresión de *FoxG1*. Se analizó la expresión génica de: (a) *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf*, (b) *Igf1r*, *FoxM1*, *p27 kip1*, y *FoxG1* en ratones E18,5 *C-Raf*^{+/+} (barras azules) y *C-Raf*^{-/-} (barras verdes), mediante RT-qPCR. Se utilizó el gen 18S como gen control endógeno. Se analizaron al menos 3 ratones de cada edad estudiada por triplicado. Los datos se normalizaron frente a los ratones *C-Raf*^{+/+} y se expresaron como la media±SEM de 2^{-ΔΔCt}. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante la prueba t de Student. **P<0,01 versus *C-Raf*^{+/+} (c) Se analizaron los niveles de p-B-RAF, p-C-RAF, p-ERK1/2 y 14-3-3 en la cóclea de ratones *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{-/-} mediante WB. Se normalizaron frente a los niveles de B-RAF, ERK1/2 y la β-actina, respectivamente. Los valores de p-AKT, p-p38 y p-JNK se normalizaron con AKT, p38 y JNK. Se muestran bandas representativas de los niveles de proteína y se calcularon los valores promedio tras densitometrar los resultados de WB mediante el programa ImageJ. Los resultados se expresan como media±SEM. La significación de las diferencias se evaluó mediante la prueba t de Student.

Tabla 5. Niveles de expresión de genes cocleares en ratones E18,5.

Gen	RQ
<i>FoxM1</i> (Factor de transcripción de tipo <i>forkhead box M1</i>)	0,87
<i>FoxG1</i> (Factor de transcripción de tipo <i>forkhead box G1</i>)	2,54**
<i>Gap43</i> (Proteína asociada al crecimiento 43)	0,89
<i>Gmf-b</i> (Factor de maduración glial, beta)	0,94
<i>Igf1r</i> (Receptor de alta afinidad del IGF-I)	1,06
<i>Mapk14</i> (p38 α , Proteína quinasa activada por mitógenos 14)	1,07
<i>Mash1</i> (<i>Mammalian achaete-scute homolog 1</i>)	1,22
<i>Mef2D</i> (Factor potenciador 2D de miocitos)	1,13
<i>Ntn1</i> (Netrina1)	1,18
<i>p27 kip1/Cdkn1b</i> (Inhibidor quinasa dependiente de ciclina 1B)	1,28
<i>Raf-A</i> (RAF quinasa A)	0,78
<i>Raf-B</i> (RAF quinasa B)	1,11
<i>Sox2</i> (Gen tipo <i>SRY-box 2</i>)	1,2

Se compararon los niveles de expresión de 13 genes cocleares en ratones E18,5 *C-Raf*^{+/+} y en *C-Raf*^{-/-} mediante la RT-qPCR. Los genes seleccionados se categorizaron en los siguientes cuatro grupos: i) miembros de la familia RAF: *A-Raf*, *B-Raf* y *C-Raf*; ii) dianas celulares de IGF-1: *Igf1r*, *Gap43*, *FoxM1*, *p27kip1* y *Mapk14*; iii) genes implicados en la morfogénesis del oído: *FoxG1* and *Sox2*; y finalmente, iv) genes que se expresan en las neuronas óticas o la glía: *Mef2D*, *Mash1*, *Gmf-b* y *Ntn*. Se utilizó el gen 18S como gen control endógeno. Se analizaron al menos 3 ratones de cada edad estudiada por triplicado. Los datos se normalizaron frente a los ratones *C-Raf*^{+/+} y se expresaron como el RQ calculado por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante la prueba t de Student. **P<0,01 versus *C-Raf*^{+/+}.

Puesto que el 1% de los ratones nulos para *C-Raf* que nacen mueren durante o en el primer mes de vida, los estudios posteriores de respuesta a estrés acústico se realizaron en ratones *C-Raf*^{+/-}.

4.3.7. Los ratones heterocigotos *C-Raf* presentan una mayor susceptibilidad al daño inducido por ruido

Para realizar estudios de respuesta a estrés se expusieron ratones heterocigotos *C-Raf*^{+/-} y ratones *C-Raf*^{+/+} de 2 meses de edad a un estrés acústico (**Figura 25a**). Primero se realizó un ABR basal y los ratones de ambos genotipos presentaron umbrales muy similares y con los valores normales correspondientes a su fondo genético (**Figura 25b**). Posteriormente, se expuso a los animales de ambos genotipos a un ruido de 110 dB SPL durante 30 minutos y se observó que a los dos días después del ruido los ratones *C-Raf*^{+/+} (cuadrados azules) y *C-Raf*^{+/-} (cuadrados rojos) presentaron un incremento en los umbrales auditivos de 40 y 60 dB SPL, respectivamente. Los ratones silvestres expuestos a ruido fueron paulatinamente recuperando el umbral auditivo basal. La recuperación de la audición empezó a evidenciarse a los 14 días tras la exposición al ruido y se recuperó transcurridos 35 días (**Figura 25b**). Sin embargo, los ratones heterocigotos no presentaron recuperación en la audición a lo largo de los 35 días siguientes a la exposición a ruido, manteniéndose el incremento de 60 dB en el umbral (**Figura 25b**).

Paralelamente, se realizaron pruebas de ABR a animales controles, no expuestos a ruido, *C-Raf*^{+/+} (círculos azules) y *C-Raf*^{+/-} (círculos rojos). Ambos genotipos presentaron umbrales similares y dentro de la normo-audición a lo largo de todo el estudio (**Figura 25b**). Estos resultados sugieren que el déficit parcial de C-RAF causa una mayor susceptibilidad al daño inducido por ruido.

4.3.8. Los ratones heterocigotos *C-Raf* expuestos a ruido presentan alteraciones en la citoarquitectura coclear y en la expresión de marcadores celulares

A continuación, se analizó si la pérdida auditiva de los animales *C-Raf*^{+/-} estaba asociada con alteraciones celulares en la cóclea. Se analizaron secciones histológicas teñidas con violeta de cresilo (**Figura 26**) de ratones *C-Raf*^{+/+} (**a-e**) y *C-Raf*^{+/-} (**k-o**) no expuestos a ruido y de ratones *C-Raf*^{+/+} (**f-j**) y *C-Raf*^{+/-} (**p-t**) expuestos a ruido.

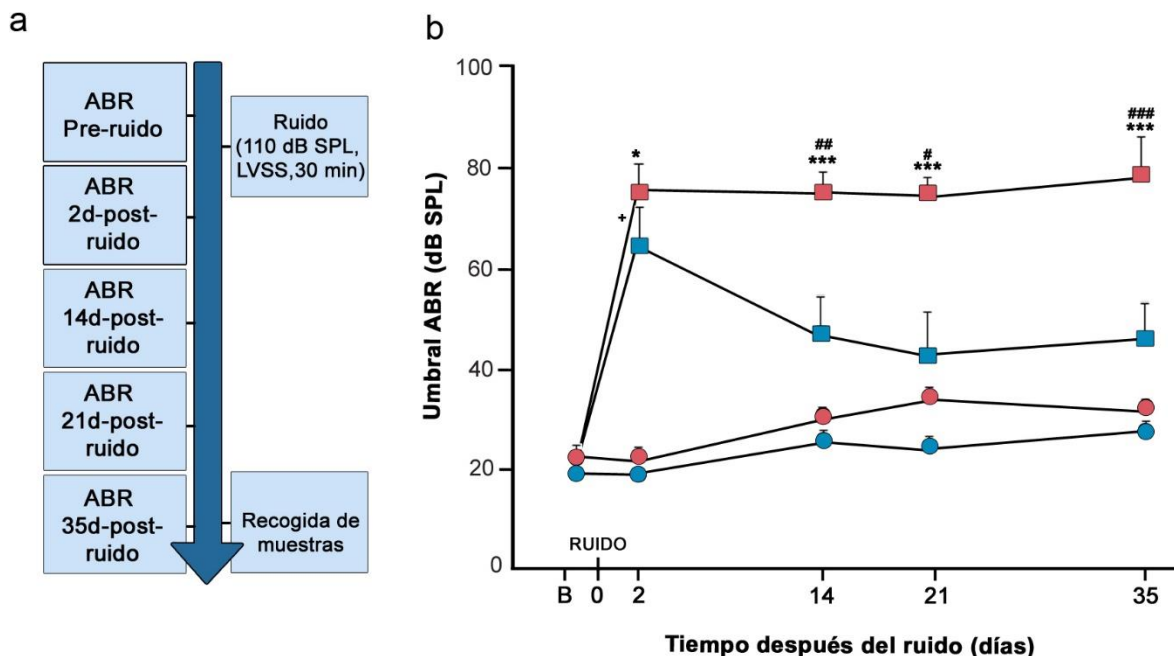


Figura 25. Los ratones heterocigotos *C-Raf* presentan una mayor susceptibilidad al daño inducido por ruido. a) Esquema del diseño experimental. Se determinó el ABR basal de los dos grupos experimentales, ratones *C-Raf*^{+/+} (n=16) y *C-Raf*^{+/-} (n=15) de dos meses de edad. Posteriormente los ratones fueron expuestos a un ruido de 110 dB SPL (2-22 kHz) durante 30 minutos en una cámara de reverberación. Se determinaron los umbrales del ABR los días 2, 14, 21 y 35 tras el ruido. b) Representación de los umbrales de respuesta al estímulo click de ambos grupos experimentales. Los datos de los ratones no expuestos a ruido (n=4/genotipo) se muestran en círculos y los datos de los ratones expuestos a ruido (n=4/genotipo) en cuadrados. Se observó que los umbrales de ABR de los ratones *C-Raf*^{+/+} (n=4, azul) y *C-Raf*^{+/-} (n=4, rojo) fueron similares 2 días tras el ruido. Los ratones *C-Raf*^{+/+} recuperaron gradualmente la audición, pero los *C-Raf*^{+/-} no mostraron cambios en el umbral. Los umbrales de los animales sin ruido no se modificaron durante el experimento. Los resultados se expresan como media ± SEM. La significación de las diferencias se evaluó mediante la prueba t de Student.

⁺P<0,05 versus *C-Raf*^{+/+} no tratados; [#]P<0,05, ^{##}P<0,01 y ^{###}P<0,001 versus *C-Raf*^{+/+} expuestos a ruido; *P<0,05 y ***P<0,001 versus *C-Raf*^{+/-} no tratados.

Los animales de ambos genotipos no expuestos a ruido presentaron cócleas normales durante el estudio (**Figura 26a-e, k-o**). Los animales *C-Raf*^{+/+} expuestos a ruido presentaron a los 35 días una reducción de la población de fibrocitos en la región central del limbo espiral, pero no se observaron más alteraciones celulares (**Figura 26f-j, asterisco en g**). Sin embargo, los ratones heterocigotos expuestos a ruido presentaron un daño generalizado en la cóclea (**Figura 26p-t**). Se observó una pérdida de las células interdentadas del limbo espiral (**Figura 26q, flechas**), así como, alteraciones en el órgano de Corti consistentes en un colapso en el túnel de Corti y una pérdida en la densidad de células ciliadas y células de soporte (**Figura 26r, flechas**). Por otra parte, estos animales presentaron una disminución en la densidad de fibrocitos del ligamento espiral, que se evidenció por la presencia de *debris* celulares en la región donde se localizan los fibrocitos tipo IV (**Figura 26s**). Finalmente, se observó que el ganglio espiral presenta alteraciones como la pérdida de fibras y la pérdida de células, puesto que hay un aumento en el tamaño de los espacios intercelulares (**Figura 26t**).

Además, se realizó una evaluación de la integridad de los tipos celulares. Se observó una reducción significativa del 25% en la población de las células de soporte (SOX2, rojo) y del 40% en el número de células ciliadas externas (MioVIIa, verde), en los ratones *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido respecto al resto de grupos experimentales (**Figura 27, comparar a con e, flecha; cuantificación en e'**). En relación con estos datos a los 35 días, se observó a los 2 días tras la exposición a ruido un aumento en el número de células apoptóticas positivas para TUNEL en la cóclea de los animales *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido (**Figura 27a, e; recuadros; cuantificación de TUNEL en e'**). Se observó que los animales heterocigotos expuestos a ruido mostraron una disminución en la expresión de los marcadores del GE (NF, Mye P0), confirmando lo observado en el estudio histológico. También se analizó la sinápsis de las células ciliadas, y se observó una disminución del 80% en la expresión del marcador anti-sinaptofisina en los ratones *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido respecto al resto de grupos experimentales (**Figura 27, comparar b y c con f y g, flecha; cuantificación en f', g'**). Por último, se estudió la StV, y se observó que los animales *C-Raf*^{+/+} expuestos a ruido presentaron un aumento del 60% en el nivel de expresión de Kir4.1 (**Figura 27d – h, cuantificación en h'**).

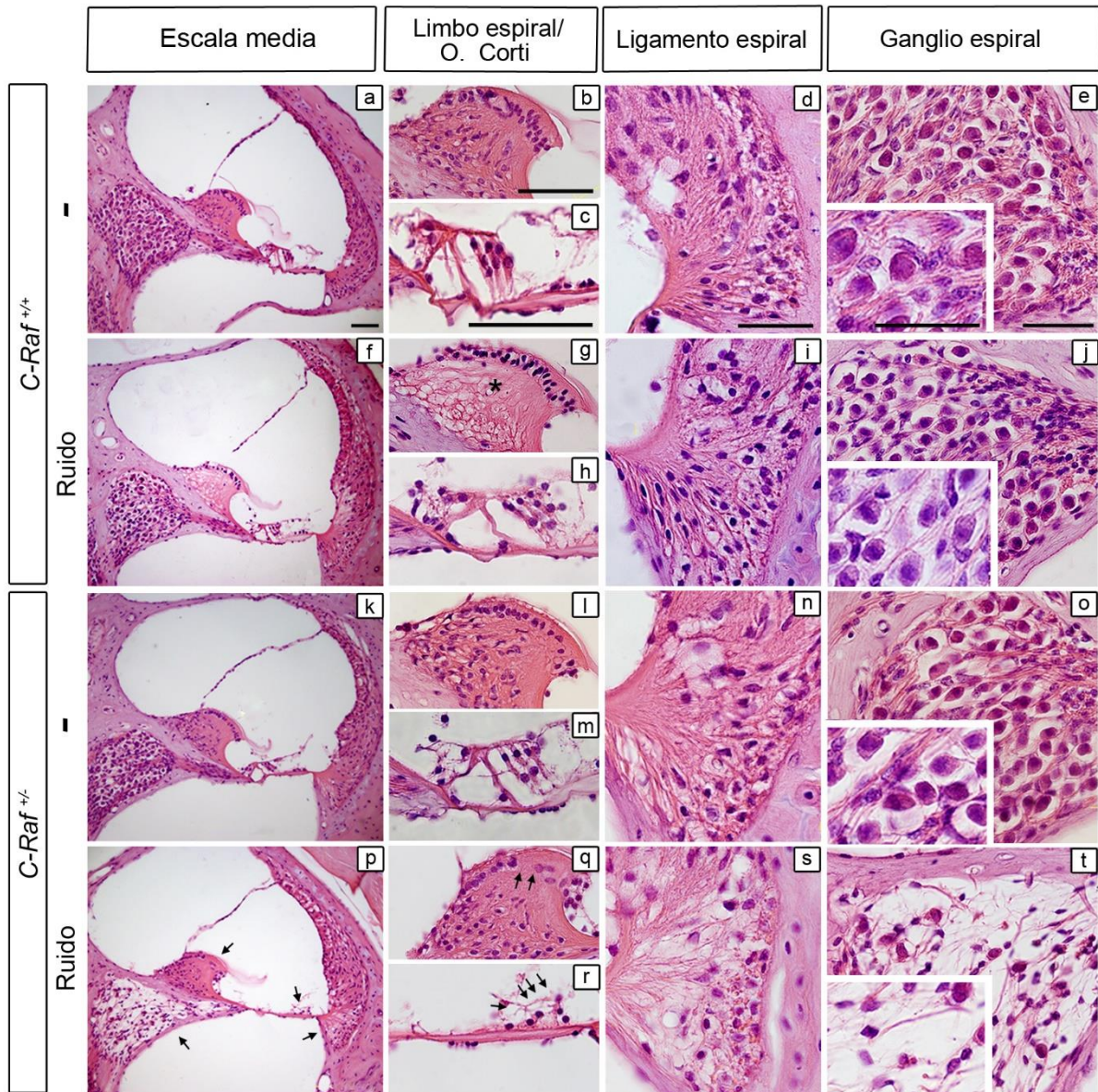


Figura 26. Los ratones heterocigotos para *C-Raf* expuestos a ruido presentan alteraciones graves en la citoarquitectura coclear. Se muestran cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de animales *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{+/-} a los 35 días tras la exposición a ruido y de ratones sin ruido. Se muestran cortes histológicos de ratones *C-Raf*^{+/+} no expuestos a ruido (**a-e**) y expuestos a ruido (**f-j**), que presentaron una reducción en el número de fibrocitos en el limbo espiral (**g**, **asterisco**). Los ratones *C-Raf*^{+/-} no expuestos a ruido (**k-o**) mostraron un fenotipo idéntico a los ratones *C-Raf*^{+/+} no expuestos a ruido. **p-t** Se observaron las siguientes alteraciones en los animales *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido: pérdida de células en el limbo espiral (**q**, **flechas**), pérdida de células ciliadas y de soporte en el órgano de Corti (**r**, **flechas**), pérdida de fibrocitos en el ligamento espiral (**s**); y en el ganglio espiral se observó una drástica reducción en la densidad neuronal (**t**). Barra de aumento: 25 µm.

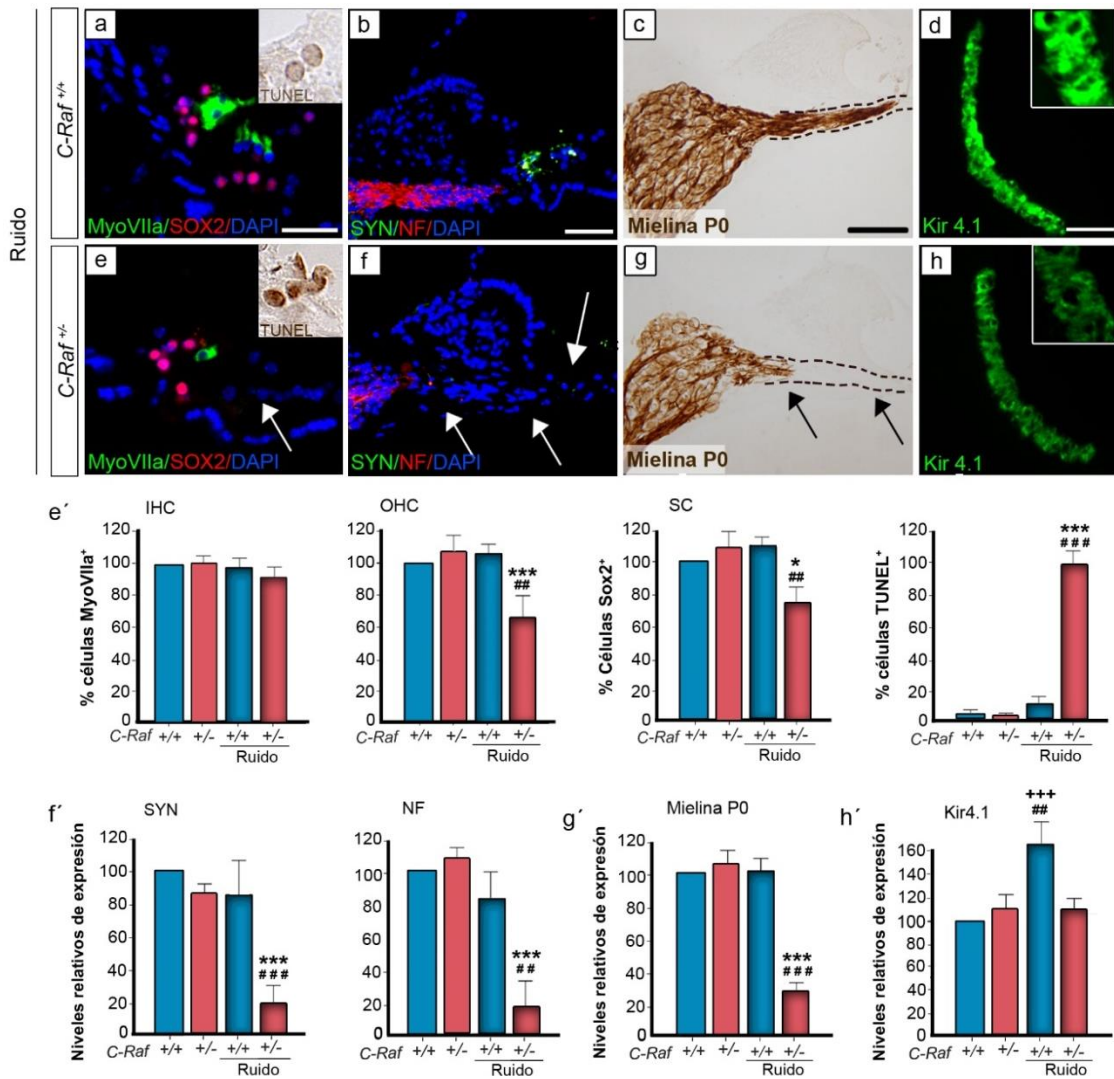


Figura 27. Los ratones heterocigotos para *C-Raf* expuestos a ruido presentaron alteraciones específicas en la expresión de marcadores celulares. **a, e, e')** Los ratones *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido mostraron un patrón inmunohistoquímico distinto. Se observó una reducción del 40% y 25% en el número de células ciliadas externas (Miosina VIIa, verde) y células de soporte (SOX2, rojo), respectivamente. El marcaje con TUNEL 2 días tras el ruido (**insets a, e**) presentó un incremento del 95% en los animales *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido respecto al resto de grupos experimentales (**e'**). **b, c, f, g, f'g')** Los marcadores neuronales neurofilamento NF (rojo), sinaptofisina (verde) y Mielina P0 (marrón) evidenciaron la pérdida de neuronas y fibras neuronales en los animales *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido. **d, h, h')** Se observó un incremento del 60% en el marcaje con el canal de potasio Kir4.1(verde) en las células intermedias de la estría vascular en los ratones *C-Raf*^{+/+} expuestos a ruido, pero no en los *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido. La intensidad de la señal fue cuantificada con el programa ImageJ. Los resultados se obtuvieron de 4 a 12 cortes de al menos 3 ratones de cada grupo experimental y se expresaron como media \pm SEM. La significación de las diferencias se evaluó mediante la prueba t de Student. ⁺⁺⁺P<0,001 versus *C-Raf*^{+/+} no expuestos a ruido; *P<0,05 y ^{***}P<0,001 versus *C-Raf*^{+/-} no expuestos a ruido; ^{##}P<0,01 y ^{###}P<0,001 versus *C-Raf*^{+/-} expuestos a ruido. Barra de aumento: 10 μ m (a, e); 25 μ m (b-d) (f-h).

4.3.9. Los ratones heterocigotos *C-Raf* presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas

Se realizó un estudio del estado de fosforilación de las principales quinasas. Para ello se utilizaron ratones *C-Raf*^{+/+} y *C-Raf*^{+/-} dos días tras la exposición a ruido y controles de ambos genotipos (**Figura 28a**). Los ratones heterocigotos sin ruido presentaron un incremento significativo de la relación basal p-JNK/JNK respecto los silvestres (**Figura 28b, cuantificación en c**). En respuesta al ruido, ambos genotipos mostraron un aumento de 2 y 1,5 veces en la activación de p-ERK/ERK y p-JNK/JNK, respectivamente. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en relación de p-AKT/AKT, un indicador de la supervivencia celular (**Figura 28b, cuantificación en c**). También se midieron los niveles de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) fragmentado (f-PARP-1), un indicador de muerte celular por apoptosis, y se observó un aumento significativo en respuesta a ruido de los dos genotipos estudiados (**Figura 28b, cuantificación en c**). La proporción de PARP fragmentado fue significativamente mayor en los ratones heterocigotos.

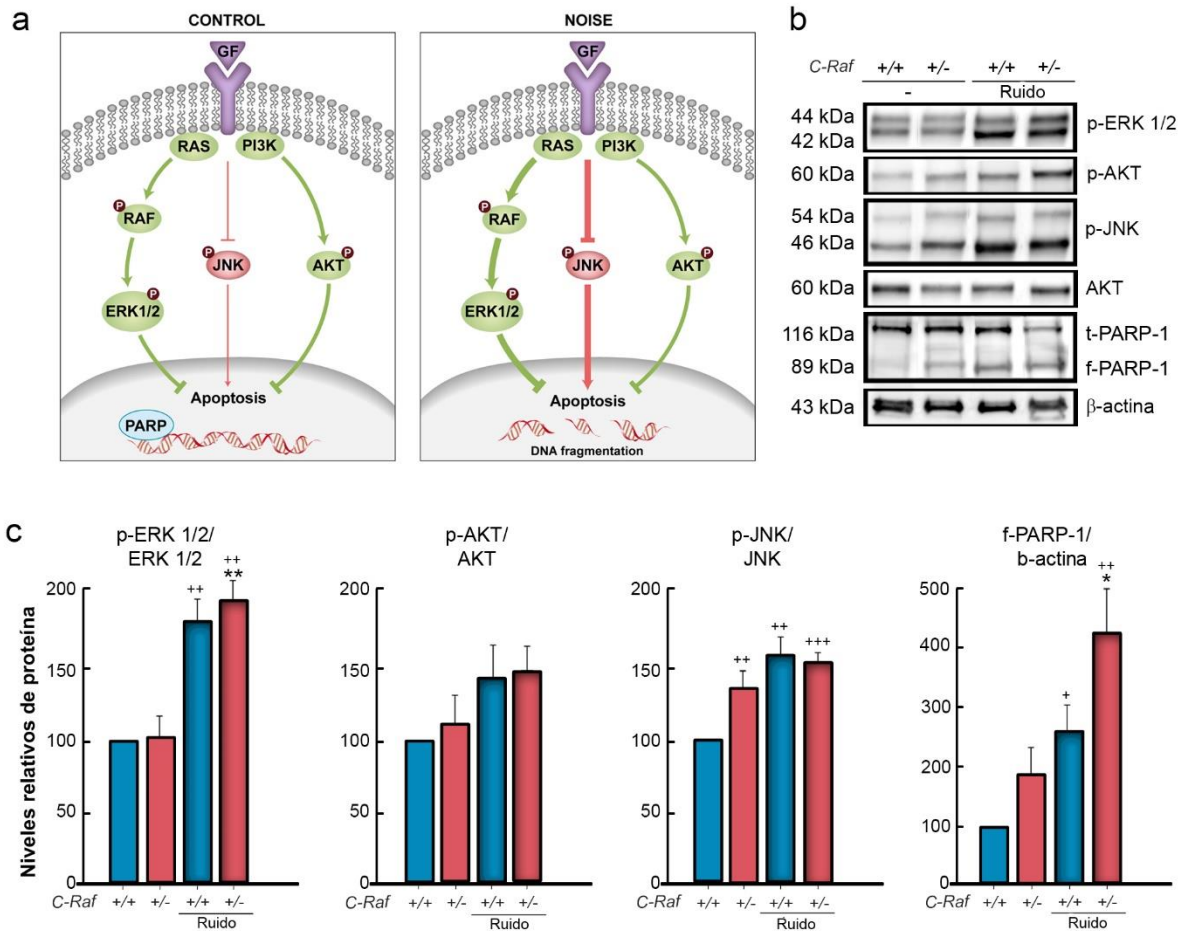
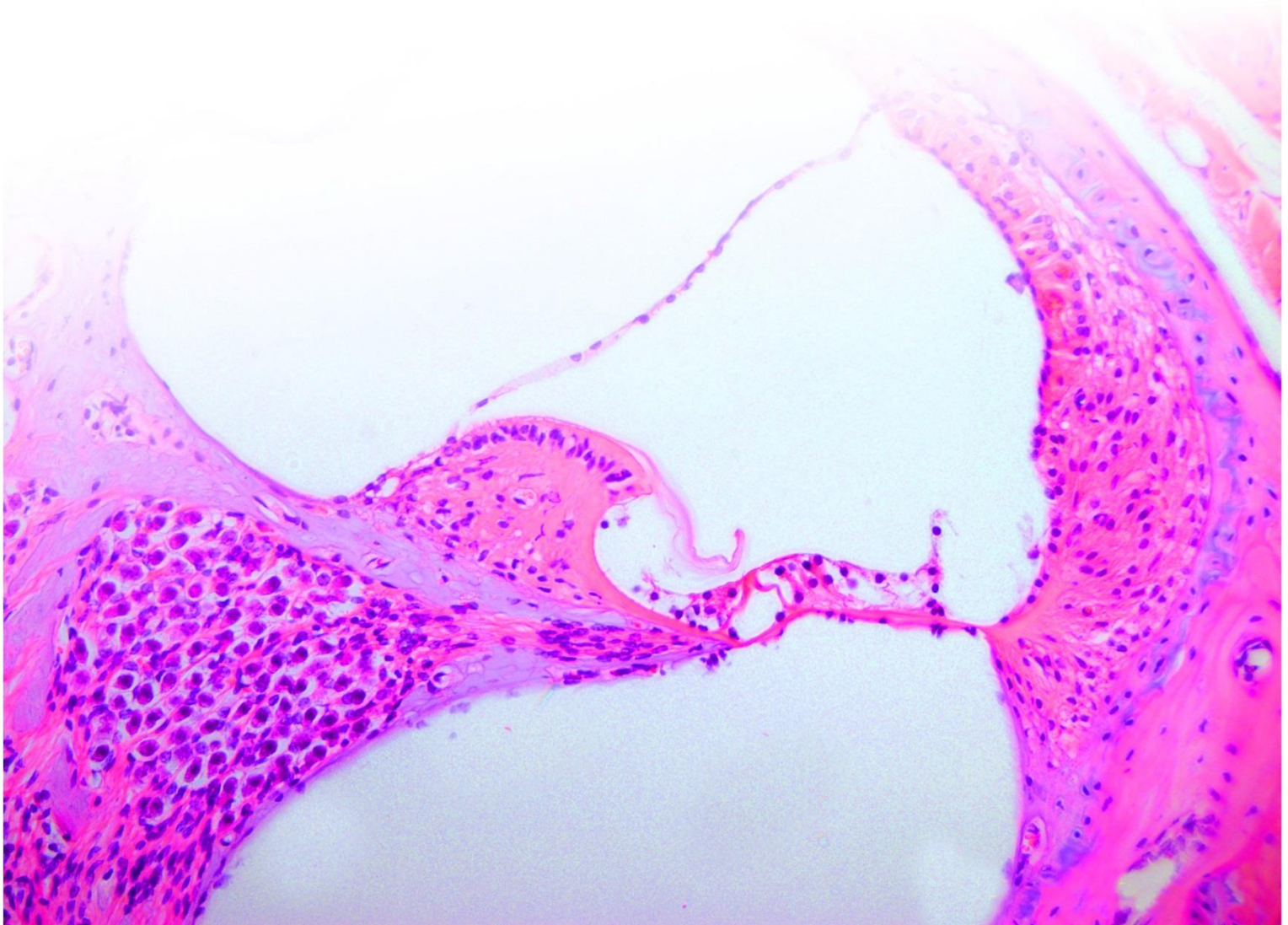


Figura 28. Los ratones heterocigotos para *C-Raf* expuestos a ruido presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas. **a)** Diagrama con las vías RAF-MEK-ERK, PI3K/AKT, y JNK que están implicadas en protección celular y la reparación en los ratones control (izquierda) y ratones expuestos a ruido (derecha). GF: Factor de crecimiento. **b, c)** Se analizaron los niveles de p-ERK1/2, p-AKT, y p-JNK y el f-PARP-1 por *Western Blotting*. Se muestran bandas representativas (**b**) de al menos tres ratones de cada grupo experimental, y se calcularon los valores promedio obtenidos de las mediciones densitométricas mediante el programa ImageJ (**c**). Los niveles de proteína se normalizaron frente a los niveles de AKT, excepto f-PARP-1 que se normalizó frente a la β -actina. Los valores se expresan como media \pm SEM. La significación de las diferencias se evaluó mediante la prueba t de Student. $^*P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$ y $^{***}P < 0,001$ versus *C-Raf* $^{+/+}$ no expuestos a ruido; $^*P < 0,05$ y $^{**}P < 0,01$ versus *C-Raf* $^{+/-}$ no expuestos a ruido.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

5.1. I. El déficit de IGF-1 modifica los niveles de algunos componentes del sistema IGF y de los principales elementos de señalización intracelular

Se ha descrito que el IGF-1 participa en el desarrollo del oído interno promoviendo la proliferación y supervivencia de los precursores neurales del oído interno y, en estadios posteriores, la diferenciación de los neuroblastos post-mitóticos (Murillo-Cuesta *et al.*, 2011, Okano *et al.*, 2011, Sanchez-Calderon *et al.*, 2007). Los ratones deficientes en *Igf1* desde el primer mes de edad presentan alteraciones celulares en el órgano de Corti, la estría vascular y en el ganglio coclear. Estas alteraciones producen sordera neurosensorial profunda bilateral y reproducen la patología observada en las enfermedades asociadas con el IGF-1 en el hombre (Varela-Nieto *et al.*, 2013). En este trabajo hemos estudiado los mecanismos moleculares por los que el IGF-1 regula el desarrollo y la maduración coclear mediante el análisis de los componentes del sistema IGF y de los principales elementos de señalización intracelular de esta vía, utilizando para ello un modelo de ratón nulo para *Igf1*. Se ha demostrado que: i) el déficit de *Igf1* se está compensando a nivel de su receptor *Igf1R* y a nivel del *Igf2* en edades adultas; ii) las RAF quinasas se expresan en la cóclea en desarrollo y adulta de ratón. El déficit de *Igf1* se asocia con un aumento en la expresión de A-RAF y C-RAF en edades postnatales; y iii) así mismo, este déficit disminuye la activación de AKT en los estadios E18,5 y P30-60, y aumenta la activación de p38 en E18,5.

5.1.1. El déficit de IGF-1 en la cóclea se compensa parcialmente a nivel de su receptor de alta afinidad, IGF1R, y de IGF-2

Con el objetivo de comprender mejor qué elementos del sistema IGF participan en la regulación del desarrollo auditivo y durante el envejecimiento, se han estudiado el *Igf1R* e *Igf2*. En este estudio no se han observado diferencias en los niveles de expresión del *Igf1R* e *Igf2* en ratones E18,5 nulos para *Igf1* cuando los comparamos con los silvestres. Sin embargo, el déficit del IGF-1 podría compensarse en edades adultas, al menos en parte, por un aumento en la expresión de los transcritos de *Igf1R* e *Igf2*. Se ha observado un aumento significativo en los niveles de *Igf1R* de los ratones nulos para *Igf1* en las edades P30-60 y P270, lo que concuerda con estudios anteriores en los que se describe un aumento de *Igf1R* en la cóclea de ratones nulos para *Igf1* después del

nacimiento hasta P90 (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010). También se ha observado un aumento significativo en los niveles de *Igf2* en ratones P270 nulos para *Igf1*. Aunque no estaba descrita anteriormente la expresión de *Igf2* en ratones P270 nulos para *Igf1* sí se había descrito en edades comprendidas entre E15,5 hasta P90, no habiéndose encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión de *Igf2* entre los ratones nulos para *Igf1* y los silvestres (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010).

Estos datos observados en la cóclea coinciden con estudios de expresión de *Igf1R* e *Igf2* que se han realizado en otros órganos. Se ha descrito que en pulmones de ratones embrionarios E18,5 nulos para *Igf1* no existen diferencias en los niveles de expresión de los genes *Igf1R* e *Igf2* al compararlos con los ratones silvestres (Pais *et al.*, 2013), lo que coincide con nuestros resultados en cóclea de ratones E18,5. Otro estudio que concuerda con nuestros resultados, en este caso en ratones adultos, es el realizado en el fémur de ratones nulos para *Igf1* de 2 y 4 meses de edad. Se ha descrito que en estos ratones están aumentados los niveles de expresión génica de *Igf2* e *Igf1r* al compararlos con los silvestres, posiblemente como respuesta a la deficiencia del IGF-1 (Rodriguez-De La Rosa *et al.*, 2014).

Otros componentes de la ruta IGF que intervienen en la cóclea del ratón en desarrollo son las proteínas de unión a IGF-1 (IGFBP) y los transcritos *Igfbp2-5* presentan patrones específicos y complementarios. Estos datos sugieren que las IGFBP regulan con precisión la activación de la señalización de IGF-1 de una manera específica del tipo celular, contribuyendo a la diferenciación celular en la cóclea (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010, Okano y Kelley, 2013). Asimismo, se ha publicado que los ratones nulos para *Igf1* presentan mayores niveles de expresión de los transcritos *Igfbp2* e *Igfbp3* en estadios embrionarios y postnatales respecto a los silvestres (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010, Okano y Kelley, 2013).

Todos estos datos sugieren que durante el desarrollo embrionario y adulto el déficit de IGF-1 podría compensarse parcialmente a nivel de *Igfbp2* e *Igfbp3* y en el ratón adulto, además, a nivel del *Igf1R* y del *Igf2*, aumentando así los niveles de estos transcritos en los ratones nulos para *Igf1*. Este hecho podría explicar por qué el tamaño de la cóclea del ratón nulo para *Igf1* es prácticamente normal si tenemos en cuenta las diferencias en el peso corporal y las alteraciones en el crecimiento que presentan estos

animales. Aunque estos mecanismos compensatorios serían sólo parciales puesto que los ratones deficientes en *Igf1* desde el primer mes de edad presentan sordera neurosensorial profunda bilateral debida a alteraciones celulares en el órgano de Corti, la estría vascular y en el ganglio coclear.

5.1.2. Los ratones nulos para *Igf1* presentan niveles aumentados de A-RAF, C-RAF y p-p38 y disminuidos los niveles de p-AKT

En este trabajo se han estudiado algunos de los componentes de las principales vías de señalización del IGF-1. Se ha encontrado un aumento en los niveles de transcrito y de proteína de A-RAF y C-RAF en los ratones nulos para *Igf1* de edades comprendidas entre P30-60 y P270. Sin embargo, no se han observado diferencias entre genotipos en el nivel de fosforilación de ERK, diana principal de las RAF quinasas, en ninguna de las edades estudiadas. Aunque las tres proteínas RAF pueden fosforilar su diana ERK, B-RAF es la más eficiente (Galabova-Kovacs *et al.*, 2006), esto podría explicar por qué aunque aumenten los niveles de A-RAF y C-RAF no aumentan los niveles de p-ERK.

Se ha descrito que el déficit de IGF-1 en la cóclea de ratones embrionarios E18,5 disminuye la actividad de las vías de señalización que regulan la proliferación y la supervivencia (AKT), y aumenta aquellas implicadas en la respuesta celular al estrés (p-38) (Sanchez-Calderon *et al.*, 2010). En nuestro trabajo se analiza el patrón temporal de la activación de AKT y p-38 hasta la edad de P270. Se confirma que los ratones nulos para *Igf1* presentan un aumento en la activación de p38 y una disminución significativa en la activación de AKT en la edad de E18,5 al compararlos con los silvestres. Además, nuestros datos demuestran que AKT mantiene disminuida su activación de forma significativa en los ratones P30-60 nulos para *Igf1*.

En el hueso de ratones nulos para *Igf* de 2 y 4 meses de edad se ha descrito que no hay diferencias en la activación de ERK y p38, sin embargo, disminuye la activación de AKT al compararlos con los silvestres, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo (Rodriguez-De La Rosa *et al.*, 2014). Sin embargo, nuestros datos contrastan con los observados en pulmones de ratones E18,5 nulos para *Igf1*. Se describió un aumento en la activación de ERK2 en ratones E18,5 nulos para *Igf1* respecto a los silvestres, en cambio, no se observaron diferencias entre genotipos en la

activación de AKT y p38 (Pais *et al.*, 2013). Esto podría deberse a que el IGF-1 tiene un efecto distinto dependiendo de cada contexto celular.

En resumen, las principales vías de señalización del sistema IGF-1 en la cóclea se ven afectadas por la deficiencia de IGF-1 en la cóclea embrionaria y adulta, lo que va a suponer una desregulación intracelular. El déficit de IGF-1 se asocia con un incremento en los niveles de transcrito y proteína de A-RAF y C-RAF, quinasas implicadas en proliferación, un incremento en la activación de p38 que promueve acciones inflamatorias y una disminución en la activación de AKT, asociada a supervivencia, siendo estos efectos específicos del tejido estudiado.

5.2. La autofagia está presente en el oído interno del ratón durante su desarrollo embrionario y en el adulto y su acción se localiza en las neuronas del ganglio espiral

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas y tiene un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y en el adulto. La desregulación de la autofagia se relaciona con patologías autoinmunes, cáncer, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Lopez-Otin *et al.*, 2013, Menardo *et al.*, 2012, Nixon, 2014, Schneider y Cuervo, 2014, Tan *et al.*, 2014, Eltschinger y Loewith, 2016). Durante el desarrollo del oído interno en pollo, la autofagia es fundamental en la eliminación de células apoptóticas y en la facilitación de la migración de los neuroblastos óticos (Aburto *et al.*, 2012b). El IGF-1 se ha descrito tanto como regulador positivo como negativo de la autofagia en función del contexto celular (Bains *et al.*, 2009, Renna *et al.*, 2013, Sobolewska *et al.*, 2009). En el ratón, el déficit en IGF-1 causa sordera neurosensorial y alteraciones celulares, siendo fundamental para el mantenimiento funcional del receptor auditivo (Varela-Nieto *et al.*, 2013). En este trabajo se ha estudiado la relación entre el IGF-1 y la autofagia en el oído de ratón, utilizando para ello un modelo de ratón nulo para *Igf1*, y se ha demostrado que: i) la autofagia está presente y activa en la cóclea, vestíbulo y cerebro durante el desarrollo y en el ratón adulto; ii) la autofagia está más activa durante el periodo postnatal, a partir de edades en las que la cóclea alcanza su plena actividad funcional, puesto que hay mayor expresión de genes autofágicos y marcadores de autofagosomas que en etapas embrionarias; iii) la autofagia está activa en las neuronas del ganglio espiral; v) los

ratones nulos para *Igfl* no presentan diferencias significativas en la expresión de genes autofágicos y marcadores de autofagosomas respecto a los ratones silvestres.

En este trabajo se demuestra que la maquinaria molecular autofágica se expresa y está activa en el oído interno de ratón, desde la etapa embrionaria hasta la edad adulta. Nuestros resultados indican que los genes *Becn1*, *Atg4b*, *Atg5* y *Atg9* se expresan en el oído interno y que su expresión aumenta desde las edades perinatales (E18,5 y P0) hasta las edades adultas (P30-60 y P270), que es cuando el oído interno postnatal gana madurez funcional. Se ha descrito que la autofagia se induce inmediatamente después del nacimiento en varios tejidos de ratón, de hecho, actúa como fuente de energía esencial durante este período, y en consecuencia los ratones deficientes en alguno de estos genes: *Atg5*, *Atg7*, *Atg9* y *Atg16L*, mueren poco después de nacer y presentan una reducción de los niveles de aminoácidos en sangre y tejido adiposo (Kuma *et al.*, 2004).

Sin embargo, que los niveles de expresión de los genes *Atg* en estadios embrionarios sean más bajos que en el ratón adulto no indica que la autofagia no esté operativa (Martinet *et al.*, 2006). Por lo tanto, nuestros resultados no excluyen que la autofagia tenga un papel importante durante esta etapa del oído interno, al contrario, parece ser un proceso clave teniendo en cuenta la gran variedad de genes autofágicos que hemos descrito en este trabajo en la cóclea de ratones E18,5. De hecho, se ha descrito que la expresión de estos genes en estadios embrionarios tempranos juega un papel fundamental en el desarrollo de la vesícula ótica de pollo (Aburto *et al.*, 2012b).

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la expresión de la maquinaria autofágica entre P0 y P30 lo que sugiere que la autofagia desempeña un papel clave en el inicio de la función del oído interno, de hecho el receptor auditivo completa su maduración funcional en el periodo P14-P30 (Rueda *et al.*, 1996). Nuestros resultados también ponen de manifiesto que la autofagia se mantiene elevada en ratones adultos jóvenes. Estos resultados podrían indicar que la autofagia en ratones P30-60 contribuye a mantener la homeostasis coclear y reducir la inflamación y, por lo tanto, mantener la audición adulta. De hecho, se ha descrito que en ratones SAMP8 jóvenes, que presentan hipoacusia prematura y degeneración coclear, la autofagia podría ser una estrategia para eliminar las mitocondrias dañadas y las proteínas aberrantes producidas por el estrés oxidativo y la inflamación crónica (Menardo *et al.*, 2012).

En este trabajo también se ha observado que la autofagia disminuye al año de edad. La esperanza de vida de los ratones nulos para *Igfl* es de un año, durante este tiempo los ratones presentan hipoacusia neurosensorial profunda bilateral, la degeneración del ganglio espiral y daño en la estría vascular (Riquelme *et al.*, 2010, Varela-Nieto *et al.*, 2013). Se ha descrito que la inflamación aumenta con la edad y que se produce una acumulación de proteínas debido al mal funcionamiento de la proteostasis siendo necesarios mecanismos de mantenimiento de la célula (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Por lo tanto, la disminución observada en la expresión de genes de la maquinaria autofágica podría ser la causa o la consecuencia del fenotipo coclear.

Las conclusiones obtenidas de los datos de la expresión génica se respaldan con los niveles de LC3-II y SQSTM1/p62, ya que el ratio LC3-II/LC3-I aumenta y los niveles de SQSTM1/p62 disminuyen, situación que refleja el aumento de la actividad autofágica. La correlación inversa de los niveles de LC3-II con SQSTM1/p62 es el indicador más fiable de inducción de la autofagia (Bjorkoy *et al.*, 2009, Klionsky *et al.*, 2008, Klionsky *et al.*, 2016). Los ratones P270 comparados con los embrionarios (E18,5), presentan un incremento del fragmento LC3-II tanto en la cóclea como en el vestíbulo asociado a una disminución de los niveles de SQSTM1/p62. Se ha observado que los niveles de SQSTM1/p62 disminuyen significativamente en los tres tejidos y los dos genotipos estudiados en ratones P270. Sin embargo, los niveles relativos de LC3-II no aumentan significativamente ni en el vestíbulo ni en el cerebro de ratones silvestres y nulos para *Igfl*. Este hecho se puede explicar porque los niveles relativos de LC3-II pueden ser fácilmente alterados por distintos factores, así como por la dificultad de detectar LC3-II (Mizushima y Yoshimori, 2007).

Además, se ha observado la presencia de LC3B en secciones cocleares mediante inmunohistofluorescencia. Las neuronas de los ratones de edades P30-90 presentan un marcaje de LC3B en el soma en forma de punteado que corresponde con la activación de la autofagia, lo cual no ocurre en el estadio embrionario E18,5, donde el marcaje fue difuso. Estos resultados confirman la presencia de autofagosomas en P30 (Koike *et al.*, 2005). En el sistema nervioso, la autofagia, es un proceso fisiológico crucial para el mantenimiento de la homeostasis y la prevención de la neurodegeneración inducida por el envejecimiento y el estrés (Khaminets *et al.*, 2016). Debido a la reducida o ausente tasa de renovación de las neuronas, éstas muestran altos niveles de autofagia basal para

reducir especies oxidativas, inflamación, orgánulos dañados y agregados de proteína que de lo contrario serían perjudiciales (Son *et al.*, 2012, Damme *et al.*, 2014). La autofagia actúa como neuroprotector y su desregulación ha sido relacionada con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Tan *et al.*, 2014, Nah *et al.*, 2015, Menzies *et al.*, 2015). Además, el papel neuroprotector de la autofagia ha sido corroborado por el descubrimiento de un nuevo tipo de autofagia selectiva que degrada mielina denominada mielinofagia. Tras una lesión en el axón la vaina de mielina se fragmenta en estructuras más pequeñas que posteriormente son rodeadas por los autofagosomas y finalmente degradadas. (Gomez-Sanchez *et al.*, 2015). En este sentido, nuestros datos sugieren que la activación de los receptores de la audición y, en consecuencia, el aumento de la actividad de las neuronas aferentes son estímulos que activan la autofagia coclear.

El IGF-1 regula la autofagia en distintos contextos celulares, incluido el desarrollo temprano del oído interno (Aburto *et al.*, 2012b, Bains *et al.*, 2009, Sanchez-Calderon *et al.*, 2010). A menudo con acciones opuestas dependiendo del tipo celular y la situación (Renna *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2014). Nuestros resultados indican que los tejidos estudiados de los ratones nulos para *Igf1* muestran los mismos perfiles de expresión temporal de genes de autofagia que los obtenidos de los ratones silvestres. No se observan diferencias notables entre los genotipos excepto en los vestíbulos de los ratones nulos para *Igf1* P270 donde los niveles de expresión de los genes *Becn1*, *Atg4b* y *Atg5* son mayores que los de los ratones silvestres. La autofagia en el vestíbulo tiene funciones adicionales en la biogénesis de la otoconia (Marino *et al.*, 2010) que podrían explicar por qué los genes autofágicos vestibulares presentan mayores niveles de expresión que los cocleares y por qué la diferencia entre genotipos es más acusada.

No se observan diferencias significativas entre genotipos en el flujo autofágico medido por la relación SQSTM1/p62:LC3-II. Aunque nuestros datos sugieren que el IGF-1 no juega un papel clave en el control de la autofagia, el déficit crónico de este factor en la cóclea podría estar parcialmente compensado. De hecho, este déficit se compensa al nivel de *Igf1r* e *Igf2*. Sin embargo, el déficit no se compensa completamente ya que se provoca un estado pro-inflamatorio. Este hecho se demuestra por la regulación diferencial observada en este trabajo de la familia del receptor TLR en la cóclea de los ratones E18,5 nulos para *Igf1*. También, por el incremento observado de

los niveles del gen *Cox2*, codificante de una enzima de la cascada inflamatoria, cuya participación se ha relacionado anteriormente con autofagia en otros contextos celulares (Ricciotti y Fitzgerald, 2011).

La inhibición o disminución de niveles del receptor IGF1R en algunas especies ha sido asociada con una mayor longevidad (Holzenberger *et al.*, 2003, Cohen *et al.*, 2009). Por el contrario, el mantenimiento de los niveles de IGF-1 es fundamental para la supervivencia neuronal durante el envejecimiento y acelera los procesos neurodegenerativos (Trueba-Saiz *et al.*, 2013, Muller *et al.*, 2012). Este hecho podría ser debido a que las acciones del IGF-1 son complejas e incluyen desde acciones metabólicas a corto plazo a proliferación a largo plazo, supervivencia e incluso diferenciación. Por lo tanto, el resultado de la activación del IGF1R podría ser divergente, dependiendo del contexto fisiopatológico.

En resumen, los resultados de este trabajo indican que la maquinaria autofágica está presente en la cóclea de ratón, que su acción se localiza en neuronas del ganglio espiral, que es un proceso activo que está inducido a partir de los primeros meses de vida coincidiendo con la maduración funcional del receptor auditivo y que se mantiene hasta la edad más avanzada estudiada.

5.3. El déficit de *C-Raf* provoca sordera neurosensorial profunda e incrementa la susceptibilidad al daño inducido por ruido

Trabajos previos indican que durante el desarrollo temprano del oído interno de pollo la actividad de las RAF quinasas es esencial para establecer el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular en precursores neuroepiteliales óticos, y para la diferenciación de las neuronas óticas y el crecimiento axonal en el GAV. La inhibición de C-RAF en la vesícula ótica de pollo activa la apoptosis, mientras que la inhibición de B-RAF y C-RAF afecta a la proliferación de los progenitores neuroepiteliales óticos (Magarinos *et al.*, 2010, Sanz *et al.*, 1999). En este trabajo se ha realizado un estudio del papel de C-RAF en la función auditiva de ratones y se ha demostrado que: i) la familia de las RAF quinasas se expresa en el oído interno embrionario y postnatal del ratón y ERK está fosforilada; ii) los ratones nulos para *C-Raf* presentan sordera neurosensorial a todas las frecuencias estudiadas; iii) la morfología del oído interno, de los huesecillos del oído medio y la citoarquitectura coclear y vestibular de los ratones nulos *C-Raf* no

presenta alteraciones respecto a ratones silvestres; iv) la expresión del canal de potasio Kir 4.1, situado en la estría vascular, disminuye en ratones nulos *C-Raf*; v) los ratones nulos *C-Raf* presentan mayor expresión de *FoxG1* en la cóclea durante el desarrollo; vi); los ratones heterocigotos para *C-Raf* presentan una mayor susceptibilidad al NIHL asociada a alteraciones en la citoarquitectura coclear y en la expresión de marcadores celulares; vii) los ratones heterocigotos para *C-Raf* presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas.

5.3.1. Los ratones nulos *C-Raf* presentan sordera neurosensorial profunda bilateral

En este estudio se demuestra que las tres isoformas de la familia RAF quinasas se expresan en el oído interno del ratón en desarrollo y adulto con un patrón de expresión similar entre ellas. También, se ha observado una disminución de la expresión de las proteínas en la edad postnatal estudiada. La ruta RAF/MEK/ERK está activada puesto que su diana principal ERK está fosforilada, además, se mantiene con una actividad similar en ambas edades.

Se ha descrito que los ratones nulos para *C-Raf* con fondo genético mixto C57BL/6 y 129/Sv tienen tasas de supervivencia embrionaria muy bajas, presentan importantes malformaciones en el nacimiento, incluyendo una reducción en el tamaño corporal, y mueren a una edad postnatal temprana debido a apoptosis masiva del hígado (Mikula *et al.*, 2001). En este estudio se ha analizado la morfología y el tamaño del oído medio e interno de los ratones nulos para *C-Raf* y no presentan malformaciones evidentes ni una reducción de tamaño. La morfología y citoarquitectura de la cóclea, así como, la expresión de marcadores de tipo celular en el ganglio espiral y órgano de Corti, no presentan diferencias entre los ratones nulos y los silvestres.

No se ha observado que la falta de *C-Raf* se compense con los niveles de expresión de los otros miembros de las RAF quinasas. Además, las vías de proliferación (ERK1/2) y supervivencia (AKT) mostraron niveles de activación normales en la cóclea de los ratones nulos. Sin embargo, se ha observado un aumento en los niveles de expresión de *FoxG1*, un factor de transcripción diana de la vía PI3K/AKT (Moelling *et al.*, 2002). *FoxG1* desempeña un papel importante en la morfogénesis del oído interno (Pauley *et al.*, 2006), y su expresión está aumentada en las neuronas auditivas tras un

estímulo inductor de apoptosis (Dastidar *et al.*, 2011). También se ha descrito en cultivos primarios de células neuronales y gliales, y en la corteza de ratón que *Foxg1* participa en la regulación del equilibrio entre proliferación y diferenciación de las células neuroepiteliales (Pancrazi *et al.*, 2015). Se sabe que las proteínas RAF interaccionan con la vía PI3K/AKT (Moelling *et al.*, 2002), por tanto, es posible que la cóclea compense el déficit de C-RAF durante el desarrollo mediante la interacción de las otras RAF quinasas con AKT para aumentar la expresión de *FoxG1* y esto explicaría la falta de defectos celulares.

Los ratones nulos para *C-Raf* presentan una citoarquitectura coclear normal pero estos ratones padecen sordera neurosensorial profunda bilateral puesto que no responden a estímulos sonoros a ninguna intensidad ni frecuencia. Esta sordera puede explicarse por la disminución significativa en la expresión del canal de K^+ , Kir4.1, situado en las células intermedias de la estría vascular. Este canal es esencial para el reciclaje de K^+ , la homeostasis de la endolinfa y el mantenimiento del PE y es fundamental para que se produzca la excitación de las células ciliadas. Se ha descrito que las mutaciones de Kir4.1 causan sordera en el ratón (Marcus *et al.*, 2002) y el hombre (Scholl *et al.*, 2009). Hasta la fecha, no existen datos publicados que enlacen la expresión de las RAF quinasas con la de Kir4.1. La disminución de Kir 4.1 en los ratones nulos para *C-Raf* podría deberse a distintas causas que se discutirán a continuación.

a) Ausencia de melanocitos

El canal Kir4.1 se expresa en las células intermedias o melanocitos situadas en la estría vascular. Estas células proceden de la cresta neural mientras que la mayoría de tipos celulares que forman el oído interno tienen su origen en la placoda ótica (Magarinos *et al.*, 2012). Este hecho plantea la posibilidad de que los ratones nulos para *C-Raf* presenten defectos en la migración de los melanocitos. Los melanocitos son necesarios para el correcto desarrollo y funcionamiento de la cóclea, ya que su ausencia produce sordera neurosensorial en el hombre (Merchant *et al.*, 2001). Además, defectos en la síntesis de la melanina de estas células provocan discapacidad auditiva en los ratones (Murillo-Cuesta *et al.*, 2010). Hay estudios que demuestran que C-RAF presenta un papel fundamental en la migración de queratinocitos y fibroblastos (Ehrenreiter *et*

al., 2005), en la migración de las células estromales del endometrio en humanos (Yotova *et al.*, 2012), y, junto con B-RAF, en la renovación del folículo piloso melanoblástico (Valluet *et al.*, 2012). En este trabajo se ha observado que los ratones nulos para *C-Raf* presentan los melanocitos en la estría vascular, sin embargo, no se puede descartar un defecto en la renovación de los melanocitos, que podría explicar su reducida capacidad de recuperación a la lesión causada por el ruido.

b) Defectos en la vascularización de la estría vascular

La estría vascular se encuentra altamente irrigada y defectos en su vascularización pueden afectar a la integridad de las células adyacentes (Neng *et al.*, 2013, Iwasaki *et al.*, 1997) y provocar sordera neurosensorial (Rehm *et al.*, 2002, Kimura, 1986). De hecho, la anoxia produce la inhibición del transportador Na^+/K^+ -ATPasa situado en las células marginales de la estría vascular que, a su vez, desencadena alteraciones auditivas (Nin *et al.*, 2008). La falta de expresión de Kir4.1 en la estría vascular podría deberse a defectos en la irrigación de la estría vascular por la falta de alguno de los componentes que suministra la sangre, principalmente el oxígeno. Los defectos endoteliales están asociados tradicionalmente al déficit en B-RAF (Wojnowski *et al.*, 1997). Se ha descrito que la falta de la proteína B-RAF produce un incremento de apoptosis en las células del epitelio vascular (Wojnowski *et al.*, 1997, Leicht *et al.*, 2007, Sharma *et al.*, 2005). Algunos estudios indican que C-RAF también influye en la correcta formación de los vasos sanguíneos (Malecki *et al.*, 2004) y en la supervivencia de las células endoteliales durante la angiogénesis (Wimmer *et al.*, 2012). Sin embargo, en este trabajo se ha descartado un defecto endotelial generalizado ya que otros transportadores como Na^+/K^+ -ATPasa y el canal KCNQ1 no están afectados en los ratones nulos para *C-Raf*.

c) Interacción de las proteínas C-RAF, 14-3-3 y Kir4.1

Se ha descrito que la proteína adaptadora 14-3-3 se une a C-RAF, así como, a otros canales iónicos para modular su función (Mrowiec y Schwappach, 2006, Czirjak *et al.*, 2008, Fischer *et al.*, 2009), pero hasta el momento no se ha descrito su unión con Kir4.1. El déficit de C-RAF podría, por tanto, estar disminuyendo la expresión proteica de Kir4.1 en la estría vascular de forma indirecta a través de la unión a la 14-3-3.

Por último, la disminución de Kir4.1 en los ratones nulos para *C-Raf* podría estar causada por la interacción directa de la cascada RAF-MEK-ERK sobre la transcripción, la traducción o la actividad de Kir4.1. La reducción de Kir4.1 podría provenir directamente de la desregulación de la cascada RAF-MEK-ERK. De hecho, se ha descrito en cultivos celulares que la vía Ras/Raf induce la expresión de un canal de Ca^{2+} dependiente de K^+ (Huang y Rane, 1994). Cabe destacar que en un estudio reciente con oocitos de *Xenopus* se ha puesto de manifiesto que B-RAF es un potente regulador de la actividad y de la presencia en la membrana de los canales de K^+ hERG (Pakladok *et al.*, 2014).

5.3.2 Los ratones heterocigotos *C-Raf* presentan una mayor susceptibilidad al ruido y presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas

C-RAF tiene un papel bien conocido en la supervivencia, protección y reparación celulares (Koziel *et al.*, 2013), por lo tanto, se decidió estudiar las consecuencias de su déficit crónico en la respuesta al estrés del receptor auditivo inducido por el ruido. Los ratones heterocigotos para *C-Raf* muestran umbrales normales de audición y su morfología coclear es similar a la de los ratones silvestres. Sin embargo, a nivel molecular presentan un incremento en los niveles de activación basal de la quinasa de estrés JNK lo que sugiere que los ratones heterocigotos para *C-Raf* poseen una predisposición a la apoptosis.

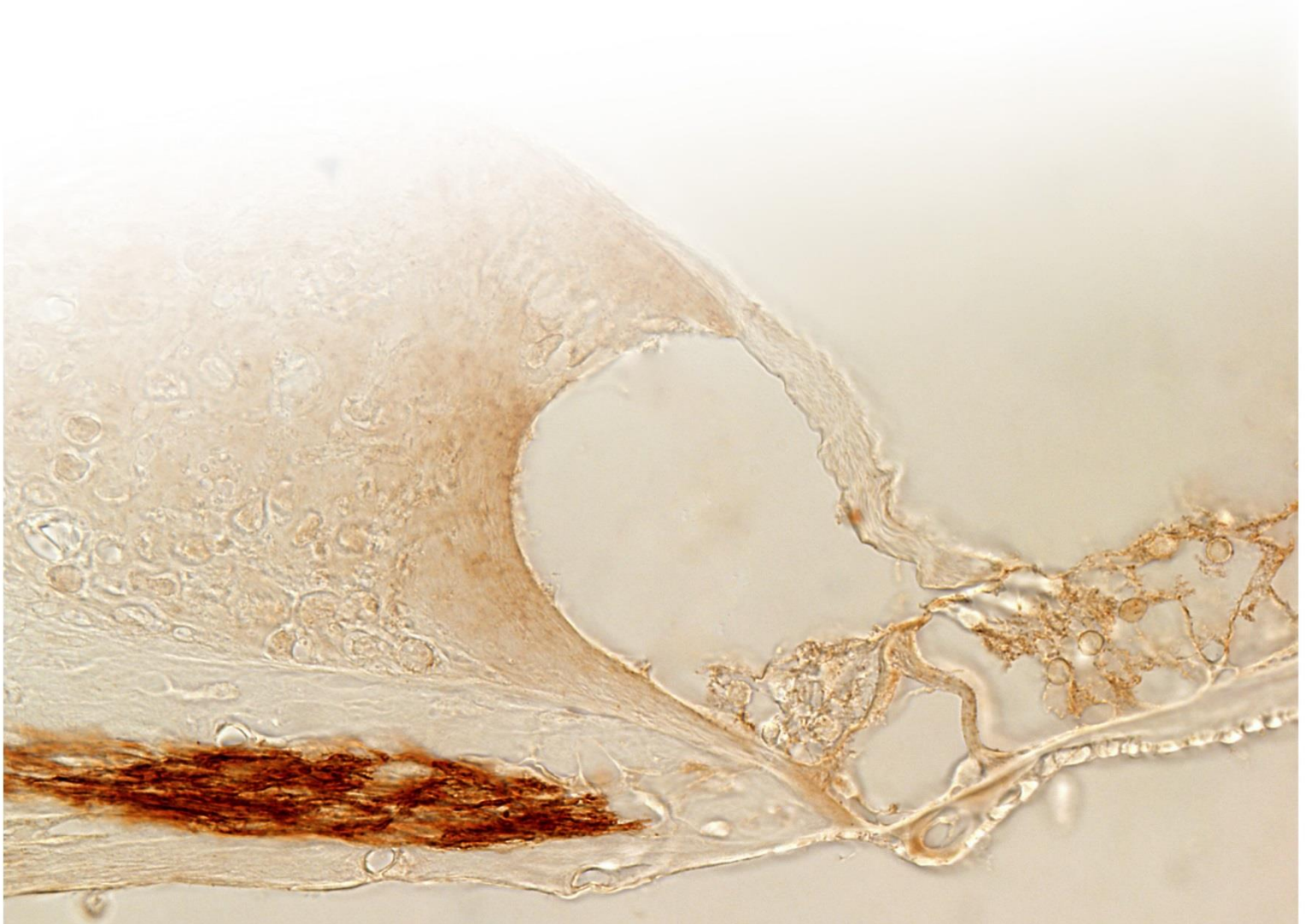
En los ratones heterocigotos el ruido de 30 minutos causó un extenso daño celular en la cóclea, asociado a un cambio irreversible en el umbral auditivo. La pérdida celular fue generalizada incluyendo células ciliadas externas, neuronas, fibrocitos del limbo espiral y fibrocitos tipo IV del ligamento espiral. Se ha descrito que la exposición a un ruido excesivo produce sordera neurosensorial debido a la pérdida de la mayoría de las poblaciones celulares de la cóclea. El cambio en el umbral de forma permanente se ha relacionado con el daño en los estereocilios de las células ciliadas, defectos en la sinapsis del nervio y la pérdida de fibrocitos en el ligamento espiral (Wang *et al.*, 2002, Chen *et al.*, 2003, Hirose y Liberman 2003, Hu *et al.*, 2006, Bohne *et al.*, 2007). Sin embargo, el patrón de respuesta al daño fue totalmente diferente en los ratones silvestres, que presentaron una menor pérdida celular y un desplazamiento reversible y

menor del umbral tras el ruido. Estos resultados sugirieron que los ratones heterocigotos tienen una mayor predisposición a sufrir daño por exposición al ruido.

Además, nuestros resultados ponen de manifiesto que a nivel molecular los ratones expuestos a ruido de ambos genotipos presentaron un aumento en la activación de ERK y JNK respecto de los animales control. Estos datos concuerdan con lo descrito hasta la fecha. La exposición al ruido causa la activación de algunas quinasas como MEK, ERK y JNK en el epitelio sensorial, el ligamento espiral de la cóclea y en las neuronas del ganglio espiral como respuesta protectora al trauma acústico (Maeda *et al.*, 2013, Gratton *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que tras un daño mecánico en explantes cocleares de neonatos se induce la fosforilación de ERK en las células de soporte, señal que promueve posteriormente la muerte de las células ciliadas (Lahne y Gale, 2008, Maeda *et al.*, 2013). En nuestro estudio se observa que los ratones heterocigotos y los silvestres muestran niveles similares de ERK fosforilado, y aumentan de forma significativa y similar en ambos genotipos tras la exposición al ruido. Esto podría deberse a que B-RAF es la RAF quinasa principal que promueve la fosforilación de ERK y la proliferación celular (Galabova-Kovacs *et al.*, 2006). Por lo tanto, B-RAF podría ser la quinasa que esté activando ERK en el proceso de recuperación al daño inducido por ruido, mientras que las acciones de supervivencia de C-RAF están mediadas por un mecanismo independiente de ERK, el cual B-RAF no puede compensar. En nuestro trabajo también se observa un aumento de la activación de JNK en ambos genotipos expuestos a ruido. La activación de JNK provoca apoptosis (Hu y Zheng, 2008, Op De Beeck *et al.*, 2011, Chen y Fechter, 2003). De acuerdo con esto, se ha descrito que al bloquear la apoptosis utilizando inhibidores de la JNK disminuye la extensión del daño coclear y la hipoacusia causada por el ruido (Bielefeld *et al.*, 2011, Harris *et al.*, 2005). Este hecho explicaría por qué los ratones de ambos genotipos expuestos a ruido presentaron un aumento significativo de los niveles de f-PARP-1, un indicador de muerte celular por apoptosis.

Por tanto, nuestros resultados muestran que las RAF quinasas están presentes en el oído interno del ratón y que C-RAF está implicada en el correcto desarrollo y funcionamiento de la cóclea, así como en la reparación y protección del receptor auditivo.

CONCLUSIONES



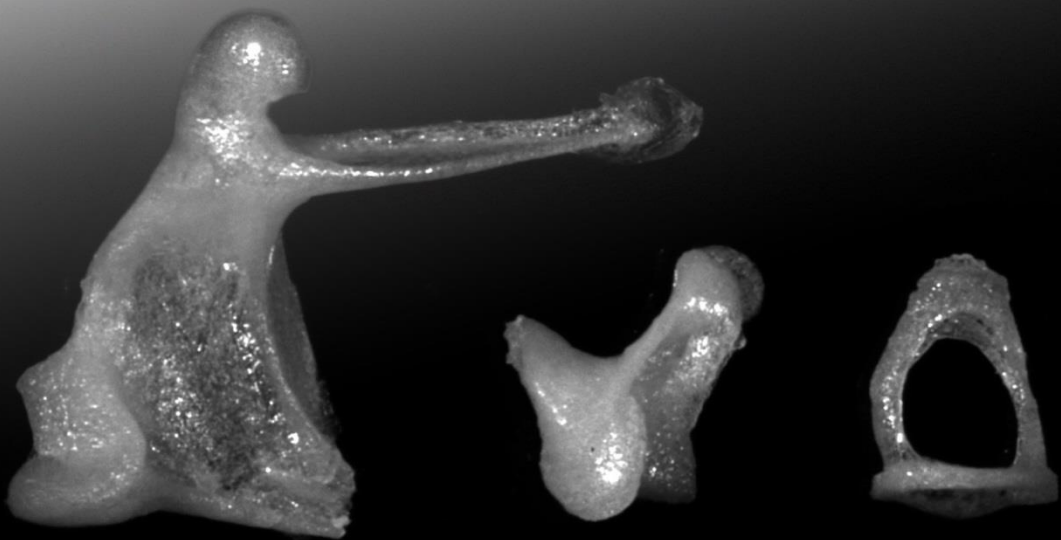
CONCLUSIONES

1. El estudio del patrón temporal de expresión de los elementos del sistema IGF en la cóclea de ratón muestra que el *Igf1r* e *Igf-2* disminuyen con la edad. Además, los animales nulos para *Igf1* presentan una mayor expresión génica del *Igf1R* y del *Igf2* en edades postnatales tempranas (P30-60 y P270), lo que sugiere que el déficit de IGF-1 podría estar compensado parcialmente por estos factores.
2. La deficiencia de IGF-1 en la cóclea embrionaria y adulta afecta a las principales vías de señalización del sistema IGF-1. Este déficit se asocia con un incremento en los niveles de transcrito y proteína de A-RAF y C-RAF, implicadas en proliferación, un incremento en la activación de p38 que promueve acciones inflamatorias y una disminución en la activación de AKT, asociada a supervivencia, lo que supone una desregulación intracelular.
3. La maquinaria molecular autofágica se expresa y está activa en el oído interno de ratón en estadios prenatales y postnatales y su acción se localiza en las neuronas del ganglio espiral. Además, la expresión de la maquinaria autofágica aumenta significativamente entre P30 y P60, lo que sugiere que es un proceso que está inducido a partir de los primeros meses de vida coincidiendo con la maduración funcional del receptor auditivo y que se mantiene hasta la edad más avanzada estudiada.
4. La deficiencia del IGF-1 en la cóclea de ratón no modifica la expresión de genes autofágicos ni el flujo autofágico en las edades avanzadas. Estos datos sugieren que el IGF-1 no tiene un papel directo en la autofagia coclear o que su deficiencia está parcialmente compensada por elementos del sistema IGF.
5. Las tres isoformas de la familia de las RAF quinasas se expresan con un patrón similar en la cóclea de ratón en desarrollo y postnatal y la vía RAF-MEK-ERK está activa puesto que su diana principal ERK está fosforilada.
6. La deficiencia de C-RAF durante el desarrollo embrionario podría estar compensada en la cóclea por un aumento en los niveles de expresión del factor de

transcripción *FoxG1*, a través de la interacción de las otras RAF quinasas con la vía PI3K-AKT.

7. Los ratones nulos para *C-Raf* presentan sordera neurosensorial profunda bilateral para todas las frecuencias estudiadas. Estos ratones no presentan defectos morfológicos ni celulares en el Órgano de Corti y en el ganglio espiral, pero si presentan niveles reducidos del canal de potasio Kir4.1 en la estría vascular, hecho suficiente para explicar la sordera.
8. Los ratones heterocigotos para *C-Raf* son normo-oyentes y su morfología coclear es similar a la de los ratones silvestres, sin embargo, presentan una activación basal de las vías de señalización apoptóticas en comparación con los ratones silvestres. Los estudios de respuesta a estrés acústico han revelado que los ratones heterocigotos para *C-Raf* presentan una mayor susceptibilidad al daño inducido por ruido asociada a alteraciones en la citoarquitectura coclear y en la expresión de marcadores celulares.

BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Hachem, R. N., Zine, A. y Van De Water, T. R. 2010. The injured cochlea as a target for inflammatory processes, initiation of cell death pathways and application of related otoprotectives strategies. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 5, 147-63.
- Aburto, M. R., Magarinos, M., Leon, Y., Varela-Nieto, I. y Sanchez-Calderon, H. 2012a. AKT signaling mediates IGF-I survival actions on otic neural progenitors. *PLoS One*, 7, e30790.
- Aburto, M. R., Sanchez-Calderon, H., Hurle, J. M., Varela-Nieto, I. y Magarinos, M. 2012b. Early otic development depends on autophagy for apoptotic cell clearance and neural differentiation. *Cell Death Dis*, 3, e394.
- Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J. y Cowley, S. 1994. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, 13, 1610-9.
- Alsina, B., Giraldez, F. y Pujades, C. 2009. Patterning and cell fate in ear development. *Int J Dev Biol*, 53, 1503-13.
- Allen, P. D. y Eddins, D. A. 2010. Presbycusis phenotypes form a heterogeneous continuum when ordered by degree and configuration of hearing loss. *Hear Res*, 264, 10-20.
- Bains, M., Florez-Mcclure, M. L. y Heidenreich, K. A. 2009. Insulin-like growth factor-I prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation. *J Biol Chem*, 284, 20398-407.
- Baljuls, A., Mahr, R., Schwarzenau, I., Muller, T., Polzien, L., Hekman, M. y Rapp, U. R. 2011. Single substitution within the RKTR motif impairs kinase activity but promotes dimerization of RAF kinase. *J Biol Chem*, 286, 16491-503.
- Bielefeld, E. C., Hangauer, D. y Henderson, D. 2011. Protection from impulse noise-induced hearing loss with novel Src-protein tyrosine kinase inhibitors. *Neurosci Res*, 71, 348-54.
- Bjorkoy, G., Lamark, T. y Johansen, T. 2006. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy*, 2, 138-9.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A. y Johansen, T. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-97.
- Bohne, B. A., Harding, G. W. y Lee, S. C. 2007. Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hear Res*, 223, 61-70.
- Camarero, G., Avendano, C., Fernandez-Moreno, C., Villar, A., Contreras, J., De Pablo, F., Pichel, J. G. y Varela-Nieto, I. 2001. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci*, 21, 7630-41.
- Camarero, G., Leon, Y., Gorospe, I., De Pablo, F., Alsina, B., Giraldez, F. y Varela-Nieto, I. 2003. Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons. *Dev Biol*, 262, 242-53.
- Camarero, G., Tyrsin, O. Y., Xiang, C., Pfeiffer, V., Pleiser, S., Wiese, S., Gotz, R. y Rapp, U. R. 2006. Cortical migration defects in mice expressing A-RAF from the B-RAF locus. *Mol Cell Biol*, 26, 7103-15.
- Carlsson, P. I., Van Laer, L., Borg, E., Bondeson, M. L., Thys, M., Fransen, E. y Van Camp, G. 2005. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res*, 202, 87-96.

- Ceteci, F., Xu, J., Ceteci, S., Zanucco, E., Thakur, C. y Rapp, U. R. 2011. Conditional expression of oncogenic C-RAF in mouse pulmonary epithelial cells reveals differential tumorigenesis and induction of autophagy leading to tumor regression. *Neoplasia*, 13, 1005-18.
- Clark, S. L., Jr. 1957. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol*, 3, 349-62.
- Cobo, P. y Cuesta, M. 2009. Measuring hybrid passive-active sound absorption of a microperforated liner at oblique incidence. *J Acoust Soc Am*, 125, 185-90.
- Cohen-Salmon, M., Regnault, B., Cayet, N., Caille, D., Demuth, K., Hardelin, J. P., Janel, N., Meda, P. y Petit, C. 2007. Connexin30 deficiency causes intrastrial fluid-blood barrier disruption within the cochlear stria vascularis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6229-34.
- Cohen, B. E., Durstenfeld, A. y Roehm, P. C. 2014. Viral causes of hearing loss: a review for hearing health professionals. *Trends Hear*, 18.
- Cohen, E., Paulsson, J. F., Blinder, P., Burstyn-Cohen, T., Du, D., Estepa, G., Adame, A., Pham, H. M., Holzenberger, M., Kelly, J. W., Masliah, E. y Dillin, A. 2009. Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell*, 139, 1157-69.
- Cordas, E. A., Ng, L., Hernandez, A., Kaneshige, M., Cheng, S. Y. y Forrest, D. 2012. Thyroid hormone receptors control developmental maturation of the middle ear and the size of the ossicular bones. *Endocrinology*, 153, 1548-60.
- Craig, E. A., Stevens, M. V., Vaillancourt, R. R. y Camenisch, T. D. 2008. MAP3Ks as central regulators of cell fate during development. *Dev Dyn*, 237, 3102-14.
- Cseh, B., Doma, E. y Baccarini, M. 2014. The "RAF" neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett*.
- Cuenda, A. y Nebreda, A. R. 2009. p38delta and PKD1: kinase switches for insulin secretion. *Cell*, 136, 209-10.
- Czirjak, G., Vuity, D. y Enyedi, P. 2008. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J Biol Chem*, 283, 15672-80.
- Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. A. y Mccubrey, J. A. 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, 17, 1263-93.
- Chao, T. S., Foster, D. A., Rapp, U. R. y Rosner, M. R. 1994. Differential Raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. *J Biol Chem*, 269, 7337-41.
- Chen, G. D. y Fechter, L. D. 2003. The relationship between noise-induced hearing loss and hair cell loss in rats. *Hear Res*, 177, 81-90.
- Chen, J. y Zhao, H. B. 2014. The role of an inwardly rectifying K(+) channel (Kir4.1) in the inner ear and hearing loss. *Neuroscience*, 265, 137-46.
- Chen, Q., Casali, B., Pattacini, L., Boiardi, L. y Salvarani, C. 2006. Tumor necrosis factor-alpha protects synovial cells from nitric oxide induced apoptosis through phosphoinositide 3-kinase Akt signal transduction. *J Rheumatol*, 33, 1061-8.
- Chen, T. J., Chen, S. S., Wang, D. C. y Hsieh, Y. L. 2002. Increased vulnerability of auditory system to noise exposure in mdx mice. *Laryngoscope*, 112, 520-5.
- Chen, Y. y Klionsky, D. J. 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, 124, 161-70.
- Chen, Y. S., Liu, T. C., Cheng, C. H., Yeh, T. H., Lee, S. Y. y Hsu, C. J. 2003. Changes of hair cell stereocilia and threshold shift after acoustic trauma in guinea pigs:

- comparison between inner and outer hair cells. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 65, 266-74.
- Cho, Y., Gong, T. W., Stover, T., Lomax, M. I. y Altschuler, R. A. 2002. Gene expression profiles of the rat cochlea, cochlear nucleus, and inferior colliculus. *J Assoc Res Otolaryngol*, 3, 54-67.
- Chong, H., Vikis, H. G. y Guan, K. L. 2003. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*, 15, 463-9.
- Damme, M., Suntio, T., Saftig, P. y Eskelinen, E. L. 2014. Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions. *Acta Neuropathol*.
- Dastidar, S. G., Landrieu, P. M. y D'mello, S. R. 2011. FoxG1 promotes the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci*, 31, 402-13.
- Dong, H. y Czaja, M. J. 2011. Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends Endocrinol Metab*, 22, 234-40.
- Ehrenreiter, K., Piazzolla, D., Velamoor, V., Sobczak, I., Small, J. V., Takeda, J., Leung, T. y Baccarini, M. 2005. Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol*, 168, 955-64.
- Eltschinger, S. y Loewith, R. 2016. TOR Complexes and the Maintenance of Cellular Homeostasis. *Trends Cell Biol*, 26, 148-59.
- Faes, S. y Dormond, O. 2015. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *Int J Mol Sci*, 16, 21138-52.
- Fang, B. y Xiao, H. 2014. Rapamycin alleviates cisplatin-induced ototoxicity in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 448, 443-7.
- Fedorenko, I. V., Gibney, G. T., Sondak, V. K. y Smalley, K. S. 2015. Beyond BRAF: where next for melanoma therapy? *Br J Cancer*, 112, 217-26.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z. y Klionsky, D. J. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24, 24-41.
- Fetoni, A. R., De Bartolo, P., Eramo, S. L., Rolesi, R., Paciello, F., Bergamini, C., Fato, R., Paludetti, G., Petrosini, L. y Troiani, D. 2013. Noise-induced hearing loss (NIHL) as a target of oxidative stress-mediated damage: cochlear and cortical responses after an increase in antioxidant defense. *J Neurosci*, 33, 4011-23.
- Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K. y Cecconi, F. 2007. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447, 1121-5.
- Fischer, A., Baljuls, A., Reinders, J., Nekhoroshkova, E., Sibilski, C., Metz, R., Albert, S., Rajalingam, K., Hekman, M. y Rapp, U. R. 2009. Regulation of RAF activity by 14-3-3 proteins: RAF kinases associate functionally with both homo- and heterodimeric forms of 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, 284, 3183-94.
- Fortunato, G., Marciano, E., Zarrilli, F., Mazzaccara, C., Intrieri, M., Calcagno, G., Vitale, D. F., La Manna, P., Saulino, C., Marcelli, V. y Sacchetti, L. 2004. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. *Clin Chem*, 50, 2012-8.
- Frago, L. M., Canon, S., De La Rosa, E. J., Leon, Y. y Varela-Nieto, I. 2003. Programmed cell death in the developing inner ear is balanced by nerve growth factor and insulin-like growth factor I. *J Cell Sci*, 116, 475-86.
- Frago, L. M., Leon, Y., De La Rosa, E. J., Gomez-Munoz, A. y Varela-Nieto, I. 1998. Nerve growth factor and ceramides modulate cell death in the early developing inner ear. *J Cell Sci*, 111 (Pt 5), 549-56.

- Freeman, A. K., Ritt, D. A. y Morrison, D. K. 2013. Effects of Raf dimerization and its inhibition on normal and disease-associated Raf signaling. *Mol Cell*, 49, 751-8.
- Fritzsich, B., Jahan, I., Pan, N., Kersigo, J., Duncan, J. y Kopecky, B. 2011. Dissecting the molecular basis of organ of Corti development: Where are we now? *Hear Res*, 276, 16-26.
- Fujioka, M., Kanzaki, S., Okano, H. J., Masuda, M., Ogawa, K. y Okano, H. 2006. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *J Neurosci Res*, 83, 575-83.
- Galabova-Kovacs, G. y Baccarini, M. 2010. Deciphering signaling pathways in vivo: the Ras/Raf/MEK/ERK cascade. *Methods Mol Biol*, 661, 421-31.
- Galabova-Kovacs, G., Matzen, D., Piazzolla, D., Meissl, K., Plyushch, T., Chen, A. P., Silva, A. y Baccarini, M. 2006. Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1325-30.
- Gillespie, P. G. y Muller, U. 2009. Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell*, 139, 33-44.
- Goldberg, J. M. 1991. The vestibular end organs: morphological and physiological diversity of afferents. *Curr Opin Neurobiol*, 1, 229-35.
- Gomez-Sanchez, J. A., Carty, L., Iruarizaga-Lejarreta, M., Palomo-Irigoyen, M., Varela-Rey, M., Griffith, M., Hantke, J., Macias-Camara, N., Azkargorta, M., Aurrekoetxea, I., De Juan, V. G., Jefferies, H. B., Aspichueta, P., Elortza, F., Aransay, A. M., Martinez-Chantar, M. L., Baas, F., Mato, J. M., Mirsky, R., Woodhoo, A. y Jessen, K. R. 2015. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *J Cell Biol*, 210, 153-68.
- Gratton, M. A., Eleftheriadou, A., Garcia, J., Verduzco, E., Martin, G. K., Lonsbury-Martin, B. L. y Vazquez, A. E. 2011. Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing in their susceptibility to noise damage. *Hear Res*, 277, 211-26.
- Guinan, J. J., Jr. 2010. Cochlear efferent innervation and function. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 18, 447-53.
- Hakuba, N., Koga, K., Gyo, K., Usami, S. I. y Tanaka, K. 2000. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci*, 20, 8750-3.
- Hamernik, R. P. y Qiu, W. 2000. Correlations among evoked potential thresholds, distortion product otoacoustic emissions and hair cell loss following various noise exposures in the chinchilla. *Hear Res*, 150, 245-57.
- Hamidzadeh, K. y Mosser, D. M. 2016. Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. *Front Immunol*, 7, 74.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. y Mizushima, N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441, 885-9.
- Harding, G. W., Bohne, B. A. y Vos, J. D. 2005. The effect of an age-related hearing loss gene (Ahl) on noise-induced hearing loss and cochlear damage from low-frequency noise. *Hear Res*, 204, 90-100.
- Harris, K. C., Hu, B., Hangauer, D. y Henderson, D. 2005. Prevention of noise-induced hearing loss with Src-PTK inhibitors. *Hear Res*, 208, 14-25.
- Hayashi, Y., Yamamoto, N., Nakagawa, T. y Ito, J. 2013. Insulin-like growth factor 1 inhibits hair cell apoptosis and promotes the cell cycle of supporting cells by activating different downstream cascades after pharmacological hair cell injury in neonatal mice. *Mol Cell Neurosci*, 56, 29-38.

- Hayashi, Y., Yamamoto, N., Nakagawa, T. y Ito, J. 2014. Insulin-like growth factor 1 induces the transcription of Gap43 and Ntn1 during hair cell protection in the neonatal murine cochlea. *Neurosci Lett*, 560, 7-11.
- Henderson, D., Bielefeld, E. C., Harris, K. C. y Hu, B. H. 2006. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear*, 27, 1-19.
- Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C. y Kurachi, Y. 2010. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch*, 459, 521-33.
- Highstein, S. M., Fay, R. R. y Popper, A. N. 2004. *The vestibular system*, New York, Springer.
- Hirose, K. y Liberman, M. C. 2003. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 4, 339-52.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P. C., Cervera, P. y Le Bouc, Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421, 182-7.
- Hu, B. H. y Zheng, G. L. 2008. Membrane disruption: an early event of hair cell apoptosis induced by exposure to intense noise. *Brain Res*, 1239, 107-18.
- Hu, J., Milenkovic, N. y Lewin, G. R. 2006. The high threshold mechanotransducer: a status report. *Pain*, 120, 3-7.
- Huang, Y. y Rane, S. G. 1994. Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *J Biol Chem*, 269, 31183-9.
- Hurley, J. H. y Schulman, B. A. 2014. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. *Cell*, 157, 300-11.
- Ichimiya, I., Yoshida, K., Hirano, T., Suzuki, M. y Mogi, G. 2000. Significance of spiral ligament fibrocytes with cochlear inflammation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 56, 45-51.
- Iwasaki, S., Mizuta, K., Gao, J., Wu, R. y Hoshino, T. 1997. Focal microcirculation disorder induced by photochemical reaction in the guinea pig cochlea. *Hear Res*, 108, 55-64.
- Kelly, M. C. y Chen, P. 2009. Development of form and function in the mammalian cochlea. *Curr Opin Neurobiol*, 19, 395-401.
- Kern, F., Doma, E., Rupp, C., Niault, T. y Baccharini, M. 2013. Essential, non-redundant roles of B-Raf and Raf-1 in Ras-driven skin tumorigenesis. *Oncogene*, 32, 2483-92.
- Khaminets, A., Behl, C. y Dikic, I. 2016. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol*, 26, 6-16.
- Kimura, R. S. 1986. Animal models of inner ear vascular disturbances. *Am J Otolaryngol*, 7, 130-9.
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adhihetty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., Airoidi, E. M., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akporiaye, E. T., Al-Rubeai, M., Albaiceta, G. M., Albanese, C., Albani, D., Albert, M. L., Aldudo, J., Algul, H., Alirezaei, M., Alloza, I., Almasan, A., Almonte-Beceril, M., Alnemri, E. S., Alonso, C., Altan-Bonnet, N., Altieri, D. C., Alvarez, S., Alvarez-Erviti, L., Alves, S., Amadoro, G., Amano, A., Amantini, C., Ambrosio, S., Amelio, I., Amer, A. O., Amessou, M., Amon, A., An, Z., Anania, F. A., Andersen, S. U., Andley, U. P., Andreadi, C. K., Andrieu-Abadie, N., Anel, A., Ann, D. K., Anoopkumar-Dukie, S., Antonoli, M., Aoki,

- H., Apostolova, N., Aquila, S., Aquilano, K., Araki, K., Arama, E., Aranda, A., Araya, J., Arcaro, A., Arias, E., Arimoto, H., Ariosa, A. R., Armstrong, J. L., Arnould, T., Arsov, I., Asanuma, K., Askanas, V., Asselin, E., Atarashi, R., Atherton, S. S., Atkin, J. D., Attardi, L. D., Auburger, P., Auburger, G., Aurelian, L., Autelli, R., Avagliano, L., Avantaggiati, M. L., Avrahami, L., Awale, S., Azad, N., Bachetti, T., Backer, J. M., Bae, D. H., Bae, J. S., Bae, O. N., Bae, S. H., Baehrecke, E. H., Baek, S. H., Baghdiguian, S., Bagniewska-Zadworna, A., et al. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12, 1-222.
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., Bamber, B. A., Bassham, D. C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J. S., Bredesen, D. E., Brodsky, J. L., Brumell, J. H., Brunk, U. T., Bursch, W., Camougrand, N., Cebollero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, L. S., Choi, A., Chu, C. T., Chung, J., Clarke, P. G., Clark, R. S., Clarke, S. G., Clave, C., Cleveland, J. L., Codogno, P., Colombo, M. I., Coto-Montes, A., Cregg, J. M., Cuervo, A. M., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, P. B., Dennis, P. A., Deretic, V., Devenish, R. J., Di Sano, F., Dice, J. F., Difiglia, M., Dinesh-Kumar, S., Distelhorst, C. W., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, F. C., Droge, W., Dron, M., Dunn, W. A., Jr., Duszenko, M., Eissa, N. T., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, E. L., Fesus, L., Finley, K. D., Fuentes, J. M., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, F. B., Gewirtz, D. A., Gibson, S. B., Gohla, A., Goldberg, A. L., Gonzalez, R., Gonzalez-Estevez, C., Gorski, S., Gottlieb, R. A., Haussinger, D., He, Y. W., Heidenreich, K., Hill, J. A., Hoyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, W. P., Iwasaki, A., Jaattela, M., Jackson, W. T., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, J. U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D. H., Kiel, J. A., Kim, H. P., Kimchi, A., Kinsella, T. J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151-75.
- Koike, M., Shibata, M., Waguri, S., Yoshimura, K., Tanida, I., Kominami, E., Gotow, T., Peters, C., Von Figura, K., Mizushima, N., Saftig, P. y Uchiyama, Y. 2005. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol*, 167, 1713-28.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. y Tanaka, K. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441, 880-4.
- Koziel, K., Smigelskaite, J., Drasche, A., Enthammer, M., Ashraf, M. I., Khalid, S. y Troppmair, J. 2013. RAF and antioxidants prevent cell death induction after growth factor abrogation through regulation of Bcl-2 proteins. *Exp Cell Res*, 319, 2728-38.
- Kraft, C., Peter, M. y Hofmann, K. 2010. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol*, 12, 836-41.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. y Mizushima, N. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 432, 1032-6.
- Kusakari, J., Ise, I., Comegys, T. H., Thalmann, I. y Thalmann, R. 1978. Effect of ethacrynic acid, furosemide, and ouabain upon the endolymphatic potential and upon high energy phosphates of the stria vascularis. *Laryngoscope*, 88, 12-37.

- Kyosseva, S. V. 2004. Differential expression of mitogen-activated protein kinases and immediate early genes fos and jun in thalamus in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 28, 997-1006.
- Lahne, M. y Gale, J. E. 2008. Damage-induced activation of ERK1/2 in cochlear supporting cells is a hair cell death-promoting signal that depends on extracellular ATP and calcium. *J Neurosci*, 28, 4918-28.
- Lang, H., Li, M., Kilpatrick, L. A., Zhu, J., Samuvel, D. J., Krug, E. L. y Goddard, J. C. 2011. Sox2 up-regulation and glial cell proliferation following degeneration of spiral ganglion neurons in the adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol*, 12, 151-71.
- Lavoie, H. y Therrien, M. 2015. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16, 281-98.
- Le Grand, J. N., Chakrama, F. Z., Seguin-Py, S., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. y Boyer-Guittaut, M. 2011. GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy*, 7, 1098-107.
- Leaver, A. M. y Rauschecker, J. P. 2016. Functional Topography of Human Auditory Cortex. *J Neurosci*, 36, 1416-28.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M. y Tzivion, G. 2007. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1196-212.
- Leon, Y., Sanchez-Galiano, S. y Gorospe, I. 2004. Programmed cell death in the development of the vertebrate inner ear. *Apoptosis*, 9, 255-64.
- Leon, Y., Vazquez, E., Sanz, C., Vega, J. A., Mato, J. M., Giraldez, F., Represa, J. y Varela-Nieto, I. 1995. Insulin-like growth factor-I regulates cell proliferation in the developing inner ear, activating glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis and Fos expression. *Endocrinology*, 136, 3494-503.
- Leroith, D., Werner, H., Neuenschwander, S., Kalebic, T. y Helman, L. J. 1995. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 766, 402-8.
- Li, W., Sun, S., Chen, Y., Yu, H., Chen, Z. Y. y Li, H. 2013. Disrupting the interaction between retinoblastoma protein and Raf-1 leads to defects in progenitor cell proliferation and survival during early inner ear development. *PLoS One*, 8, e83726.
- Liu, J., Speder, P. y Brand, A. H. 2014. Control of brain development and homeostasis by local and systemic insulin signalling. *Diabetes Obes Metab*, 16 Suppl 1, 16-20.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. y Efstratiadis, A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75, 59-72.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. y Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153, 1194-217.
- Lustig, L. R. y Akil, O. 2012. Cochlear gene therapy. *Curr Opin Neurol*, 25, 57-60.
- Maeda, Y., Fukushima, K., Omichi, R., Kariya, S. y Nishizaki, K. 2013. Time courses of changes in phospho- and total- MAP kinases in the cochlea after intense noise exposure. *PLoS One*, 8, e58775.
- Magarinos, M., Aburto, M. R., Sanchez-Calderon, H., Munoz-Agudo, C., Rapp, U. R. y Varela-Nieto, I. 2010. RAF kinase activity regulates neuroepithelial cell proliferation and neuronal progenitor cell differentiation during early inner ear development. *PLoS One*, 5, e14435.

- Magarinos, M., Contreras, J., Aburto, M. R. y Varela-Nieto, I. 2012. Early development of the vertebrate inner ear. *Anat Rec (Hoboken)*, 295, 1775-90.
- Magariños, M., Contreras, J. Y Varela-Nieto, I. 2014. Early Development of the Vertebrate Inner Ear. *Romand, R. & Varela-Nieto, I. (eds.) Development of auditory and vestibular systems. Fourth edition. ed. Oxford, UK Waltham, MA, : Academic Press, pp. pp. 1–30.*
- Malecki, M., Seneta, M., Miloszezwska, J., Trembacz, H., Przybyszewska, M. y Janik, P. 2004. Role of v-Raf and truncated form RAF1 in the induction of vascular endothelial growth factor and vascularization. *Oncol Rep*, 11, 161-5.
- Marcus, D. C., Wu, T., Wangemann, P. y Kofuji, P. 2002. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282, C403-7.
- Marino, G., Fernandez, A. F., Cabrera, S., Lundberg, Y. W., Cabanillas, R., Rodriguez, F., Salvador-Montoliu, N., Vega, J. A., Germana, A., Fueyo, A., Freije, J. M. y Lopez-Otin, C. 2010. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest*, 120, 2331-44.
- Martinet, W., De Meyer, G. R., Andries, L., Herman, A. G. y Kockx, M. M. 2006. Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry: possibilities and limitations. *Autophagy*, 2, 55-7.
- Martinez-Vega, R., Partearroyo, T., Vallecillo, N., Varela-Moreiras, G., Pajares, M. A. y Varela-Nieto, I. 2015. Long-term omega-3 fatty acid supplementation prevents expression changes in cochlear homocysteine metabolism and ameliorates progressive hearing loss in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem*.
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., Von Kriegsheim, A. y Kolch, W. 2011. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer*, 2, 232-60.
- Mcarthur, G. A. 2015. Combination Therapies to Inhibit the RAF/MEK/ERK Pathway in Melanoma: We are not Done Yet. *Front Oncol*, 5, 161.
- Menardo, J., Tang, Y., Ladrech, S., Lenoir, M., Casas, F., Michel, C., Bourien, J., Ruel, J., Rebillard, G., Maurice, T., Puel, J. L. y Wang, J. 2012. Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse Cochlea. *Antioxid Redox Signal*, 16, 263-74.
- Meng, Q. y Cai, D. 2011. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*, 286, 32324-32.
- Menzies, F. M., Fleming, A. y Rubinsztein, D. C. 2015. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 16, 345-57.
- Merchant, S. N., Mckenna, M. J., Baldwin, C. T., Milunsky, A. y Nadol, J. B., Jr. 2001. Otopathology in a case of type I Waardenburg's syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 110, 875-82.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F. y Baccarini, M. 2001. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J*, 20, 1952-62.
- Mizushima, N. y Levine, B. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*, 12, 823-30.
- Mizushima, N. y Yoshimori, T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-5.

- Mochizuki, H., Toda, H., Ando, M., Kurusu, M., Tomoda, T. y Furukubo-Tokunaga, K. 2011. Unc-51/ATG1 controls axonal and dendritic development via kinesin-mediated vesicle transport in the *Drosophila* brain. *PLoS One*, 6, e19632.
- Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S. y Schweneker, M. 2002. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*, 277, 31099-106.
- Molzan, M., Schumacher, B., Ottmann, C., Baljuls, A., Polzien, L., Weyand, M., Thiel, P., Rose, R., Rose, M., Kuhenne, P., Kaiser, M., Rapp, U. R., Kuhlmann, J. y Ottmann, C. 2010. Impaired binding of 14-3-3 to C-RAF in Noonan syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Mol Cell Biol*, 30, 4698-711.
- Morgenstern, C., Amano, H. y Orsulakova, A. 1982. Ion transport in the endolymphatic space. *Am J Otolaryngol*, 3, 323-7.
- Mortensen, M. y Simon, A. K. 2010. Nonredundant role of Atg7 in mitochondrial clearance during erythroid development. *Autophagy*, 6, 423-5.
- Mrowiec, T. y Schwappach, B. 2006. 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biol Chem*, 387, 1227-36.
- Mulders, W. H., Ding, D., Salvi, R. y Robertson, D. 2011. Relationship between auditory thresholds, central spontaneous activity, and hair cell loss after acoustic trauma. *J Comp Neurol*, 519, 2637-47.
- Muller, A. P., Fernandez, A. M., Haas, C., Zimmer, E., Portela, L. V. y Torres-Aleman, I. 2012. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol Cell Neurosci*, 49, 9-12.
- Muller, U. y Barr-Gillespie, P. G. 2015. New treatment options for hearing loss. *Nat Rev Drug Discov*, 14, 346-65.
- Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. y Serrano, M. 2013. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155, 1104-18.
- Murillo-Cuesta, S., Camarero, G., Gonzalez-Rodriguez, A., De La Rosa, L. R., Burks, D. J., Avendano, C., Valverde, A. M. y Varela-Nieto, I. 2012. Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function. *Mol Med*, 18, 260-9.
- Murillo-Cuesta, S., Contreras, J., Zurita, E., Cediell, R., Cantero, M., Varela-Nieto, I. y Montoliu, L. 2010. Melanin precursors prevent premature age-related and noise-induced hearing loss in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23, 72-83.
- Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-De La Rosa, L., Cediell, R., Lassaletta, L. y Varela-Nieto, I. 2011. The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci*, 4, 11.
- Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-De La Rosa, L., Contreras, J., Celaya, A. M., Camarero, G., Rivera, T. y Varela-Nieto, I. 2015. Transforming growth factor beta1 inhibition protects from noise-induced hearing loss. *Front Aging Neurosci*, 7, 32.
- Nah, J., Yuan, J. y Jung, Y. K. 2015. Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Mol Cells*, 38, 381-9.
- Nakajima, Y. 2015. Signaling regulating inner ear development: cell fate determination, patterning, morphogenesis, and defects. *Congenit Anom (Kyoto)*, 55, 17-25.
- Nakamoto, T., Mikuriya, T., Sugahara, K., Hirose, Y., Hashimoto, T., Shimogori, H., Takii, R., Nakai, A. y Yamashita, H. 2012. Geranylgeranylacetone suppresses

- noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the cochlea. *Auris Nasus Larynx*, 39, 270-4.
- Nayagam, B. A., Muniak, M. A. y Ryugo, D. K. 2011. The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems. *Hear Res*, 278, 2-20.
- Nekhoroshkova, E., Albert, S., Becker, M. y Rapp, U. R. 2009. A-RAF kinase functions in ARF6 regulated endocytic membrane traffic. *PLoS One*, 4, e4647.
- Nelken, I., Bizley, J., Shamma, S. A. y Wang, X. 2014. Auditory cortical processing in real-world listening: the auditory system going real. *J Neurosci*, 34, 15135-8.
- Neng, L., Zhang, F., Kachelmeier, A. y Shi, X. 2013. Endothelial cell, pericyte, and perivascular resident macrophage-type melanocyte interactions regulate cochlear intrastrial fluid-blood barrier permeability. *J Assoc Res Otolaryngol*, 14, 175-85.
- Neves, J., Kamaid, A., Alsina, B. y Giraldez, F. 2007. Differential expression of Sox2 and Sox3 in neuronal and sensory progenitors of the developing inner ear of the chick. *J Comp Neurol*, 503, 487-500.
- Nin, F., Hibino, H., Doi, K., Suzuki, T., Hisa, Y. y Kurachi, Y. 2008. The endocochlear potential depends on two K⁺ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1751-6.
- Nishiwaki, A., Asai, K., Tada, T., Ueda, T., Shimada, S., Ogura, Y. y Kato, T. 2001. Expression of glia maturation factor during retinal development in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 95, 103-9.
- Nixon, R. A. 2014. Alzheimer neurodegeneration, autophagy, and Abeta secretion: the ins and outs (comment on DOI 10.1002/bies.201400002). *Bioessays*, 36, 547.
- Ogura, K., Okada, T., Mitani, S., Gengyo-Ando, K., Baillie, D. L., Kohara, Y. y Goshima, Y. 2010. Protein phosphatase 2A cooperates with the autophagy-related kinase UNC-51 to regulate axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 137, 1657-67.
- Ohlemiller, K. K. 2006. Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res*, 1091, 89-102.
- Ohlemiller, K. K., Mcfadden, S. L., Ding, D. L., Flood, D. G., Reaume, A. G., Hoffman, E. K., Scott, R. W., Wright, J. S., Putchu, G. V. y Salvi, R. J. 1999. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol*, 4, 237-46.
- Ohlemiller, K. K., Mcfadden, S. L., Ding, D. L., Lear, P. M. y Ho, Y. S. 2000. Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice. *J Assoc Res Otolaryngol*, 1, 243-54.
- Ohlemiller, K. K., Rybak Rice, M. E., Rosen, A. D., Montgomery, S. C. y Gagnon, P. M. 2011. Protection by low-dose kanamycin against noise-induced hearing loss in mice: dependence on dosing regimen and genetic background. *Hear Res*, 280, 141-7.
- Ohsumi, Y. 2014. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*, 24, 9-23.
- Okano, T. y Kelley, M. W. 2013. Expression of insulin-like growth factor binding proteins during mouse cochlear development. *Dev Dyn*, 242, 1210-21.
- Okano, T., Xuan, S. y Kelley, M. W. 2011. Insulin-like growth factor signaling regulates the timing of sensory cell differentiation in the mouse cochlea. *J Neurosci*, 31, 18104-18.
- Op De Beeck, K., Schacht, J. y Van Camp, G. 2011. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hear Res*, 281, 18-27.

- Osborne, J. K., Zaganjor, E. y Cobb, M. H. 2012. Signal control through Raf: in sickness and in health. *Cell Res*, 22, 14-22.
- Ou, H. C., Harding, G. W. y Bohne, B. A. 2000. An anatomically based frequency-place map for the mouse cochlea. *Hear Res*, 145, 123-9.
- Pais, R. S., Moreno-Barriuso, N., Hernandez-Porras, I., Lopez, I. P., De Las Rivas, J. y Pichel, J. G. 2013. Transcriptome analysis in prenatal IGF1-deficient mice identifies molecular pathways and target genes involved in distal lung differentiation. *PLoS One*, 8, e83028.
- Pakladok, T., Hosseinzadeh, Z., Almilaji, A., Lebedeva, A., Shumilina, E., Alesutan, I. y Lang, F. 2014. Up-regulation of hERG K(+) channels by B-RAF. *PLoS One*, 9, e87457.
- Pancrazi, L., Di Benedetto, G., Colombaioni, L., Della Sala, G., Testa, G., Olimpico, F., Reyes, A., Zeviani, M., Pozzan, T. y Costa, M. 2015. Foxg1 localizes to mitochondria and coordinates cell differentiation and bioenergetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 13910-5.
- Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L. A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E. A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., Bos, J. M., Ommen, S. R., Esposito, G., Lepri, F., Faul, C., Mundel, P., Lopez Sigüero, J. P., Tenconi, R., Selicorni, A., Rossi, C., Mazzanti, L., Torrente, I., Marino, B., Digilio, M. C., Zampino, G., Ackerman, M. J., Dallapiccola, B., Tartaglia, M. y Gelb, B. D. 2007. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*, 39, 1007-12.
- Park, J. Y., Park, Y. H., Shin, D. H. y Oh, S. H. 2007. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-mediated hair cell survival on the mouse utricle exposed to neomycin: the roles of IGFBP-4 and IGFBP-5. *Acta Otolaryngol Suppl*, 22-9.
- Parzych, K. R. y Klionsky, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- Pauley, S., Lai, E. y Fritsch, B. 2006. Foxg1 is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear. *Dev Dyn*, 235, 2470-82.
- Pfeiffer, V., Gotz, R., Xiang, C., Camarero, G., Braun, A., Zhang, Y., Blum, R., Heinsen, H., Nieswandt, B. y Rapp, U. R. 2013. Ablation of BRaf impairs neuronal differentiation in the postnatal hippocampus and cerebellum. *PLoS One*, 8, e58259.
- Polzien, L., Baljuls, A., Albrecht, M., Hekman, M. y Rapp, U. R. 2011. BAD contributes to RAF-mediated proliferation and cooperates with B-RAF-V600E in cancer signaling. *J Biol Chem*, 286, 17934-44.
- Polzien, L., Benz, R. y Rapp, U. R. 2010. Can BAD pores be good? New insights from examining BAD as a target of RAF kinases. *Adv Enzyme Regul*, 50, 147-59.
- Pritchard, C. A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R. y McMahon, M. 1996. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol*, 6, 614-7.
- Pritchard, C. A., Samuels, M. L., Bosch, E. y McMahon, M. 1995. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol*, 15, 6430-42.
- Prud'homme, G. J. 2007. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest*, 87, 1077-91.

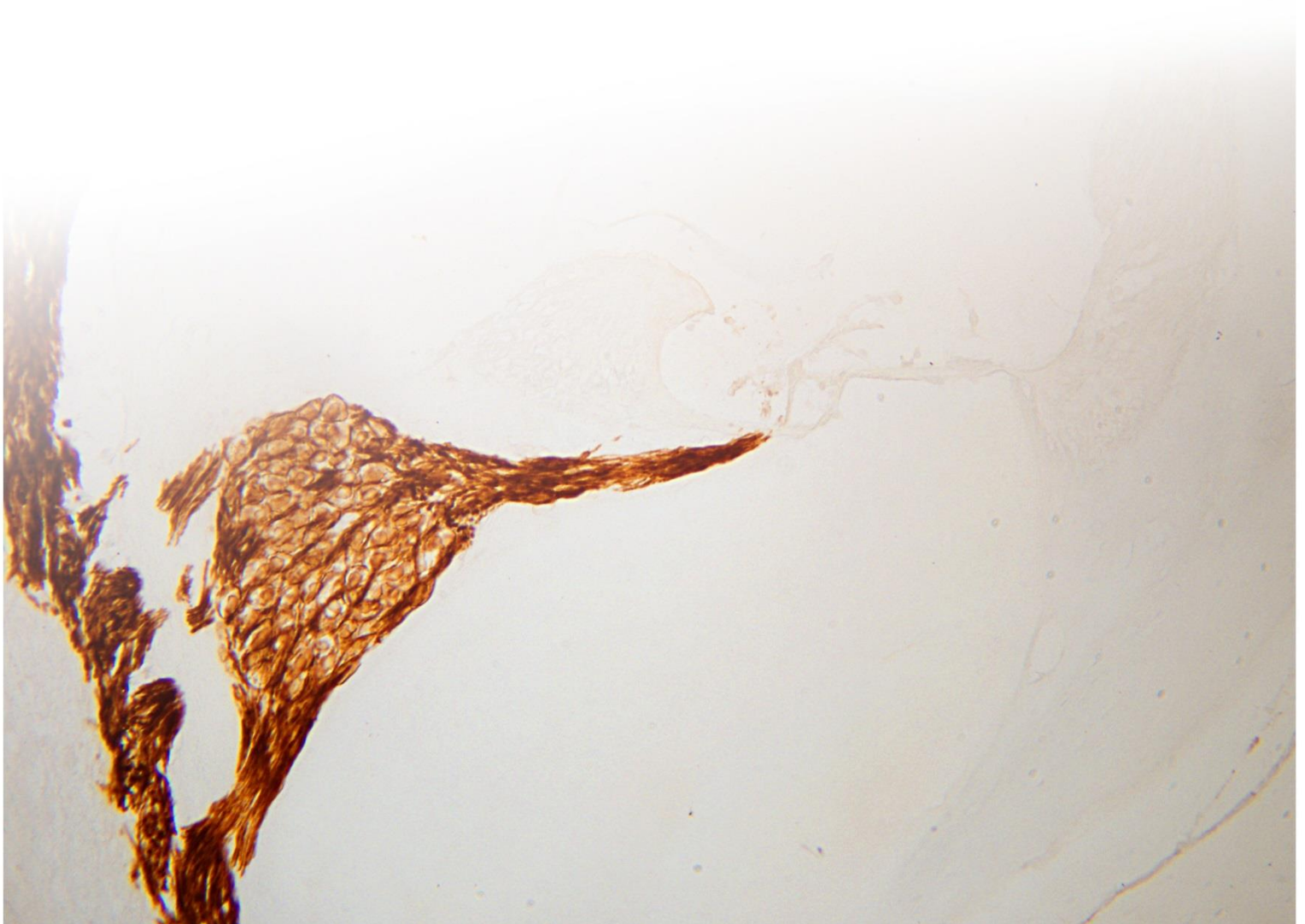
- Pua, H. H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N. y He, Y. W. 2007. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med*, 204, 25-31.
- Purves, D. 2004. *Neuroscience*, Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Publishers.
- Raphael, Y. y Altschuler, R. A. 2003. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*, 60, 397-422.
- Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H., Jr. y Stephenson, J. R. 1983. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 4218-22.
- Reggiori, F. y Ungermann, C. 2012. A dimer to bridge early autophagosomal membranes. *Cell*, 151, 1403-5.
- Rehm, H. L., Zhang, D. S., Brown, M. C., Burgess, B., Halpin, C., Berger, W., Morton, C. C., Corey, D. P. y Chen, Z. Y. 2002. Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neurosci*, 22, 4286-92.
- Renna, M., Bento, C. F., Fleming, A., Menzies, F. M., Siddiqi, F. H., Ravikumar, B., Puri, C., Garcia-Arencibia, M., Sadiq, O., Corrochano, S., Carter, S., Brown, S. D., Acevedo-Arozena, A. y Rubinsztein, D. C. 2013. IGF-1 receptor antagonism inhibits autophagy. *Hum Mol Genet*, 22, 4528-44.
- Ricciotti, E. y Fitzgerald, G. A. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 986-1000.
- Riquelme, R., Cediél, R., Contreras, J., La Rosa Lourdes, R. D., Murillo-Cuesta, S., Hernandez-Sanchez, C., Zubeldia, J. M., Cerdan, S. y Varela-Nieto, I. 2010. A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor I deficient mice. *Front Neuroanat*, 4, 27.
- Rodriguez-De La Rosa, L., Lopez-Herradon, A., Portal-Nunez, S., Murillo-Cuesta, S., Lozano, D., Cediél, R., Varela-Nieto, I. y Esbrit, P. 2014. Treatment with N- and C-terminal peptides of parathyroid hormone-related protein partly compensate the skeletal abnormalities in IGF-I deficient mice. *PLoS One*, 9, e87536.
- Rubel, E. W. y Fritsch, B. 2002. Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu Rev Neurosci*, 25, 51-101.
- Rubinsztein, D. C., Marino, G. y Kroemer, G. 2011. Autophagy and aging. *Cell*, 146, 682-95.
- Rueda, J., Cantos, R. y Lim, D. J. 1996. Tectorial membrane-organ of Corti relationship during cochlear development. *Anat Embryol (Berl)*, 194, 501-14.
- Sanchez-Calderon, H., Milo, M., Leon, Y. y Varela-Nieto, I. 2007. A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear. *Int J Dev Biol*, 51, 557-70.
- Sanchez-Calderon, H., Rodriguez-De La Rosa, L., Milo, M., Pichel, J. G., Holley, M. y Varela-Nieto, I. 2010. RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One*, 5, e8699.
- Sanz, C., Leon, Y., Troppmair, J., Rapp, U. R. y Varela-Nieto, I. 1999. Strict regulation of c-Raf kinase levels is required for early organogenesis of the vertebrate inner ear. *Oncogene*, 18, 429-37.
- Sanz, L., Murillo-Cuesta, S., Cobo, P., Cediél-Algovia, R., Contreras, J., Rivera, T., Varela-Nieto, I. y Avendano, C. 2015. Swept-sine noise-induced damage as a hearing loss model for preclinical assays. *Front Aging Neurosci*, 7, 7.

- Sarkar, S. 2013. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem Soc Trans*, 41, 1103-30.
- Satoh, H., Firestein, G. S., Billings, P. B., Harris, J. P. y Keithley, E. M. 2002. Tumor necrosis factor-alpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. *Laryngoscope*, 112, 1627-34.
- Schacht, J., Talaska, A. E. y Rybak, L. P. 2012. Cisplatin and aminoglycoside antibiotics: hearing loss and its prevention. *Anat Rec (Hoboken)*, 295, 1837-50.
- Schneider, J. L. y Cuervo, A. M. 2014. Autophagy and human disease: emerging themes. *Curr Opin Genet Dev*, 26C, 16-23.
- Scholl, U. I., Choi, M., Liu, T., Ramaekers, V. T., Hausler, M. G., Grimmer, J., Tobe, S. W., Farhi, A., Nelson-Williams, C. y Lifton, R. P. 2009. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 5842-7.
- Schreck, R. y Rapp, U. R. 2006. Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer*, 119, 2261-71.
- Shafique, S., Siddiqi, S., Schraders, M., Oostrik, J., Ayub, H., Bilal, A., Ajmal, M., Seco, C. Z., Strom, T. M., Mansoor, A., Mazhar, K., Shah, S. T., Hussain, A., Azam, M., Kremer, H. y Qamar, R. 2014. Genetic spectrum of autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Pakistani families. *PLoS One*, 9, e100146.
- Sharma, A., Trivedi, N. R., Zimmerman, M. A., Tuveson, D. A., Smith, C. D. y Robertson, G. P. 2005. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res*, 65, 2412-21.
- Shi, C. S. y Kehrl, J. H. 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J Biol Chem*, 283, 33175-82.
- Sinor, A. D. y Lillien, L. 2004. Akt-1 expression level regulates CNS precursors. *J Neurosci*, 24, 8531-41.
- Sliwinska-Kowalska, M. y Davis, A. 2012. Noise-induced hearing loss. *Noise Health*, 14, 274-80.
- Sobolewska, A., Gajewska, M., Zarzynska, J., Gajkowska, B. y Motyl, T. 2009. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur J Cell Biol*, 88, 117-30.
- Son, J. H., Shim, J. H., Kim, K. H., Ha, J. Y. y Han, J. Y. 2012. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*, 44, 89-98.
- Srinivas, V. y Shapiro, I. M. 2006. Chondrocytes embedded in the epiphyseal growth plates of long bones undergo autophagy prior to the induction of osteogenesis. *Autophagy*, 2, 215-6.
- Storm, S. M., Cleveland, J. L. y Rapp, U. R. 1990. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene*, 5, 345-51.
- Stover, T. y Diensthuber, M. 2011. Molecular biology of hearing. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 10, Doc06.
- Streit, A. 2007. The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int J Dev Biol*, 51, 447-61.
- Suojun, Z., Feng, W., Dongsheng, G. y Ting, L. 2012. Targeting Raf/MEK/ERK pathway in pituitary adenomas. *Eur J Cancer*, 48, 389-95.

- Tan, C. C., Yu, J. T., Tan, M. S., Jiang, T., Zhu, X. C. y Tan, L. 2014. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol Aging*, 35, 941-57.
- Tanaka, C., Chen, G. D., Hu, B. H., Chi, L. H., Li, M., Zheng, G., Bielefeld, E. C., Jamesdaniel, S., Coling, D. y Henderson, D. 2009. The effects of acoustic environment after traumatic noise exposure on hearing and outer hair cells. *Hear Res*, 250, 10-8.
- Tartaglia, M., Gelb, B. D. y Zenker, M. 2011. Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25, 161-79.
- Taylor, M. P. y Kirkegaard, K. 2008. Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. *Autophagy*, 4, 286-9.
- Thurston, T. L., Ryzhakov, G., Bloor, S., Von Muhlinen, N. y Randow, F. 2009. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol*, 10, 1215-21.
- Tomoda, T., Bhatt, R. S., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T. y Hatten, M. E. 1999. A mouse serine/threonine kinase homologous to *C. elegans* UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons. *Neuron*, 24, 833-46.
- Trueba-Saiz, A., Cavada, C., Fernandez, A. M., Leon, T., Gonzalez, D. A., Fortea Ormaechea, J., Lleo, A., Del Ser, T., Nunez, A. y Torres-Aleman, I. 2013. Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Transl Psychiatry*, 3, e330.
- Valluet, A., Druillennec, S., Barbotin, C., Dorard, C., Monsoro-Burq, A. H., Larcher, M., Pouponnot, C., Baccarini, M., Larue, L. y Eychene, A. 2012. B-Raf and C-Raf are required for melanocyte stem cell self-maintenance. *Cell Rep*, 2, 774-80.
- Varela-Nieto, I., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-De La Rosa, L., Lassatetta, L. y Contreras, J. 2013. IGF-I deficiency and hearing loss: molecular clues and clinical implications. *Pediatr Endocrinol Rev*, 10, 460-72.
- Walters, B. J. y Zuo, J. 2013. Postnatal development, maturation and aging in the mouse cochlea and their effects on hair cell regeneration. *Hear Res*, 297, 68-83.
- Wang, Y., Hirose, K. y Liberman, M. C. 2002. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 3, 248-68.
- Wang, Y., Wang, W., Li, D., Li, M., Wang, P., Wen, J., Liang, M., Su, B. y Yin, Y. 2014. IGF-1 alleviates NMDA-induced excitotoxicity in cultured hippocampal neurons against autophagy via the NR2B/PI3K-AKT-mTOR pathway. *J Cell Physiol*, 229, 1618-29.
- Wellbrock, C., Karasarides, M. y Marais, R. 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 875-85.
- Whitfield, T. T. 2015. Development of the inner ear. *Curr Opin Genet Dev*, 32, 112-8.
- Wimmer, R., Cseh, B., Maier, B., Scherrer, K. y Baccarini, M. 2012. Angiogenic sprouting requires the fine tuning of endothelial cell cohesion by the Raf-1/Rok-alpha complex. *Dev Cell*, 22, 158-71.
- Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P. y Vandenabeele, P. 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res*, 22, 43-61.
- Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Larner, A. C., Rapp, U. R. y Zimmer, A. 1998. Crf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev*, 76, 141-9.
- Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R. y Zimmer, A. 1997. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet*, 16, 293-7.

- Yazdankhah, M., Farioli-Vecchioli, S., Tonchev, A. B., Stoykova, A. y Cecconi, F. 2014. The autophagy regulators Ambra1 and Beclin 1 are required for adult neurogenesis in the brain subventricular zone. *Cell Death Dis*, 5, e1403.
- Yin, F., Jiang, T. y Cadenas, E. 2013. Metabolic triad in brain aging: mitochondria, insulin/IGF-1 signalling and JNK signalling. *Biochem Soc Trans*, 41, 101-5.
- Yotova, I., Quan, P., Gaba, A., Leditznig, N., Pateisky, P., Kurz, C. y Tschugguel, W. 2012. Raf-1 levels determine the migration rate of primary endometrial stromal cells of patients with endometriosis. *J Cell Mol Med*, 16, 2127-39.
- Zebisch, A. y Troppmair, J. 2006. Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1314-30.

ANEXOS



8.1. ANEXO I

C-Raf deficiency leads to hearing loss and increased noise susceptibility.

De Iriarte Rodríguez R, Magariños M, Pfeiffer V, Rapp UR and Varela-Nieto I. Cell Mol Life Sci. 2015 Oct;72(20):3983-98. doi: 10.1007/s00018-015-1919-x. Epub 2015 May 15.



C-Raf deficiency leads to hearing loss and increased noise susceptibility

Rocío de Iriarte Rodríguez^{1,2} · Marta Magariños^{1,2,3} · Verena Pfeiffer^{4,6} · Ulf R. Rapp^{4,7} · Isabel Varela-Nieto^{1,2,5}

Received: 21 October 2014/Revised: 21 April 2015/Accepted: 27 April 2015/Published online: 15 May 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The family of RAF kinases transduces extracellular information to the nucleus, and their activation is crucial for cellular regulation on many levels, ranging from embryonic development to carcinogenesis. B-RAF and C-RAF modulate neurogenesis and neuritogenesis during chicken inner ear development. C-RAF deficiency in humans is associated with deafness in the rare genetic insulin-like growth factor 1 (IGF-1), Noonan and Leopard syndromes. In this study, we show that RAF kinases are expressed in the developing inner ear and in adult mouse

cochlea. A homozygous *C-Raf* deletion in mice caused profound deafness with no evident cellular aberrations except for a remarkable reduction of the K⁺ channel Kir4.1 expression, a trait that suffices as a cause of deafness. To explore the role of *C-Raf* in cellular protection and repair, heterozygous *C-Raf*^{+/-} mice were exposed to noise. A reduced C-RAF level negatively affected hearing preservation in response to noise through mechanisms involving the activation of JNK and an exacerbated apoptotic response. Taken together, these results strongly support a role for C-RAF in hearing protection.

R. de Iriarte Rodríguez, M. Magariños contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-015-1919-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marta Magariños
mmagarinos@iib.uam.es

- ¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain
- ² Centre for Biomedical Network Research (CIBERER), Institute of Health Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
- ³ Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin 2, 28049 Madrid, Spain
- ⁴ Institute for Medical Radiation and Cell Research (MSZ), University of Würzburg, Versbacher Strasse 5, 97078 Würzburg, Germany
- ⁵ Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), Madrid, Spain
- ⁶ Present Address: Institute for Anatomy and Cell Biology, University of Würzburg, Koellikerstraße 6, 97070 Würzburg, Germany
- ⁷ Present Address: Molecular Mechanisms of Lung Cancer, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Parkstr. 1, 61231 Bad Nauheim, Germany

Keywords Programmed cell death · ERK · FoxG1 · Inflammation · NIHL · Otic

Introduction

The RAF-MEK-ERK pathway conveys growth factor signals from the cell surface to the nucleus to drive a wide variety of physiological outcomes [1]. RAF activities are central to embryonic development [2], cancer [1], stem-cell generation [3], and cell protection and regeneration [4, 5]. RAF serine/protein kinases transfer information to the MEK-ERK module through direct phosphorylation to ultimately facilitate transcriptional activity. RAF proteins also facilitate cell survival by directly interacting with other proteins such as 14-3-3, through mechanisms independent of their kinase activity [6–8].

In mammals, the RAF family of kinases consists of three members: A-RAF, B-RAF, and C-RAF. All have autoinhibitory, regulatory, and catalytic domains with phosphorylation activity [9–11]. RAF kinases have specific tissue and cell-type expression patterns. A-RAF is ubiquitous and its functions have been related to endocytic

trafficking [12]. Accordingly, *A-Raf* knockout mice die around P20 due to neural defects and bowel distension [13]. Evolutionarily, B-RAF is the ancestral RAF kinase, and it is highly expressed in the nervous system [14]. Although the three RAF proteins can phosphorylate ERK, B-RAF is the most efficient one, and therefore, it plays a central role in the physiopathology of cell proliferation [15]. The first *Raf* gene was isolated from retroviruses [16] and was found to be closely associated with cancer [17]. C-RAF is also ubiquitous [18] and plays a role in cell survival [19].

The three RAF kinases have redundant but also specific functions, depending on the temporal and cellular contexts [20–22]. B-RAF and C-RAF play distinct roles in cell proliferation and survival, respectively. This distinction is the case during the early development of fish and chicken inner ears [23–26]. In mice, ERK1/2, the phosphorylation target of RAF kinases, is activated as part of the repair response to cochlear injury [27, 28]. Finally, deficiencies in IGF-1 and C-RAF have been implicated in some rare and severe human syndromes with defects that include deafness, such as *IGF1* deficit (OMIM #147440), Noonan (NS5; OMIM #611553), and Leopard (LPRD2; OMIM #611554) syndromes [7, 29–32]. To date, the mechanisms underlying the functions of C-RAF in mammalian auditory organs are poorly understood, and the impact of chronic C-RAF deficiency on hearing has not been investigated.

Sensory hair cells located in the organ of Corti are responsible for sound reception and information transmission to the brain. Hair cells are bathed in a potassium-rich fluid called endolymph, whose composition is essential for hair-cell depolarization and stimuli transduction. Mutations in potassium channels are well-defined genetic causes of deafness [33, 34]. Stria vascularis cell types, fibrocytes of the spiral ligament, and other cochlear cells contribute to potassium recycling and endolymph homeostasis [35]. Environmental exposure to noise causes hearing loss, but the extent of damage has an unknown genetic component [36]. Noise-induced hearing loss (NIHL) involves alterations in the ion balance [37, 38] and triggers a JNK-mediated inflammatory and pro-apoptotic response. Although the precise mechanisms underlying the predisposition to noise damage are not well defined, defects at the critical nodes of cell survival and repair responses are likely to contribute.

In this study, we investigated the role of C-RAF in the physiopathology of hearing loss using wild-type *C-Raf*^{+/+}, heterozygous *C-Raf*^{+/-}, and *C-Raf*^{-/-} null mice. The three RAF kinases are expressed and active during inner ear development. The complete elimination of C-RAF caused profound deafness, but this was not sufficient to cause cellular malformations in the cochlea. As most *C-Raf* null mutants die at embryonic or early postnatal ages,

heterozygous mice were studied as a model of chronic C-RAF deficiency. Heterozygous mice exhibited normal hearing but experienced exacerbated injury in response to noise exposure that was associated with basal JNK activation and an increased rate of apoptosis. Our data strongly support the hypothesis that C-RAF activity is essential for protection and repair of the auditory organ.

Materials and methods

Mouse handling and genotyping

C-Raf^{-/-} mice were generated [39] and backcrossed to an Ola:MF1 genetic background that allows postnatal survival [40, 41]. Null (*C-Raf*^{-/-}), heterozygous (*C-Raf*^{+/-}), and wild-type (*C-Raf*^{+/+}) littermates used were maintained on a Ola:MF1 genetic background. Null mice died between postnatal (P) days 20–40 (postnatal survival rate = 1 %) due to massive liver apoptosis [19, 42]. No differences between male and female mice were observed, and both were used in this study at the embryonic (E) and postnatal (P) ages indicated in the text. Mice genotypes were determined using the REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) with primer pairs for detection of the wild-type *C-Raf* allele [5'-ACAGAAAGTGTAGCTGCAGTGA-3 and 5'-ATTGATTTGATTGCCAGGTATGAT-3' (335-bp band)] and the neomycin cassette [5'-ACAGAAAGTGTAGCTGCAGTGA-3 and 5'-TGCGTCCAATCCATCTTGTCAA)-3' (450-bp band)]. Animal care procedures and use were approved by the Bioethics Committee of the CSIC. Experimental procedures were conducted in accordance with European Union (2010/63/EU) and Spanish R&D (53/2013) legislations.

In vivo evaluation of auditory brainstem response (ABR), noise exposure, and vestibular function

Three genotypes of P20–60 mice were anesthetized by i.p. administration of ketamine (Imalgene© 1000, Merial; 100 mg/kg) and xylazine (Rompun© 2 %, Bayer Labs; 4 mg/kg). Hearing was evaluated by registering the auditory brainstem response (ABR) as described [43]. Click and 8–40 kHz tone-burst stimuli (0.1 and 5 ms duration, respectively) were generated with SigGenRP™ software (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA). Stimuli were presented monaurally at 30 or 50 pulses per second each, from 90 to 10 dB relative to sound pressure level (dB SPL) in 5–10 dB SPL steps, and the electrical response was amplified, recorded, and averaged (1000 and 750 stimulus-evoked responses for click and tone burst, respectively), using BioSigRP™ software. Hearing thresholds (dB SPL) and wave latencies (ms) were calculated based on the ABR

waves that were registered as reported [44]. When indicated, P60 heterozygous and wild-type mice were exposed to high frequency-enriched noise for 30 min at an intensity of 110 dB SPL in a sound-proof reverberant chamber [45]. The vestibular function of P20–40 null, heterozygous and wild-type littermates was tested as reported, in a series of simple tests adapted from standard protocols ([46]; <http://empress.har.mrc.ac.uk/>), as previously described [47]. Briefly, mice were observed for behavioral aberrations associated with vestibular disorders such as circling, head bobbing, or abnormal gait. Then the following behaviors were sequentially evaluated: (i) the ability of mice to reach a horizontal surface and the presence of abdominal forward curling; (ii) their performance in contact righting and air righting tests to evaluate the mice's ability to reorient their bodies from an inverted position; and (iii) their performance in a swimming test to discover abnormal swimming behaviors such as vertical, circular or side swimming, or immobile floating.

Middle ear dissections

Three P20 mice of each genotype were administered a lethal dose of pentobarbital (Dolethal, Vétoquinol). The ossicles—the malleus, incus, and stapes—of the middle ear were dissected. Microphotographs of these structures were taken using a digital camera connected to a Leica MZ8 stereo microscope (Leitz).

Histology and immunohistochemistry

Cochleae were dissected, photographed, and fixed overnight in 4 % paraformaldehyde in PBS (4 °C), decalcified in 0.3 M EDTA (pH 6.5) for 8 days, and embedded in paraffin, celloidin, or gelatin. Sections of the paraffin-embedded (5 µm) or celloidin-embedded (2 µm) tissues were stained using hematoxylin/eosin and cresyl violet, respectively, to study cochlear cytoarchitecture or were subjected to immunohistochemistry, as described [48, 49]. After incubation with the primary antibody overnight (4 °C) (Supplementary Table S1), sections were incubated with biotinylated secondary antibodies (Chemicon; dilution 1:200) for 2 h and processed using an ExtrAvidin-peroxidase conjugate solution (1:200, Sigma). Antibody binding was visualized using DAB, and sections were mounted in Entellan[®] (Merck Chemicals) for observation using a Zeiss Axiophot microscope equipped with an Olympus DP70 digital camera. Cryosections (10 µm) were incubated as above and then with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies for 2 h (RT). Sections were mounted in Prolong Gold containing DAPI (Invitrogen) and visualized using a fluorescence microscope (Nikon 90i, Tokyo, Japan). The intensity of neurofilament, synaptophysin,

Kir4.1, myelinP0, KCNQ1, immunofluorescence, Sox2, and myosin VIIa positive cells were determined and counted, respectively, in 4–12 equivalent sections prepared from at least 3 mice of each genotype and experimental group. Quantifications were performed in a region of interest (ROI) in each cochlea from base to apex using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [50].

TUNEL

Apoptosis was evaluated by TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) using the ApopTag kit (Millipore/S7101). Cryosections (10 µm) were fixed using 1 % PFA pH 7.4 for 10 min (RT). The sections were post-fixed in ethanol/acetic acid (2:1, by vol.) for 5 min (–20 °C), incubated with the TdT enzyme (37 °C) for 1 h and processed using an anti-digoxigenin conjugate. Apoptotic cells were visualized using a peroxidase substrate solution. The TUNEL-positive nuclei in the organ of Corti in 6 (non-exposed wild type), 10 (wild type exposed to noise), 8 (non-exposed heterozygous), and 10 (heterozygous exposed to noise) sections prepared from three mice of each genotype and the experimental group were quantified using NIH ImageJ software as described above.

Protein extraction and Western blotting

Proteins from frozen cochleae of at least three mice/experimental group were extracted using a Ready Protein Extraction Kit (BioRad). Cochleae were lysed in 100–250 µl of extraction buffer containing 0.01 % protease- and phosphatase-inhibitor cocktails and 0.01 % TBP (Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined with the RC DC Protein Assay kit (BioRad) using bovine serum albumin (BSA) as the standard. Equal amounts of cochlear proteins were subjected to gel electrophoresis (Any kD Mini-PROTEAN-TGX, BioRad) and transferred to PVDF membranes (0.2-µm, BioRad) using a Bio-Rad Trans Blot TURBO apparatus. After incubation with a blocking solution, the membranes were probed overnight (4 °C) with the primary antibodies indicated in Supplementary Table S1. Membranes were then incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h (RT), and the bands were visualized using Clarity[™] Western ECL Substrate (BioRad/170–5060). Images of the blots were captured using an ImageQuant LAS4000 mini digital camera (GE Healthcare Bio-Sciences), and densities of the immunoreactive bands were quantified by densitometry using ImageQuant TL software (GE Healthcare Bio-Sciences). Different exposure times were used to ensure that the bands were not saturated.

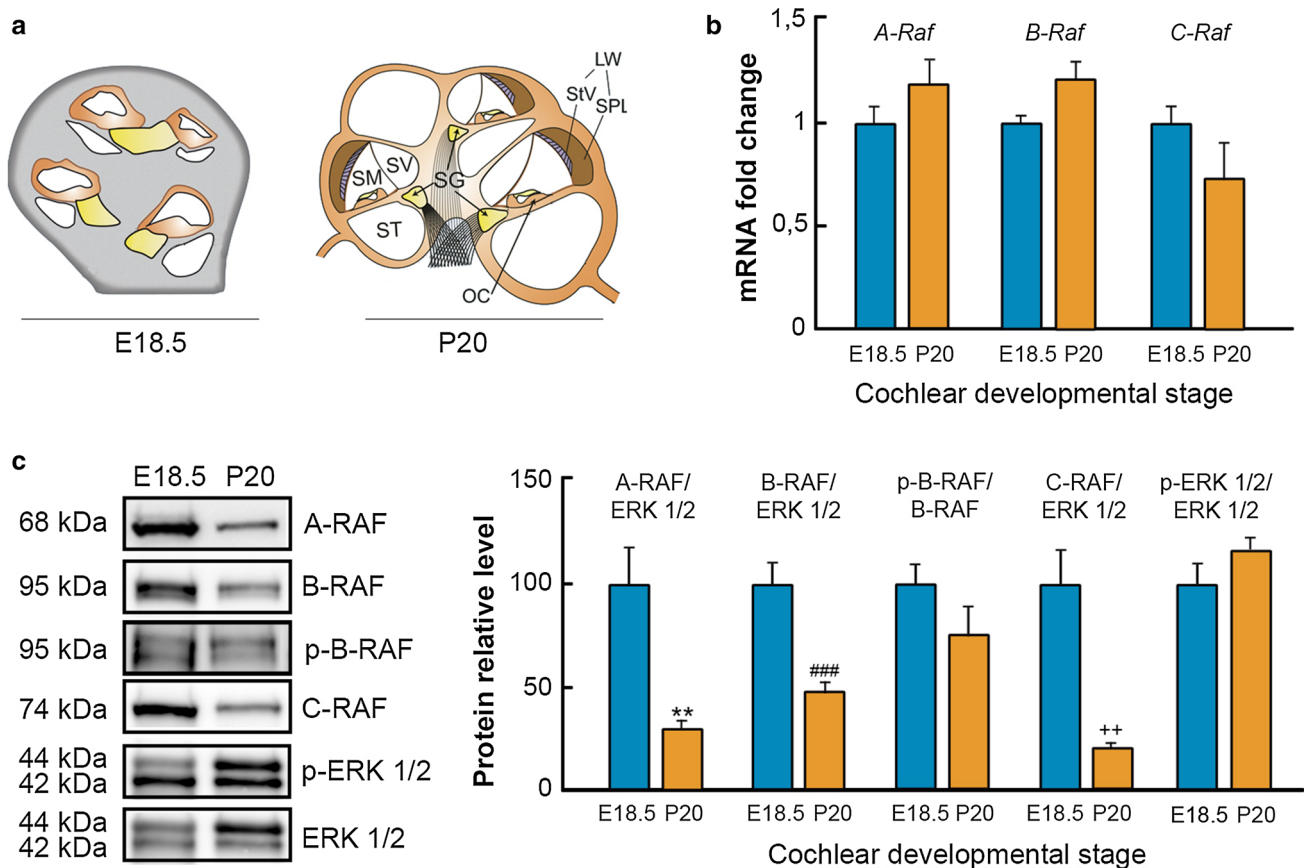


Fig. 1 RAF kinases are expressed in the cochlea. **a** Schematic illustration comparing cochlear cross sections of E18.5 and P20 mice. *SV* Scala vestibuli, *SM* Scala media, *ST* Scala tympani, *OC* organ of Corti, *SG* Spiral Ganglion, *LW* Lateral wall, *StV* Stria vascularis, *SPL* Spiral ligament. **b** *A-Raf*, *B-Raf* and *C-Raf* mRNA expression levels in E18.5 and P20 cochleae were analyzed using RT-qPCR. 18s RNA was used as the endogenous control gene. At least, three mice from each stage were evaluated in triplicate. Data were normalized to the E18.5 levels and expressed as mean \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The significance of the differences was evaluated using the Student's

t test. **c** A-RAF, B-RAF, C-RAF, and p-ERK1/2 levels in cochlear lysates were analyzed by Western blotting and normalized using ERK levels. p-B-RAF was normalized using B-RAF level. A representative sample blot from at least three mice in each stage is shown, and the average values obtained from densitometric measurements are plotted in bar graphs. The results are expressed as mean \pm SEM. The significance of the differences was evaluated using Student's *t* test. ** $P < 0.01$ versus A-RAF E18.5; ### $P < 0.001$ versus B-RAF E18.5; and ++ $P < 0.01$ versus C-RAF E18.5

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using RNeasy (Qiagen) from 1–2 cochleae; its integrity and concentration were assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). At least, three mice per condition were used. cDNA was then generated by reverse transcription (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems) and gene expression analyzed in triplicate by qPCR using TaqMan[®] Gene Expression Assay kits (Applied Biosystems). The following probes were used: *Foxm1* (Mm00514924_m1), *Foxg1* (Mm02059886_s1), *Gap43* (Mm00500404_m1), *Gmf-b* (Mm01322969_m1), *Igf1r* (Mm00802831_m1), *Mapk14* (Mm00442498_m1), *Mash1* (Mm03058063_m1), *Mef2d* (Mm00504931_m1), *Ntn1* (Mm00500896_m1), *p27kip1/Cdkn1b* (Mm00438168_m1), *A-Raf* (Mm0055

0186_m1), *B-Raf* (Mm01165837_m1), *C-Raf* (Mm00466513_m1), and *Sox2* (Mm03053810_s1). PCR was performed on an Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System using eukaryotic 18S and RPLP0 rRNA as the endogenous housekeeping genes. Relative quantification values were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and data were expressed as the mean \log_{10} RQ values [51].

Statistical analysis

Data analysis was performed by running the Student's *t* test using SPSS v19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Post hoc multiple comparison analyses included the Bonferroni test when equal variances were assumed to exist. Data were expressed as mean values \pm SEM. Results were considered significant at $P < 0.05$.

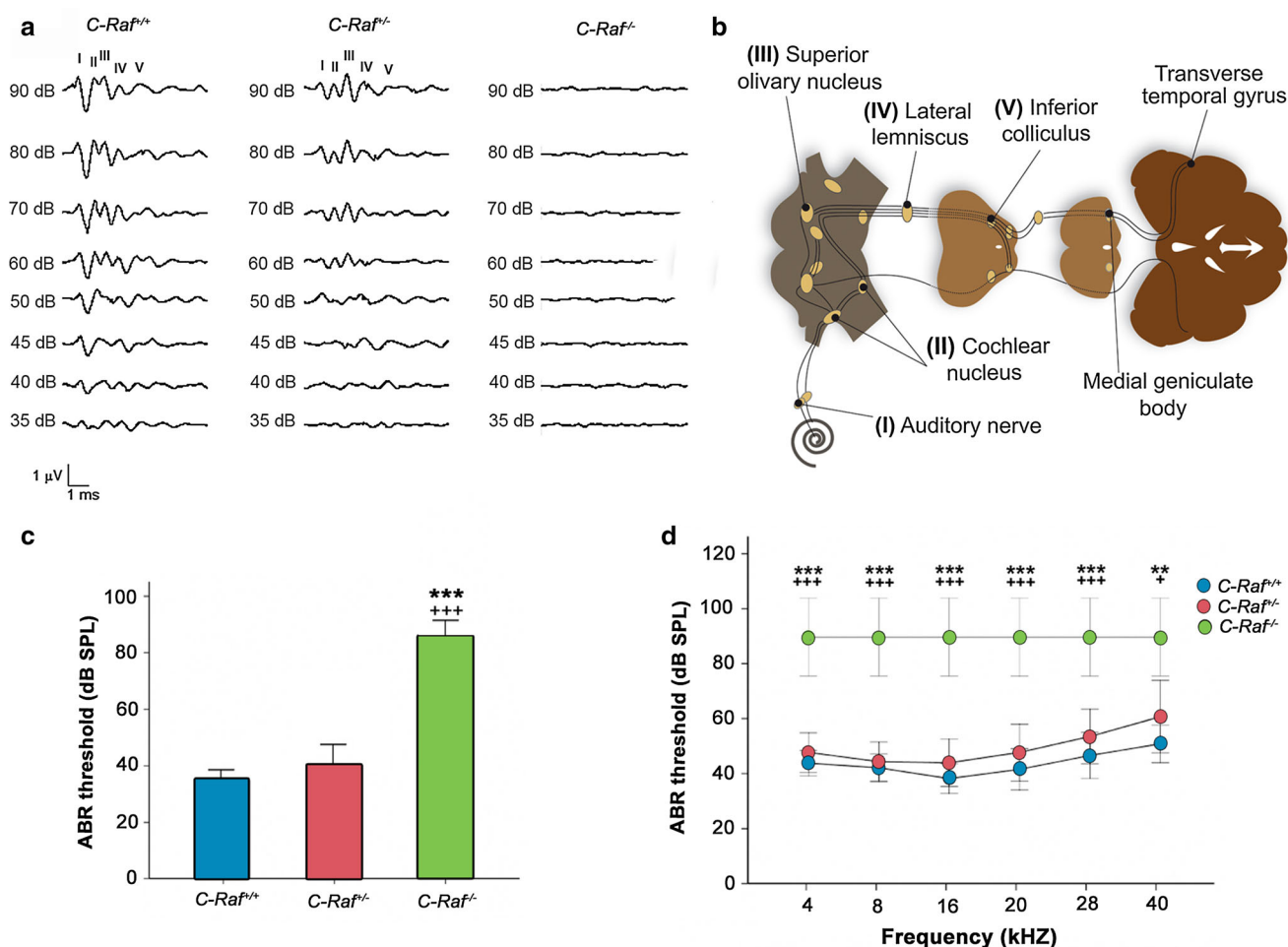


Fig. 2 *C-Raf* null mice have profound bilateral sensorineural deafness. **a** Plots show representative ABR recordings of wild-type, heterozygous, and null mice. **b** The typical ABR profile consists of five waves corresponding to the different hearing processing centers: I auditory nerve; II cochlear nucleus; III superior olivary nucleus; IV lateral lemniscus; V inferior colliculus. **c** Average ABR thresholds for

click stimuli in wild-type ($n = 9$), heterozygous ($n = 13$) and null mice ($n = 4$). **d** ABR thresholds in response to tone-burst stimuli in wild-type ($n = 9$), heterozygous ($n = 13$) and null mice ($n = 4$). Null mice showed severe sensorineural hearing loss. The significance of the differences was evaluated using Student's t test. *** $P < 0.001$ versus wild type and +++ $P < 0.001$ versus heterozygous

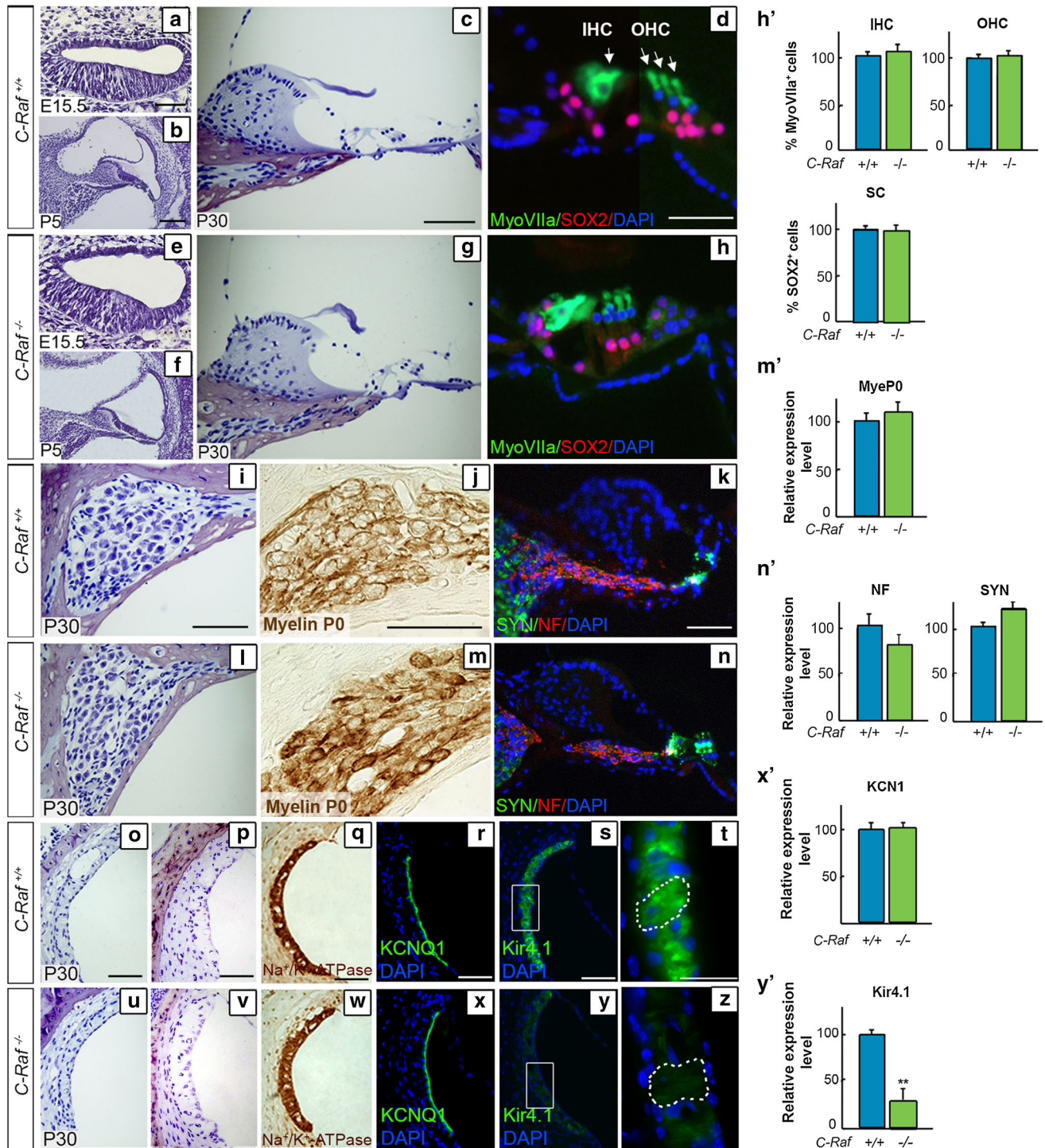
Results

RAF kinases are expressed in the developing and postnatal mouse inner ear

To analyze temporal expression of RAF kinases, quantitative RT-PCR was performed using E18.5 and P20 cochleae (Fig. 1a, b). *A-Raf*, *B-Raf*, and *C-Raf* transcripts were similarly expressed at both ages, whereas RAF protein levels were significantly reduced at P20 (Fig. 1c). Interestingly, the p-B-RAF/B-RAF ratio was not reduced in the P20 cochlea when compared to that observed at E18.5. Accordingly, the phosphorylation level of its main target, ERK1/2, was not significantly changed (Fig. 1c).

C-Raf null mice presented profound sensorineural deafness

The ABR of the three genotypes was determined in 3- to 5-week-old mice (Fig. 2a, b), and demonstrated that wild-type and heterozygous mice had similar thresholds (35 ± 4 and 40 ± 5 dB SPL, respectively; Fig. 2c). In contrast, null mice showed no auditory response, even at the highest sound intensity tested (90 dB SPL; Fig. 2c). Frequency audiograms (Fig. 2d) and wave latencies (data not shown) were also studied in the three genotypes. Null mice were profoundly deaf but showed a normal response to standard vestibular screening tests (data not shown).



Normal cytoarchitecture and aberrant Kir4.1 channel expression in *C-Raf* null cochlea

The general anatomy of the middle and inner ears of null mice was normal (data not shown), in striking contrast with the reported 70 % reduction in body size [39]. The general

cochlear morphology of wild-type, heterozygous (data not shown), and null mice was entirely comparable at the selected embryonic and early postnatal stages (Fig. 3a, b, e, f). The outer and inner hair cells of the adult organs of Corti in the mutant mice had a normal appearance (Fig. 3, compare panels c, d with g, h), as confirmed by the pattern of myosin

Fig. 3 Characterization of *C-Raf* null mice cochlear cytoarchitecture and cell-type markers showing reduced levels of the Kir4.1 potassium channel, (a–c, e–g). Representative microphotographs of cross sections from wild-type and null mouse cochleae at E15.5, P5 and P30 (d, h, h'). The degree of Myosin VIIa (green) immunostaining/ μm^2 (outer and inner hair cells, OHC and IHC, respectively) and of SOX2 (red) (supporting cells, SC) was quantified in the organ of Corti (i, l). Neuronal distribution in the spiral ganglion was similar in P30 wild-type and null mice. Quantification of the intensity/ μm^2 of myelin P0 (j, m, m'), neurofilament (NF, red) and synaptophysin (SYN, green) (k, n, n') staining showed no differences between genotypes. Representative microphotographs of paraffin-embedded (o, u) and semi-thin celloidin-embedded (p, v) cross sections of the stria vascularis from P30 wild-type and null mice (q, r, w, x, x'). Immunostaining of Na^+/K^+ -ATPase and KCNQ1 channels in sections of wild-type mice and null mouse cochlea (s, t, y, z, y'). The Kir4.1 potassium channel expression level, also known as KCNJ10, was reduced in intermediate cells of null mice. Quantification of the immunofluorescence signal/ μm^2 was done using ImageJ software. Data were obtained from 4 to 12 sections of at least three mice from each genotype and plotted in bar graphs as the mean \pm SEM relative to wild-type values. The significance of the differences was evaluated using Student's *t* test: $**P < 0.005$ versus wild type. Scale bars 10 μm (d, h, t, z); 25 μm (a–c, e–g, i–n, o–s, u–y)

VIIa expression (h'). The number of supporting cells in the various genotypes was also similar, as indicated by transcription factor SOX2 expression (Fig. 3d, h, quantification shown in h'). Histological analysis of spiral ganglia showed no differences in cellular organization among the genotypes (Fig. 3i, l). We reported aberrant myelination for *Igfl* and *Irs2* mutant mice genes [30, 48], and therefore, the expression of myelin P0 was examined, but no significant differences were found among the genotypes (Fig. 3j, m, quantification shown in m'). Neurofilament and synaptophysin antibodies were used to examine the afferent fibers and the synaptic regions, respectively, but again there were no measurable differences among the genotypes (Fig. 3k, n, quantification shown in n').

Histological examination of the stria vascularis in sections of 1-month-old wild-type, heterozygous (data not shown) and null cochleae revealed an apparently normal morphology and a similar capillary network in the three genotypes (Fig. 3, compare panels o, p with u, v). The stria vascularis is formed by marginal, intermediate-melanocytes, and basal cell layers. To further study this structure, the expression of cell-type specific channel proteins was assessed (Fig. 3, compare panels q–t with w–z). There were no differences in the Na^+/K^+ -ATPase and KCNQ1 expression levels among the genotypes (Fig. 3, compare panels q–r with w–x, quantification shown in x'). In contrast, the potassium rectifying Kir4.1 channel expression level was significantly reduced, by 75 %, in null mice (Fig. 3s, y, quantification shown in y'). To exclude a migration defect, the intermediate cells were positively identified in null mice (Fig. 3t, z, dotted lines).

Functional tests revealed no obvious anatomical or cellular defects in the vestibular system of null mice (data not shown).

Molecular profiling of the E18.5 *C-Raf* null cochlea showed up-regulation of *FoxG1*

Expression levels of thirteen cochlear genes in wild-type and null E18.5 mice were compared using RT-qPCR. Selected genes shown include those coding for RAF family members, *A-Raf*, *B-Raf*, and *C-Raf* (Fig. 4a), to test their potential up-regulation to compensate *C-Raf* absence. Other potential candidates for phenotype compensation are IGF-1 downstream signaling targets, including *Igflr*, *FoxM1*, *p27kip1*, *Mapk14* [52], *Gap43*, and *Ntn1* [53] (Fig. 4 b; Supplementary Table S2). Finally, a panel of genes was tested to study if there was a neurodevelopmental alteration associated with the functional phenotype such as *FoxG1* [54], *Sox2* [55] (Fig. 4b; Supplementary Table S2), *Mef2D*, *Mash1* [52], and *Gmfb* [56] (Supplementary Table S2). Expression levels of these genes were similar in both genotypes, with the exception of *FoxG1*, a neuronal pro-survival transcription factor [54, 57] that increased 2.5-fold in the null cochlea (Fig. 4b).

Next, we evaluated the levels and phosphorylation state of C-RAF, B-RAF, ERK1/2, and the 14–3–3 adapter proteins, as well as those of the PI3K/AKT, p38, and JNK kinases. There were no differences between the genotypes (Fig. 4c), which confirmed that the *C-Raf* deletion is not sufficient to halt inner ear development.

To further understand the role of C-RAF in adult hearing and given that *C-Raf*^{−/−} null mice die in the first 2 months of life, *C-Raf*^{+/-} heterozygous mice were used for further studies. However, two-month-old *C-Raf*^{+/-} heterozygous mice showed normal baseline hearing and cochlear structure. The expected roles of C-RAF in cell self-repair and survival prompted us to study their response to stress.

C-Raf heterozygous adult mice showed an increased susceptibility to NIHL

P60 wild-type and *C-Raf*^{+/-} heterozygous mice were noise challenged (Fig. 5a). Wild-type mice showed a temporary 40 dB ABR-threshold shift that was partially recovered 35 days later (Fig. 5b). Hearing recovery in wild-type mice was evident as early as 14 days after injury. In contrast, heterozygous mice showed a 60 dB ABR-threshold shift and no recovery 35 days later (Fig. 5b).

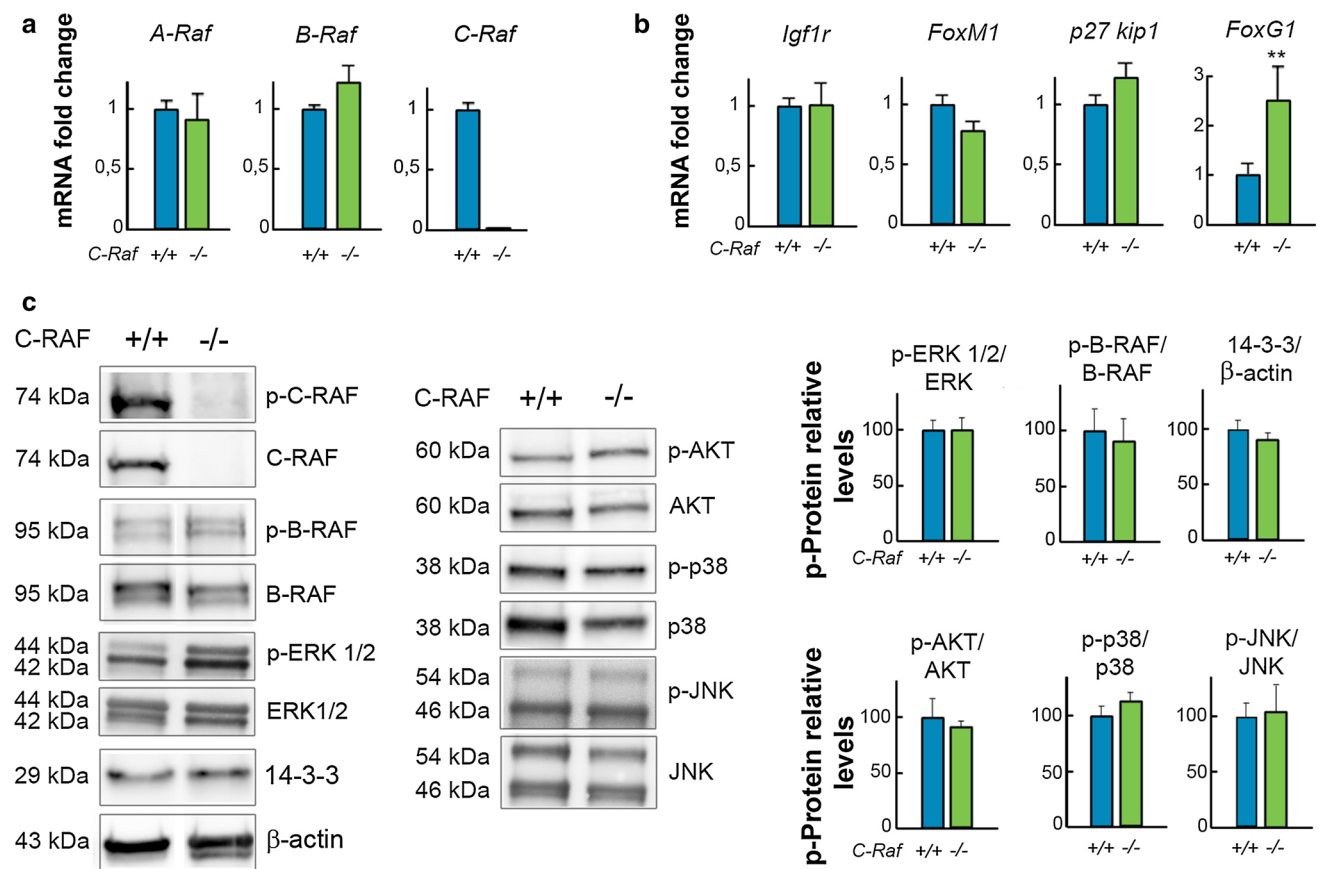


Fig. 4 Expression of FoxG1 is up-regulated in *C-Raf* null mice cochlea. mRNA levels of (a) *A-Raf*, *B-Raf*, and *C-Raf* and (b) *Igf1r*, *FoxM1*, *p27 kip1*, and *FoxG1* in E18.5 wild-type (blue bars) and null (green bars) cochlea were analyzed using RT-qPCR. 18s RNA was used as the endogenous control gene. At least, three mice from each genotype were evaluated in triplicate. Data were normalized to the levels of wild-type mice and were expressed as mean \pm SEM of $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The significance of the differences was evaluated using Student's *t* test. ***P* < 0.005 versus wild type. c C-RAF, p-B-RAF,

p-ERK 1/2, and 14-3-3 levels in wild-type and null cochlea were analyzed by Western blotting using cochlear lysates and were normalized to B-RAF, ERK 1/2, and β -actin levels, respectively. p-AKT, p-p38, and p-JNK levels were normalized with respect to total levels of their respective kinases. A representative blot of samples obtained from at least three mice of each genotype is shown. Densitometric average values are shown in the histogram. Results are expressed as mean \pm SEM. The significance of the differences was evaluated using Student's *t* test

Altered cytoarchitecture and cell-type expression markers in noise-exposed *C-Raf* heterozygous cochlea

Histological analysis of non-exposed wild-type (Fig. 6a–e) and heterozygous mice (Fig. 6k–o) showed normal cochlea during the study. 35-day post-noise exposure wild-type animals showed a reduction of the fibrocyte population in the central region of the spiral limbus but no other evident cellular alterations (Fig. 6f–j, asterisk in g). In contrast, heterozygous noise-exposed mice showed generalized cochlear damage (Fig. 6p–t). The interdental cells of the spiral limbus were absent (Fig. 6q, arrows), and the organ of Corti had a collapsed tunnel of Corti and a low density of hair cells and supporting cells (Fig. 6r, arrows). Moreover, the spiral ligament had a low density of fibrocytes with evidence of cellular debris within the fibrocyte type-

IV region (Fig. 6s). Finally, the spiral ganglion was affected to different degrees, in both loss of both fibers and cellularity, as demonstrated by the increase in size of intercellular spaces (Fig. 6t).

The severity of the cellular alterations observed in heterozygous mice exposed to noise was confirmed by evaluating the expression of cell-type markers 35 days after noise exposure. Myosin VIIa and SOX2 immunostaining indicated, respectively, a 25 % significant reduction in the population of supporting cells and a 40 % decrease in the number of outer hair cells in noise-exposed heterozygous mice compared to all the other experimental groups (Fig. 7, compare panel a with e, arrow, quantification shown in e'). Accordingly, a 95 % increase in the number of apoptotic TUNEL⁺ cells was evident 2 days after noise exposure in heterozygous cochlea (Fig. 7a, e, insets; TUNEL quantification in e'). Neurofilament and

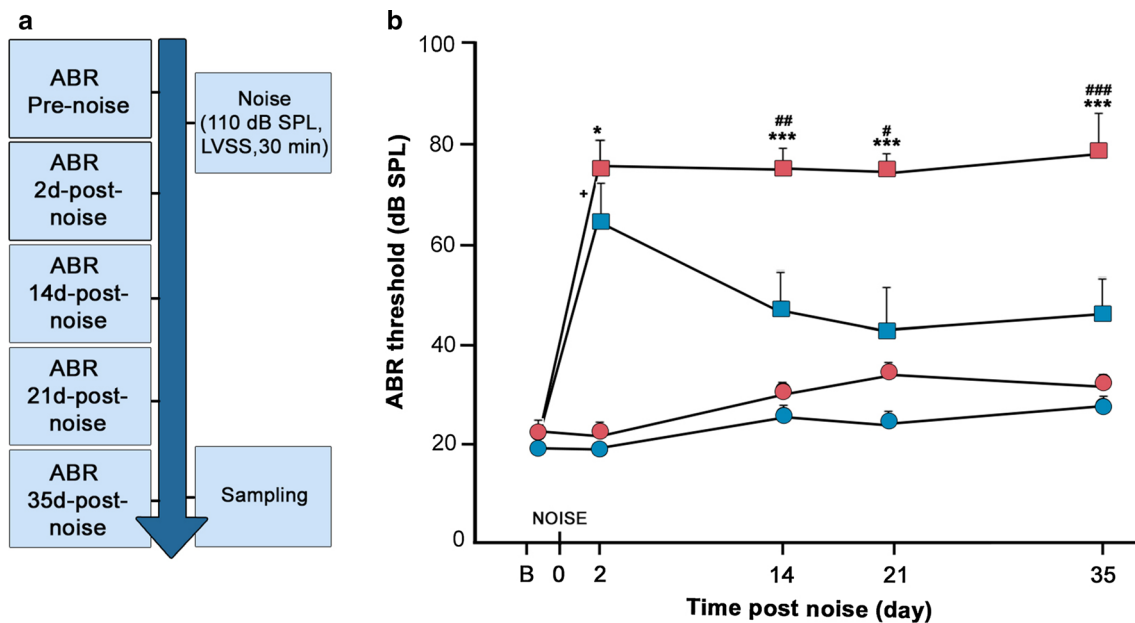


Fig. 5 *C-Raf* heterozygous mice showed increased susceptibility to noise-induced hearing loss. **a** Scheme of the experimental design. Briefly, ABR thresholds were determined for the two experimental groups of 2-month-old wild-type ($n = 16$) and heterozygous ($n = 15$) mice. Next, one group of mice was exposed to moderate noise of 110 dB SPL (2–22 kHz) for 30 min in a sound-proof reverberant chamber. ABR evaluations were repeated on days 2, 14, 21, and 35. **b** Auditory click thresholds of both experimental groups were measured. Data from non-exposed mice ($n = 4$ /genotype) are shown in circles, whereas data from noise-exposed ($n = 4$ /genotype) mice are shown in squares. Wild-type ($n = 4$, blue) and heterozygous

($n = 4$, red) mice showed similar ABR-threshold increases 2 days after noise exposure. Wild-type mice (blue squares) gradually recovered their hearing, but heterozygous mice (red squares) did not. ABR thresholds of non-exposed mice from either genotype were not modified during the experiment. The significance of the differences was evaluated using Student's *t* test: $^+P < 0.05$ versus non-treated wild type; $^#P < 0.05$ versus wild type exposed to noise; $^{##}P < 0.01$ versus wild type exposed to noise; $^{###}P < 0.001$ versus wild type exposed to noise; $^*P < 0.05$ versus non-treated heterozygous; $^{***}P < 0.001$ versus non-treated heterozygous

myelin P0 expression decreased by 80 and 70 %, respectively, confirming neuronal degeneration of heterozygous spiral ganglia. Hair cell synapses were also significantly affected, as indicated by the 80 % decrease of synaptophysin labeling (Fig. 7, compare panels b, c with f, g, quantification shown in f, g'). Finally, only wild-type mice exhibited a 60 % increase in the Kir4.1 expression level in response to noise (Fig. 7d–h, quantification in h').

C-Raf heterozygous mice showed basal activation of apoptotic signaling pathways

The phosphorylation state of key kinases was studied in the cochleae of wild-type and heterozygous mice 2 days after noise exposure (Fig. 8a). Heterozygous cochleae exhibited significantly higher baseline ratios of p-JNK/JNK than wild-type mice. In response to noise, both genotypes showed an increase of around 2-fold and 1.5-fold, respectively, in the activity ratios of p-ERK/ERK and p-JNK/JNK. The p-AKT/AKT ratio, an index of cell survival, was not significantly different between genotypes, but cleaved PARP (f-PARP-1) levels, an index of apoptotic cell death, were increased in response to noise (Fig. 8b, quantification

in c). PARP fragmentation was significantly stronger in heterozygous than in wild-type cochleae.

Discussion

RAF kinases play an essential role during embryonic development, as demonstrated by the fact that null mutants are not viable ($B-Raf^{-/-}$), have a high rate of embryonic lethality ($C-Raf^{-/-}$) or die shortly after birth ($A-Raf^{-/-}$) [13, 39, 58]. In this study, we show that the three RAF kinases are expressed in the mouse inner ear with similar developmental expression patterns. Each RAF kinase has highly specific functions [12, 21, 59] although they are exchangeable in certain contexts [20]. Our previous work showed that RAF kinases are targets of IGF-1, promoting cell proliferation, cell survival, and neuritogenesis during early development of the chicken inner ear. C-RAF inhibition in the chicken otic vesicle triggered apoptosis, whereas B-RAF and C-RAF inhibitions also impaired proliferation of the otic neuroepithelial progenitors [24]. Similar results have been reported in other species [60].

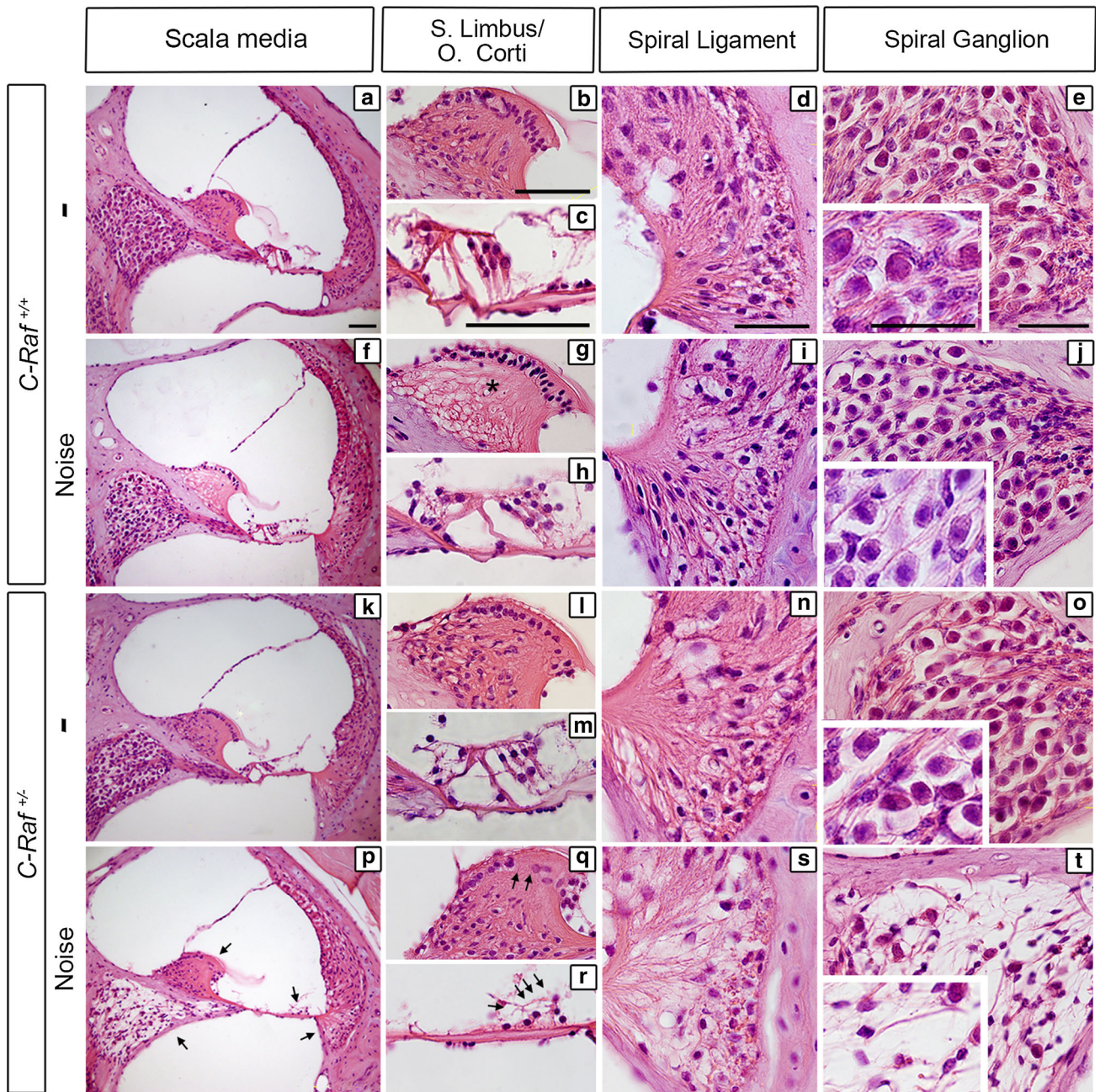


Fig. 6 *C-Raf* heterozygous mice exhibited severe histological alterations in the organ of Corti and the spiral ganglion following noise exposure. **a–e** Histological cross sections of non-exposed wild-type mice. **f–j** Wild-type mice exposed to noise showed a reduction in the number of fibrocytes in the spiral limbus (**g**, asterisk), no other cellular alterations were observed, and the general cytoarchitecture was similar to that of non-treated wild-type mice. **k–o** Heterozygous

mice not exposed to noise showed a cellular phenotype identical to wild-type mice. **p–t** Heterozygous mice exposed to noise showed the following alterations: loss of fibrocytes in the spiral limbus (**q**, arrows); loss of hair cells and supporting cells at the organ of Corti (**r**, arrows); loss of spiral ligament fibrocytes (**s**); and the spiral ganglion showed a drastic reduction in neuronal density (**t**). Scale bars 25 μ m

C-Raf null mice have poor embryonic survival rates, exhibit significant malformations at birth, including a reduced body size, and die at an early postnatal age because of extensive liver apoptosis [19]. In contrast, the middle and inner ears of null mice did not show any evident

malformations or size reductions. Gross morphology and cytoarchitecture of the cochlea as well as expression of cell-type markers in the spiral ganglion and organs of Corti were similar in null and wild-type mice. We did not observe any compensation at the gene expression level of the

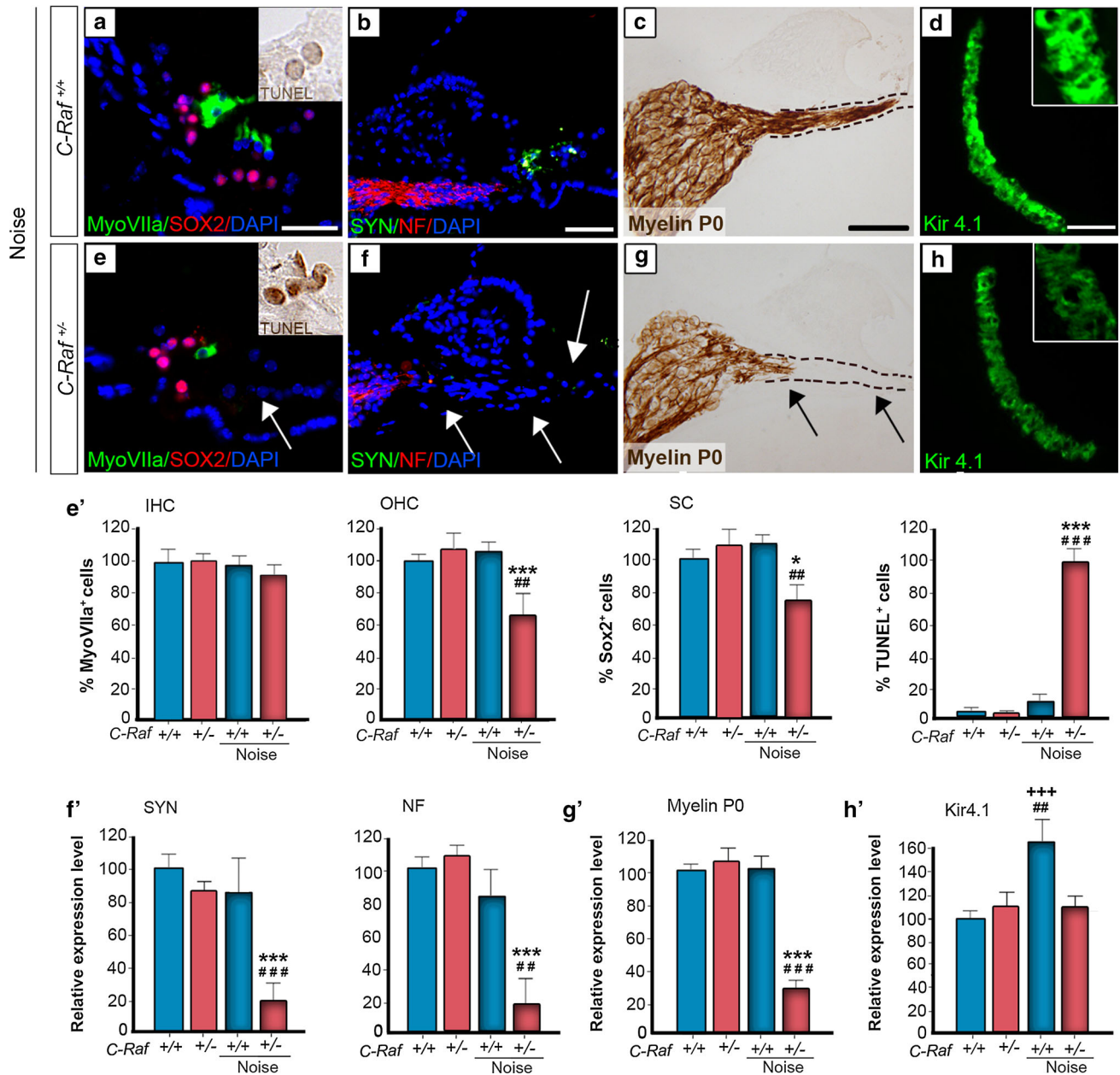


Fig. 7 *C-Raf* heterozygous mice exhibited severe cellular alterations in the organs of Corti and spiral ganglion following noise exposure. **a**, **e**, **e'** Wild-type and heterozygous mice exposed to noise showed different immunostaining patterns. Myosin VIIa (green) positive outer hair cells and SOX2 (red) positive supporting cells showed 40 and 25 % reductions, respectively, in heterozygous mice. In contrast, TUNEL staining 2 days after noise exposure (insets **a**, **e**) showed a 95 % increase in the noise-exposed heterozygous mice with respect to any other experimental group (**e'**). **b**, **c**, **f**, **g**, **f'**, **g'** Neuronal markers NF (red), SYN (green) and myelin P0 (brown) evidenced neuronal and nerve fiber loss. Quantification of staining/ μm^2 showed that only heterozygous mice exposed to noise presented a general reduction. **d**,

h, **h'** Immunostaining for the Kir4.1 potassium channel (green) in the stria intermediate cells increased by 60 % in the wild-type but not in the heterozygous mice after noise exposure. The intensity of the immunofluorescence per μm^2 of the regions was quantified using ImageJ software. Data were obtained from 4 to 12 sections of at least three mice from each genotype and are shown relative to those of non-exposed wild-type mice as mean \pm SEM. The significance of the differences was evaluated using Student's *t* test: +++*P* < 0.001 versus non-treated wild type; **P* < 0.05 versus non-treated heterozygous; ****P* < 0.001 versus non-treated heterozygous; ##*P* < 0.01 versus wild type exposed to noise; ####*P* < 0.001 versus wild type exposed to noise; Scale bars 10 μm (**a**, **e**); 25 μm (**b-d**, **f-h**)

other RAF kinases, and, accordingly, proliferation (ERK1/2) and survival pathways (AKT) showed normal activation levels in null mice cochlea. In contrast, we observed

increased FoxG1 expression, a transcription factor typically considered a target of the PI3 K/AKT pathway [61]. FoxG1 plays an important role in inner ear morphogenesis

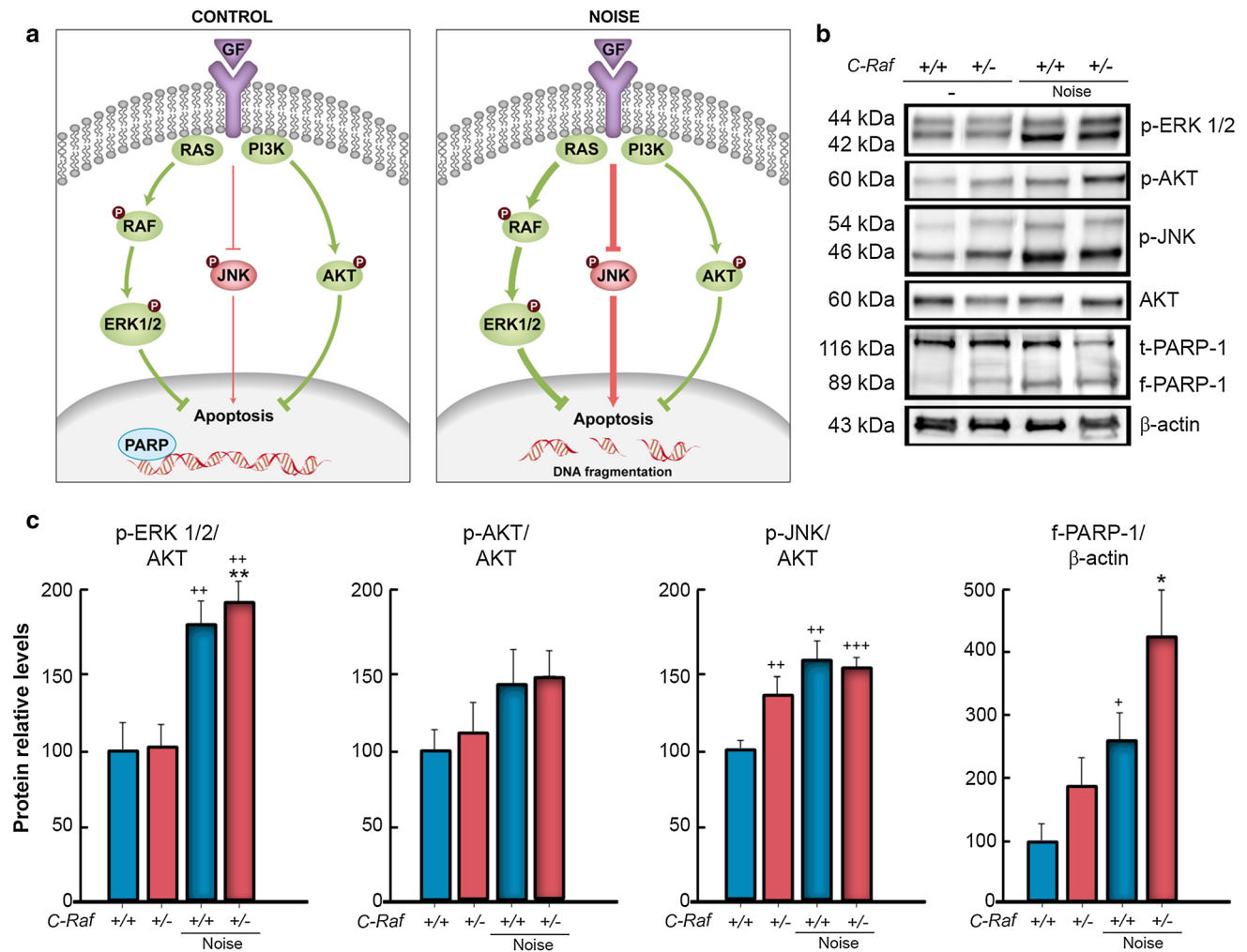


Fig. 8 *C-Raf* heterozygous mice showed basal JNK activation and increased PARP fragmentation after noise exposure. **a** The diagram highlights the RAF-MEK-ERK, PI3K/AKT, and JNK pathways that modulate cell protection and repair under control (*left*) and noise exposure (*right*) conditions. GF growth factor. **b**, **c** Levels of p-ERK1/2, p-AKT, p-JNK, and cleaved fragment f-PARP-1 were analyzed by Western blotting of cochlear lysates. A representative blot is shown in (**b**). Protein levels were normalized using total AKT levels, except for f-PARP1, which was normalized using the β -actin

levels. Samples from at least three mice for each condition and genotype were tested. The average densitometric values are expressed as mean \pm SEM. **c** The significance of the difference was determined using Student's *t* test: $^+P < 0.05$ versus non-treated wild type; $^{++}P < 0.01$ versus non-treated wild type; $^{+++}P < 0.001$ versus non-treated wild type; $*P < 0.05$ versus non-treated heterozygous; $^{**}P < 0.01$ versus non-treated heterozygous. Exposure to noise increased cleaved f-PARP-1, ERK1/2, and JNK phosphorylation ratios, but not those of AKT

[54], and its expression is up-regulated in auditory neurons upon apoptotic insult [57]. RAF proteins have been shown to cross-talk with the PI3K/AKT pathway [61]. Therefore, it is entirely possible that the cochlea compensated for C-RAF developmental deficiency by basal activity of other RAF kinases and by cross-talk with basal AKT to up-regulate FoxG1 dependent cell survival. Further understanding of the cross-talk between FoxG1 and C-RAF would shed light on the role of these molecules in the development of cochlear structure and function.

C-Raf null mice exhibited a normal cochlear cytoarchitecture, but they had a profound bilateral sensorineural deafness that affected all frequencies. Deafness can be

explained by reduced expression of the inwardly rectifying the K^+ Kir4.1 channel in the stria vascularis. Kir4.1 is essential for K^+ recycling, endolymph homeostasis, and maintenance of the endocochlear potential; hence Kir4.1 mutations cause human [62] and mouse deafness [63]. To our knowledge, there are no published data linking RAF kinases to Kir4.1 expression. Adapter 14-3-3 proteins bind C-RAF as well as several ion channels to modulate their function, but their potential binding to Kir4.1 has not been described [9, 64, 65].

Within the stria vascularis, Kir4.1 is expressed by intermediate cells which are melanocytes of neural-crest origin, whereas most of the other inner ear cell types

develop from the otic placode [25]. This fact raised the possibility that these mice had a potential defect in melanocyte migration. C-RAF has been implicated in the migration of mouse keratinocytes and fibroblasts [66], migration of human endometrial stromal cells [67], and, together with B-RAF, in hair follicle melanoblast self-renewal [3]. However, melanocytes were present in the stria vascularis of null mice, although a defect in the renewal of melanocytes in null mice could account for their reduced recovery level from noise injury. Finally, the stria vascularis is highly rich in capillaries, and defects in the striatal microvasculature might affect the integrity of the surrounding cells and their molecules as it affects their functions [68, 69]. Endothelial defects are traditionally associated with *B-Raf* deficiency [58] but C-RAF is important for endothelial-cell survival during angiogenesis [70]. However, we discarded a generalized endothelial defect because KCNQ1 and Na⁺/K⁺-ATPase were expressed at normal levels in null mice.

C-RAF has a well-known role in cell survival, protection, and repair [5]; therefore, we decided to study the consequences of its chronic deficiency on the auditory receptor's response to injury. *C-Raf* heterozygous mice showed a normal hearing threshold, and their cochlear morphology was similar to that of wild-type mice, but the JNK stress kinase basal activation level was increased, and the PARP-1-dependent DNA-repair mechanisms were impaired. Accordingly, 30 min of exposure to moderate noise caused widespread cellular damage in heterozygous mice cochleae, which was associated with an irreversible shift in the ABR threshold. Cellular loss was generalized and included outer hair cells, neurons, spiral-limbus fibrocytes, and type IV fibrocytes of the spiral ligament. The damage response pattern was entirely different in wild-type mice, which showed less cellular loss and a lower threshold shift that partially recovered over time. These results suggested that heterozygous mice had an increased susceptibility to noise-induced injury.

Noise exposure causes the activation of various biochemical pathways, including the JNK pathway [28], whose activation leads to apoptosis [71–73]. Accordingly, blocking apoptotic signaling using JNK inhibitors diminished the extent of cochlear damage and hearing loss caused by noise [74, 75]. Survival pathways are activated in noise-resistant mouse strains [76], and ERK phosphorylation is induced by mechanical damage and noise exposure [28, 77]. B-RAF is the main RAF kinase that promotes ERK phosphorylation and cell proliferation [78], and it is expressed in hair cells. Both heterozygous and wild-type mice showed similar increased p-ERK levels after noise exposure. These data suggest that B-RAF acts as the upstream kinase in the process of noise damage recovery, whereas C-RAF survival actions are mediated by

an ERK-independent mechanism for which B-RAF cannot compensate.

Taken together, the results of this study strongly support the involvement of RAF kinases in repair and protection of the auditory receptors.

Acknowledgments The authors wish to thank the members of the Genomics and Non-invasive Neurofunctional Evaluation facilities (IIBM, CSIC-UAM) for their technical support. We would also like to warmly thank our colleagues in the Neurobiology of Hearing group for sharing unpublished data and for helpful discussions. This work was supported by Spanish grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-24391 and SAF2014-53979-R) and European FP7-INNOVA2-AFHELO and FP7-PEOPLE-IAPP-TARGEAR to IVN. RdI hold a CSIC contract associated to SAF2011-24391.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Schreck R, Rapp UR (2006) Raf kinases: oncogenesis and drug discovery. *Int J Cancer* 119(10):2261–2271. doi:10.1002/ijc.22144
- Craig EA, Stevens MV, Vaillancourt RR, Camenisch TD (2008) MAP3Ks as central regulators of cell fate during development. *Dev Dyn* 237(11):3102–3114. doi:10.1002/dvdy.21750
- Valluet A, Druillennec S, Barbotin C, Dorard C, Monsoro-Burq AH, Larcher M, Pouponnot C, Baccarini M, Larue L, Eyche A (2012) B-Raf and C-Raf are required for melanocyte stem cell self-maintenance. *Cell Rep* 2(4):774–780. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.020
- Doma E, Rupp C, Baccarini M (2013) EGFR-ras-raf signaling in epidermal stem cells: roles in hair follicle development, regeneration, tissue remodeling and epidermal cancers. *Int J Mol Sci* 14(10):19361–19384. doi:10.3390/ijms141019361
- Koziel K, Smigelskaite J, Drasche A, Enthammer M, Ashraf MI, Khalid S, Troppmair J (2013) RAF and antioxidants prevent cell death induction after growth factor abrogation through regulation of Bcl-2 proteins. *Exp Cell Res* 319(17):2728–2738. doi:10.1016/j.yexcr.2013.07.029
- Polzien L, Baljuls A, Albrecht M, Hekman M, Rapp UR (2011) BAD contributes to RAF-mediated proliferation and cooperates with B-RAF-V600E in cancer signaling. *J Biol Chem* 286(20):17934–17944. doi:10.1074/jbc.M110.177345
- Molzan M, Schumacher B, Ottmann C, Baljuls A, Polzien L, Weyand M, Thiel P, Rose R, Rose M, Kuhenne P, Kaiser M, Rapp UR, Kuhlmann J, Ottmann C (2010) Impaired binding of 14–3–3 to C-RAF in Noonan syndrome suggests new approaches in diseases with increased Ras signaling. *Mol Cell Biol* 30(19):4698–4711. doi:10.1128/MCB.01636-09
- Cseh B, Doma E, Baccarini M (2014) The “RAF” neighborhood: protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Lett*. doi:10.1016/j.febslet.2014.06.025

9. Fischer A, Baljuls A, Reinders J, Nekhoroshkova E, Sibilski C, Metz R, Albert S, Rajalingam K, Hekman M, Rapp UR (2009) Regulation of RAF activity by 14–3–3 proteins: RAF kinases associate functionally with both homo- and hetero-dimeric forms of 14–3–3 proteins. *J Biol Chem* 284(5):3183–3194. doi:[10.1074/jbc.M804795200](https://doi.org/10.1074/jbc.M804795200)
10. Baljuls A, Mahr R, Schwarzenau I, Muller T, Polzien L, Hekman M, Rapp UR (2011) Single substitution within the RKTR motif impairs kinase activity but promotes dimerization of RAF kinase. *J Biol Chem* 286(18):16491–16503. doi:[10.1074/jbc.M110.194167](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194167)
11. Osborne JK, Zaganjor E, Cobb MH (2012) Signal control through Raf: in sickness and in health. *Cell Res* 22(1):14–22. doi:[10.1038/cr.2011.193](https://doi.org/10.1038/cr.2011.193)
12. Nekhoroshkova E, Albert S, Becker M, Rapp UR (2009) A-RAF kinase functions in ARF6 regulated endocytic membrane traffic. *PLoS One* 4(2):e4647. doi:[10.1371/journal.pone.0004647](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004647)
13. Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R, McMahon M (1996) Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol* 6(5):614–617
14. Pfeiffer V, Gotz R, Xiang C, Camarero G, Braun A, Zhang Y, Blum R, Heinsen H, Nieswandt B, Rapp UR (2013) Ablation of BRAF impairs neuronal differentiation in the postnatal hippocampus and cerebellum. *PLoS One* 8(3):e58259. doi:[10.1371/journal.pone.0058259](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058259)
15. Galabova-Kovacs G, Baccarini M (2010) Deciphering signaling pathways in vivo: the Ras/Raf/MEK/ERK cascade. *Methods Mol Biol* 661:421–431. doi:[10.1007/978-1-60761-795-2_26](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_26)
16. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH Jr, Stephenson JR (1983) Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80(14):4218–4222
17. Ceteci F, Xu J, Ceteci S, Zanuoco E, Thakur C, Rapp UR (2011) Conditional expression of oncogenic C-RAF in mouse pulmonary epithelial cells reveals differential tumorigenesis and induction of autophagy leading to tumor regression. *Neoplasia* 13(11):1005–1018
18. Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR (1990) Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 5(3):345–351
19. Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccarini M (2001) Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J* 20(8):1952–1962. doi:[10.1093/emboj/20.8.1952](https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1952)
20. Camarero G, Tyrsin OY, Xiang C, Pfeiffer V, Pleiser S, Wiese S, Gotz R, Rapp UR (2006) Cortical migration defects in mice expressing A-RAF from the B-RAF locus. *Mol Cell Biol* 26(19):7103–7115. doi:[10.1128/MCB.00424-06](https://doi.org/10.1128/MCB.00424-06)
21. Kern F, Doma E, Rupp C, Niaux T, Baccarini M (2013) Essential, non-redundant roles of B-Raf and Raf-1 in Ras-driven skin tumorigenesis. *Oncogene* 32(19):2483–2492. doi:[10.1038/ncr.2012.254](https://doi.org/10.1038/ncr.2012.254)
22. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004) The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11):875–885. doi:[10.1038/nrm1498](https://doi.org/10.1038/nrm1498)
23. Sanz C, Leon Y, Troppmair J, Rapp UR, Varela-Nieto I (1999) Strict regulation of c-Raf kinase levels is required for early organogenesis of the vertebrate inner ear. *Oncogene* 18(2):429–437. doi:[10.1038/sj.onc.1202312](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202312)
24. Magarinos M, Aburto MR, Sanchez-Calderon H, Munoz-Agudo C, Rapp UR, Varela-Nieto I (2010) RAF kinase activity regulates neuroepithelial cell proliferation and neuronal progenitor cell differentiation during early inner ear development. *PLoS One* 5(12):e14435. doi:[10.1371/journal.pone.0014435](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014435)
25. Magarinos M, Contreras J, Aburto MR, Varela-Nieto I (2012) Early development of the vertebrate inner ear. *Anat Rec (Hoboken)* 295(11):1775–1790. doi:[10.1002/ar.22575](https://doi.org/10.1002/ar.22575)
26. Li W, Sun S, Chen Y, Yu H, Chen ZY, Li H (2013) Disrupting the interaction between retinoblastoma protein and Raf-1 leads to defects in progenitor cell proliferation and survival during early inner ear development. *PLoS One* 8(12):e83726. doi:[10.1371/journal.pone.0083726](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083726)
27. Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J (2013) Insulin-like growth factor 1 inhibits hair cell apoptosis and promotes the cell cycle of supporting cells by activating different downstream cascades after pharmacological hair cell injury in neonatal mice. *Mol Cell Neurosci* 56:29–38. doi:[10.1016/j.mcn.2013.03.003](https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.03.003)
28. Maeda Y, Fukushima K, Omichi R, Kariya S, Nishizaki K (2013) Time courses of changes in phospho- and total-MAP kinases in the cochlea after intense noise exposure. *PLoS One* 8(3):e58775. doi:[10.1371/journal.pone.0058775](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058775)
29. Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M (2011) Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(1):161–179. doi:[10.1016/j.beem.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.09.002)
30. Varela-Nieto I, Murillo-Cuesta S, Rodriguez-de la Rosa L, Lasatetta L, Contreras J (2013) IGF-I deficiency and hearing loss: molecular clues and clinical implications. *Pediatr Endocrinol Rev* 10(4):460–472
31. Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna EA, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A, Bos JM, Ommen SR, Esposito G, Lepri F, Faul C, Mundel P, Lopez-Sigüero JP, Tenconi R, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Torrente I, Marino B, Digilio MC, Zampino G, Ackerman MJ, Dallapiccola B, Tartaglia M, Gelb BD (2007) Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 39(8):1007–1012. doi:[10.1038/ng2073](https://doi.org/10.1038/ng2073)
32. Freeman AK, Ritt DA, Morrison DK (2013) Effects of Raf dimerization and its inhibition on normal and disease-associated Raf signaling. *Mol Cell* 49(4):751–758. doi:[10.1016/j.molcel.2012.12.018](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.018)
33. Gao Y, Yechikov S, Vazquez AE, Chen D, Nie L (2013) Impaired surface expression and conductance of the KCNQ4 channel lead to sensorineural hearing loss. *J Cell Mol Med* 17(7):889–900. doi:[10.1111/jcmm.12080](https://doi.org/10.1111/jcmm.12080)
34. Chen J, Zhao HB (2014) The role of an inwardly rectifying K(+) channel (Kir4.1) in the inner ear and hearing loss. *Neuroscience* 265:137–146. doi:[10.1016/j.neuroscience.2014.01.036](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.01.036)
35. Wangemann P (2006) Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol* 576(Pt 1):11–21. doi:[10.1113/jphysiol.2006.112888](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.112888)
36. Ohlemiller KK (2008) Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury. *Hear Res* 245(1–2):5–17. doi:[10.1016/j.heares.2008.08.007](https://doi.org/10.1016/j.heares.2008.08.007)
37. Wang Y, Hirose K, Liberman MC (2002) Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 3(3):248–268. doi:[10.1007/s101620020028](https://doi.org/10.1007/s101620020028)
38. Patuzzi R (2011) Ion flow in stria vascularis and the production and regulation of cochlear endolymph and the endolymphatic potential. *Hear Res* 277(1–2):4–19. doi:[10.1016/j.heares.2011.01.010](https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.01.010)
39. Wojnowski L, Stancato LF, Zimmer AM, Hahn H, Beck TW, Larner AC, Rapp UR, Zimmer A (1998) Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech Dev* 76(1–2):141–149
40. Kamata T, Pritchard CA, Leavitt AD (2004) Raf-1 is not required for megakaryocytopoiesis or TPO-induced ERK phosphorylation. *Blood* 103(7):2568–2570. doi:[10.1182/blood-2003-06-1803](https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1803)
41. Huser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, Sun XM, Brown J, Marais R, Pritchard C (2001) MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J* 20(8):1940–1951. doi:[10.1093/emboj/20.8.1940](https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.1940)
42. Polzien L, Benz R, Rapp UR (2010) Can BAD pores be good? New insights from examining BAD as a target of RAF kinases.

- Adv Enzyme Regul 50(1):147–159. doi:[10.1016/j.advenzreg.2009.10.025](https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2009.10.025)
43. Cediél R, Riquelme R, Contreras J, Diaz A, Varela-Nieto I (2006) Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: a new model of human deafness. *Eur J Neurosci* 23(2):587–590. doi:[10.1111/j.1460-9568.2005.04584.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04584.x)
 44. Riquelme R, Cediél R, Contreras J, la Rosa Lourdes RD, Murillo-Cuesta S, Hernandez-Sanchez C, Zubeldia JM, Cerdan S, Varela-Nieto I (2010) A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor I deficient mice. *Front Neuroanat* 4:27. doi:[10.3389/fnana.2010.00027](https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00027)
 45. Sanz L, Murillo-Cuesta S, Cobo P, Cediél-Algovia R, Contreras J, Rivera T, Varela-Nieto I, Avendaño C (2015) Swept-sine noise-induced damage as a hearing loss model for preclinical assays. *Front Aging Neurosci* 7:7. doi:[10.3389/fnagi.2015.00007](https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00007)
 46. Hardisty-Hughes RE, Parker A, Brown SD (2010) A hearing and vestibular phenotyping pipeline to identify mouse mutants with hearing impairment. *Nat Protoc* 5(1):177–190. doi:[10.1038/nprot.2009.204](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.204)
 47. Munoz-Espin D, Canamero M, Maraver A, Gomez-Lopez G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodriguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155(5):1104–1118. doi:[10.1016/j.cell.2013.10.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019)
 48. Murillo-Cuesta S, Camarero G, Gonzalez-Rodriguez A, De La Rosa LR, Burks DJ, Avendano C, Valverde AM, Varela-Nieto I (2012) Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function. *Mol Med* 18:260–269. doi:[10.2119/molmed.2011.00328](https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00328)
 49. Camarero G, Avendano C, Fernandez-Moreno C, Villar A, Contreras J, de Pablo F, Pichel JG, Varela-Nieto I (2001) Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci* 21(19):7630–7641
 50. Okano T, Xuan S, Kelley MW (2011) Insulin-like growth factor signaling regulates the timing of sensory cell differentiation in the mouse cochlea. *J Neurosci* 31(49):18104–18118. doi:[10.1523/JNEUROSCI.3619-11.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3619-11.2011)
 51. Rodriguez-de la Rosa L, Lopez-Herradon A, Portal-Nunez S, Murillo-Cuesta S, Lozano D, Cediél R, Varela-Nieto I, Esbrit P (2014) Treatment with N- and C-terminal peptides of parathyroid hormone-related protein partly compensate the skeletal abnormalities in IGF-I deficient mice. *PLoS One* 9(2):e87536. doi:[10.1371/journal.pone.0087536](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087536)
 52. Sanchez-Calderon H, Rodriguez-de la Rosa L, Milo M, Pichel JG, Holley M, Varela-Nieto I (2010) RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One* 5(1):e8699. doi:[10.1371/journal.pone.0008699](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008699)
 53. Hayashi Y, Yamamoto N, Nakagawa T, Ito J (2014) Insulin-like growth factor 1 induces the transcription of Gap43 and Ntn1 during hair cell protection in the neonatal murine cochlea. *Neurosci Lett* 560:7–11. doi:[10.1016/j.neulet.2013.11.062](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.11.062)
 54. Pauley S, Lai E, Fritzsche B (2006) Foxg1 is required for morphogenesis and histogenesis of the mammalian inner ear. *Dev Dyn* 235(9):2470–2482. doi:[10.1002/dvdy.20839](https://doi.org/10.1002/dvdy.20839)
 55. Neves J, Kamaid A, Alsina B, Giraldez F (2007) Differential expression of Sox2 and Sox3 in neuronal and sensory progenitors of the developing inner ear of the chick. *J Comp Neurol* 503(4):487–500. doi:[10.1002/cne.21299](https://doi.org/10.1002/cne.21299)
 56. Nishiwaki A, Asai K, Tada T, Ueda T, Shimada S, Ogura Y, Kato T (2001) Expression of glia maturation factor during retinal development in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 95(1–2):103–109
 57. Dastidar SG, Landrieu PM, D’Mello SR (2011) FoxG1 promotes the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* 31(2):402–413. doi:[10.1523/JNEUROSCI.2897-10.2011](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2897-10.2011)
 58. Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, Zimmer A (1997) Endothelial apoptosis in Raf-deficient mice. *Nat Genet* 16(3):293–297. doi:[10.1038/ng0797-293](https://doi.org/10.1038/ng0797-293)
 59. O’Neill E, Rushworth L, Baccarini M, Kolch W (2004) Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 306(5705):2267–2270. doi:[10.1126/science.1103233](https://doi.org/10.1126/science.1103233)
 60. Lin Q, Li W, Chen Y, Sun S, Li H (2013) Disrupting Rb-Raf-1 interaction inhibits hair cell regeneration in zebrafish lateral line neuromasts. *Neuroreport* 24(4):190–195. doi:[10.1097/WNR.0b013e32835e3279](https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32835e3279)
 61. Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schwenker M (2002) Regulation of Raf-Akt cross-talk. *J Biol Chem* 277(34):31099–31106. doi:[10.1074/jbc.M111974200](https://doi.org/10.1074/jbc.M111974200)
 62. Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Hausler MG, Grimmer J, Tobe SW, Farhi A, Nelson-Williams C, Lifton RP (2009) Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(14):5842–5847. doi:[10.1073/pnas.0901749106](https://doi.org/10.1073/pnas.0901749106)
 63. Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P (2002) KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(2):C403–C407. doi:[10.1152/ajpcell.00312.2001](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00312.2001)
 64. Mrowiec T, Schwappach B (2006) 14–3–3 proteins in membrane protein transport. *Biol Chem* 387(9):1227–1236. doi:[10.1515/BC.2006.152](https://doi.org/10.1515/BC.2006.152)
 65. Czirjak G, Vuity D, Enyedi P (2008) Phosphorylation-dependent binding of 14–3–3 proteins controls TRESK regulation. *J Biol Chem* 283(23):15672–15680. doi:[10.1074/jbc.M800712200](https://doi.org/10.1074/jbc.M800712200)
 66. Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, Leung T, Baccarini M (2005) Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* 168(6):955–964. doi:[10.1083/jcb.200409162](https://doi.org/10.1083/jcb.200409162)
 67. Yotova I, Quan P, Gaba A, Leditznig N, Pateisky P, Kurz C, Tschugguel W (2012) Raf-1 levels determine the migration rate of primary endometrial stromal cells of patients with endometriosis. *J Cell Mol Med* 16(9):2127–2139. doi:[10.1111/j.1582-4934.2011.01520.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01520.x)
 68. Neng L, Zhang F, Kachelmeier A, Shi X (2013) Endothelial cell, pericyte, and perivascular resident macrophage-type melanocyte interactions regulate cochlear intrastrial fluid-blood barrier permeability. *J Assoc Res Otolaryngol* 14(2):175–185. doi:[10.1007/s10162-012-0365-9](https://doi.org/10.1007/s10162-012-0365-9)
 69. Iwasaki S, Mizuta K, Gao J, Wu R, Hoshino T (1997) Focal microcirculation disorder induced by photochemical reaction in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 108(1–2):55–64
 70. Wimmer R, Cseh B, Maier B, Scherrer K, Baccarini M (2012) Angiogenic sprouting requires the fine tuning of endothelial cell cohesion by the Raf-1/Rok-alpha complex. *Dev Cell* 22(1):158–171. doi:[10.1016/j.devcel.2011.11.012](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.012)
 71. Hu BH, Zheng GL (2008) Membrane disruption: an early event of hair cell apoptosis induced by exposure to intense noise. *Brain Res* 1239:107–118. doi:[10.1016/j.brainres.2008.08.043](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.08.043)
 72. Op de Beeck K, Schacht J, Van Camp G (2011) Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hear Res* 281(1–2):18–27. doi:[10.1016/j.heares.2011.07.002](https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.07.002)
 73. Chen GD, Fechter LD (2003) The relationship between noise-induced hearing loss and hair cell loss in rats. *Hear Res* 177(1–2):81–90
 74. Bielefeld EC, Hangauer D, Henderson D (2011) Protection from impulse noise-induced hearing loss with novel Src-protein tyrosine kinase inhibitors. *Neurosci Res* 71(4):348–354. doi:[10.1016/j.neures.2011.07.1836](https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.07.1836)

75. Harris KC, Hu B, Hangauer D, Henderson D (2005) Prevention of noise-induced hearing loss with Src-PTK inhibitors. *Hear Res* 208(1–2):14–25. doi:[10.1016/j.heares.2005.04.009](https://doi.org/10.1016/j.heares.2005.04.009)
76. Gratton MA, Eleftheriadou A, Garcia J, Verduzco E, Martin GK, Lonsbury-Martin BL, Vazquez AE (2011) Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing in their susceptibility to noise damage. *Hear Res* 277(1–2):211–226. doi:[10.1016/j.heares.2010.12.014](https://doi.org/10.1016/j.heares.2010.12.014)
77. Lahne M, Gale JE (2008) Damage-induced activation of ERK1/2 in cochlear supporting cells is a hair cell death-promoting signal that depends on extracellular ATP and calcium. *J Neurosci* 28(19):4918–4928. doi:[10.1523/JNEUROSCI.4914-07.2008](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4914-07.2008)
78. Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, Meissl K, Plyushch T, Chen AP, Silva A, Baccarini M (2006) Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(5):1325–1330. doi:[10.1073/pnas.0507399103](https://doi.org/10.1073/pnas.0507399103)

8.2. ANEXO II

Age-regulated function of autophagy in the mouse inner ear.

De Iriarte Rodríguez R, Pulido S, Rodríguez-de la Rosa L, Magariños M, Varela-Nieto I.

Hear Res. 2015 Dec;330(Pt A):39-50. doi: 10.1016/j.heares.2015.07.020. Epub 2015 Jul 31.



Age-regulated function of autophagy in the mouse inner ear



Rocío de Iriarte Rodríguez^{a, b, 1}, Sara Pulido^{a, 1}, Lourdes Rodríguez-de la Rosa^{a, b, c},
Marta Magariños^{a, b, d, *, 2}, Isabel Varela-Nieto^{a, b, c, 2}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, Madrid, Spain

^b CIBERER, Unit 761, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c IdiPAZ, Instituto de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain

^d Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 March 2015

Received in revised form

22 July 2015

Accepted 29 July 2015

Available online 31 July 2015

Keywords:

Ageing

ATG

Becn1

Cochlea

IGF1R

Otic development

Vestibule

ABSTRACT

Autophagy is a highly conserved catabolic process essential for embryonic development and adult homeostasis. The autophagic machinery supplies energy by recycling intracellular components and facilitates the removal of apoptotic cells. In the inner ear, autophagy has been reported to play roles during early development in the chicken embryo and in the response to otic injury in the adult mouse. However, there are no studies on the expression of the autophagy machinery in the postnatal and adult inner ear. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is one of the factors that regulate both otic development and cochlear postnatal maturation and function. Here, we hypothesised that autophagy could be one of the processes involved in the cochlear development and functional maturation.

We report that autophagy-related genes (ATG) *Becn1*, *Atg4g* and *Atg5* are expressed in the mouse cochlea, vestibular system and brainstem cochlear nuclei from late developmental stages to adulthood. *Atg9* was studied in the mouse cochlea and showed a similar pattern. The presence of autophagic flux was confirmed by decreased sequestosome 1 (SQSTM1/p62) and increased relative levels of microtubule-associated protein light chain 3-II (LC3-II). Inner ear autophagy flux is developmentally regulated and is lower at perinatal stages than in the adult mouse, where an expression plateau is reached at the age of two-months, coinciding with the age at which full functional activity is reached. Expression is maintained in adult mice and declines after the age of twelve months. LC3B labelling showed that autophagy was primarily associated with spiral ganglion neurons. Over time, *Igf1* wild type mice showed lower expression of genes coding for IGF-1 high affinity receptor and the family factor IGF-2 than null mice. Parallel analysis of autophagy machinery gene expression showed no significant differences between the genotypes over the lifespan of the null mice. Taken together, these results show that the autophagy machinery expression in the inner ear is regulated with age but is not compromised by the chronic absence of IGF-1. Our data also strongly support that the up-regulation of autophagy machinery genes is concomitant with the functional maturation of the inner ear.

This article is part of a Special Issue entitled <IEB Kyoto>.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations: ATG, autophagy-related gene; Cox2, cyclooxygenase 2; IGF-1, insulin-like growth factor 1; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; PI3KC, phosphatidylinositol 3-kinase; PPLR, Probability of Positive Log Ratio; SQSTM1/p62, sequestosome 1; TLR, toll-like receptor

* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM), Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain.

E-mail address: mmagariños@iib.uam.es (Marta Magariños).

¹ Equal contribution.

² Equal senior contribution.

1. Introduction

Autophagy is a highly conserved lysosomal degradation pathway in eukaryotes that is responsible for providing metabolic energy, recycling intracellular components and eliminating deleterious molecules and organelles. Autophagy protects cells from several regular and pathological stresses and it plays a fundamental role during development and in the maintenance of adult cellular homeostasis. Accordingly, autophagy dysfunction is associated with ageing, neurodegenerative diseases and in tumour suppression (Lopez-Otin et al., 2013; Schneider and Cuervo, 2014).

There are three types of autophagy: chaperone-mediated autophagy, microautophagy and macroautophagy, the latter of which is the subtype studied here and henceforth called autophagy (Aburto et al., 2012a). Autophagy is generally considered non-specific, but it may also be a selective process for degrading damaged or unnecessary organelles, molecules and pathogens (Reggiori and Ungermann, 2012). Autophagy is triggered by different inductive signals that initiate formation of the phagophore. This consists of a double lipid membrane that initially engulfs cytoplasmic proteins or organelles. Later it expands and encloses the cytoplasmic cargo to form the autophagosome and finally, it fuses with the lysosome, leading to cargo degradation by hydrolytic enzymes. Nucleotides, amino acids and fatty acids are products from this catabolic process, which are returned through permeases to the cytosol to be reused in the synthesis of macromolecules and in ATP generation (Hurley and Schulman, 2014). Several stages can be identified in the process: induction, nucleation or assembly, elongation and autophagosome completion. Each stage has been associated with the induction of a specific subset of *Atg*, which is evolutionarily conserved from yeast to humans (Klionsky et al., 2003). The Beclin1 and ULK1/2 complex plays a part in the induction of the autophagosome where ULK1 activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KC). The ATG9 cycling system transports membranes from several donor sources and is essential for autophagosome formation (Aburto et al., 2012a). ATG9 has been reported to be transcriptionally regulated in numerous contexts (Jin et al., 2014). Two ubiquitin-like conjugation systems, ATG12 and ATG8, are involved in elongation of the autophagosome membrane. The ATG12 complex is composed of ATG5, ATG7, ATG10, ATG12 and ATG16L1 proteins, while ATG8 is made up of ATG3, ATG4A/B/C/D, ATG7 and LC3A/B/B2/C, as well as GABARAP/11/12/GATE-16 (Le Grand et al., 2011). Both complexes regulate LC3, the mammalian *Atg8* homolog. The ATG4B protease is responsible for breaking down the LC3 C-terminal residue, generating the cytosolic form, LC3-I. Due to the action of ATG7, ATG3 and ATG16L1, LC3-I is conjugated to phosphatidylethanolamine to generate LC3-II that remains bound to the autophagosomal membrane (Feng et al., 2014a). The relative levels of LC3-II combined with the lysosomal degradation of autophagic substrates are readouts of autophagic flux. The SQSTM1/p62 protein binds to LC3-I and to ubiquitinated protein aggregates and facilitates their entry into the autophagosome. Therefore, degradation of SQSTM1/p62 is dependent on autophagy and its levels are negatively correlated with those of LC3-II (Bjorkoy et al., 2006, 2009; Klionsky et al., 2008).

During embryonic development, autophagy is a key dynamic catabolic process highly regulated by hormonal and environmental signals. Developmental autophagy provides energy to neonates and promotes remodelling of different cells and tissues (Aburto et al., 2012a), the developing nervous system being one of them (Fimia et al., 2007). Autophagy induction has been reported to resolve inflammation, to ameliorate ageing and to protect from neurodegeneration (Menardo et al., 2012; Nixon, 2013; Rubinsztein et al., 2011). Autophagy has an essential role in adult neurons, where it contributes to homeostasis by removing harmful protein aggregates and damaged organelles. Thus adult neurons exhibit high basal rates of autophagy that are further up-regulated upon neurodegeneration (Son et al., 2012). This cytoprotective role is so important that autophagy has been proposed as an essential process for the determination of mammalian lifespan (Lopez-Otin et al., 2013).

The adult inner ear is responsible for the detection of sound in the cochlea and for the sense of equilibrium in the vestibule (Magarinos, 2014; Magarinos et al., 2012). Both have a common

developmental origin in the otic placode, an ectodermal structure that closes up to form the otic vesicle from which most cells of the adult inner ear are formed (Magarinos et al., 2012; Sanchez-Calderon et al., 2007). This includes the auditory spiral neurons that connect the sensory hair cells at the organ of Corti with the central auditory pathway whose first relay station is the cochlear nucleus complex (Magarinos et al., 2012). A number of earlier reports have shown the presence of autophagy in the inner ear of several species. Thus, *Atg4b*^{-/-} null mice show aberrant equilibrium due to a defect in the development of the vestibular otoconia (Marino et al., 2010). Autophagy is also involved in neurogenesis of the chicken vestibular and auditory spiral ganglion (Aburto et al., 2012b) which requires the proliferation and differentiation of otic progenitors as well as apoptosis (Aburto et al., 2012b; Magarinos et al., 2010). Autophagy provides energy for the removal of apoptotic cells. Moreover, autophagic morphological features are present in adult hair cells exposed to ototoxic insults (Taylor and Kirkegaard, 2008).

IGF-1 is a trophic factor for the developing and adult nervous system that belongs to the insulin family. Mutations in its coding gene, *IGF1*, cause human syndromic deafness (Murillo-Cuesta et al., 2011). *Igf1*^{-/-} null mice also show sensorineural hearing loss primarily caused by failure in late differentiation concomitant with increased apoptosis of mouse spiral neurons (Camarero et al., 2002, 2001; Sanchez-Calderon et al., 2010). Several studies have linked IGF-1 with autophagy although, depending on the cellular context, it shows distinct actions. IGF-1 decreases autophagy in mammary epithelial cells through activation of mTOR (Sobolewska et al., 2009). On the other hand, in cultures of Purkinje neurons, IGF-1 promotes autophagy by inducing fusion of autophagosomes with lysosomes (Bains et al., 2009). Correspondingly, inhibition of downstream insulin signalling and IGF-1 receptors decreases the number of autophagosomes both in cell cultures and *in vivo* (Renna et al., 2013). This reduction is caused by endocytosis defects, a process involved in providing membrane substrate to form autophagosomal precursors (Renna et al., 2013).

In this work, we show that autophagy machinery expression is regulated in the inner ear from late embryonic E18.5 developmental stages to nine month-old adult mice. Unexpectedly, at the ages studied, there were no striking differences between cochlear expression of ATGs in wild type and null *Igf1*^{-/-} mice. Autophagic flux reaches a plateau in cochlea at the age of two months, coinciding with mouse functional maturity, when autophagic proteins are abundantly present in the neurons of the spiral ganglia.

2. Materials and methods

2.1. Mouse handling and genotyping

Heterozygous mice with targeted disruption of the *Igf1* gene were bred and maintained on a hybrid MF1 and 129/sv mouse genetic background to increase *Igf1*^{-/-} mutant survival (Liu et al., 1993). Postnatal survival of null mice varied between 10 and 20%, less than a 5% survived to one year (Riquelme et al., 2010). No differences between male and female mice were observed and both were used in this study. Concretely, male wild type and null mice numbers were: 5 and 8 of P30–60, 5 and 3 of P90, 3 and 1 of P150, 7 and 8 of P270, and 3 and 1 of P365, respectively. Female wild type and null mice used in this study were: 8 and 6 of P30–60, 2 and 1 of P90, 1 and 2 of P150, 8 and 7 of P270, and 0 and 3 of P365, respectively.

Mice genotypes were determined as described (Sanchez-Calderon et al., 2010). Animal care procedures and use were

approved by the Bioethics Committee of the CSIC. Experimental procedures were conducted in accordance with European Union (2010/63/EU) and Spanish R&D (53/2013) legislations.

2.2. Transcriptome analysis of the cochlea by GeneChip arrays

Cochleae from E18.5 *Igf1*^{+/+} and *Igf1*^{-/-} mice were dissected and RNA isolated from two mice was pooled. The cochlear expression profile was analysed in triplicate using GeneChip® Mouse Genome 430A2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) as described previously (Sanchez-Calderon et al., 2010). Results were submitted to the public functional genomics data repository GEO (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with accession number GSE11821. The free software package PUMA (<http://www.bioconductor.org>) was used to estimate gene expression levels of GeneChip array data. Gene expression was further analysed by a combination of fold change (FC) and PPLR (Probability of Positive Log Ratio) methods.

2.3. Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using RNeasy (Qiagen) from frozen cochleae, vestibule and brain homogenates. When indicated, cochlear nuclei were dissected and used to isolate RNA. Their integrity and concentration were assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). 3–6 mice from each genotype of the following ages were used: embryonic day E18.5 and postnatal days P30–60, P150, P270 and P365. cDNA was then generated by reverse transcription (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems) and gene expression was analysed in triplicate samples by qPCR using TaqMan® Gene Expression Assay kits (Applied Biosystems). The following probes (Life Technologies) were used: *Atg4b* (Mm01701111_m1), *Atg5* (Mm00504340_m1), *Atg9a* (Mm01264420_m1), *Becn1* (Mm01265461_m1), *Cox2* (Mm03294838_g1), *Igf1r* (Mm00802831_m1), *Igf2* (Mm00439564_m1) and *Ins2* (Mm00731595_gH). PCR was performed on an Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System using eukaryotic 18S and *Rplp0* rRNA as the endogenous housekeeping genes with the same results. Relative quantification values were calculated using the 2^{-ΔΔCt} method and the data were expressed as mean log₁₀RQ values (Rodriguez-de la Rosa et al., 2014).

2.4. Protein extraction and Western blotting

Proteins from E18.5, P30–60 and P270 frozen cochleae, vestibule and brain homogenates from 3 to 6 mice/experimental group were extracted using a Ready Protein Extraction Kit (BioRad) as reported (de Iriarte Rodríguez et al., 2015). Each tissue was lysed in 100–250 μl extraction buffer containing 0.01% protease- and phosphatase-inhibitor cocktails and 0.01% TBP (Sigma Aldrich). Protein concentration was determined using the RC DC Protein Assay kit (BioRad) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. Equal amounts of proteins were subjected to gel electrophoresis (10% kD Mini-PROTEAN-TGX, BioRad) and transferred to PVDF membranes (0.2-μm, BioRad) using a Bio-Rad Trans Blot TURBO apparatus. After incubation with a blocking solution, the membranes were probed overnight (4 °C) with primary antibodies (anti β-actin, 1:5000, Sigma/A5441; anti LC3, 1:1000, MBL/PD014; and, anti SQSTM1/p62, 1:1000, MBL/PM045). Membranes were then incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h (RT), and the bands were visualized using Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad/170–5060). Blot images were captured using

an ImageQuant LAS4000 mini digital camera (GE Healthcare Bio-Sciences), and densities of the immunoreactive bands were quantified by densitometry using ImageQuant TL software (GE Healthcare Bio-Sciences). Different exposure times were used to ensure that bands were not saturated.

2.5. Histology and immunohistochemistry

E18.5 and P30–90 cochleae were dissected and fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS (4 °C), decalcified in 0.3 M EDTA (pH 6.5) for 8 days and embedded in gelatin. Cryosections (10 μm) were incubated with the primary antibody (anti-LC3B, 1:100, Cell Signalling/2775; anti-Sox2, 1:50, Santa Cruz/sc-17320) overnight (4 °C) and then with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody (Donkey-anti-rabbit IgG (AF488), 1:300, Life Technologies/A21206; Donkey-anti-goat IgG (AF546), 1:300, Life Technologies/A11056) for 2 h (RT). Sections were mounted in Prolong Gold containing DAPI (Invitrogen/P36931) and visualized using a fluorescence microscope (Nikon 90i) and confocal microscope (LSM710 Zeiss). LC3B immunofluorescence intensity in the spiral ganglion was determined in 4–12 equivalent sections prepared from at least 3 mice of each genotype and age. Quantifications were performed in a region of interest (ROI) in each cochlea from base to apex using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). All figures were assembled using Adobe Photoshop CS4.

2.6. Statistical analysis

In order to compare gene expression in the organs, time points and genotypes were studied using a three-way Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) and followed up with pairwise Student's t-tests to isolate the significant effects of individual levels. Multiple comparison post hoc analyses included the Bonferroni test when equal variances were assumed to exist. All statistical analyses were performed using SPSS v19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were expressed as mean values ± SEM. Results were considered significant at *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Autophagy gene transcripts are expressed in the E18.5 mouse cochlea

Autophagy gene expression in E18.5 cochlea was studied in *Igf1*^{+/+} and *Igf1*^{-/-} mice using RNA arrays as reported [GEO number: GSE11821; (Sanchez-Calderon et al., 2010); Table 1]. Genes involved in autophagic processes were selected and categorized using previously published data (Chen and Klionsky, 2011; Feng et al., 2014b; Gordy and He, 2012; Klionsky, 2005; Mizushima, 2007; Rubinstein and Kimchi, 2012). Most genes showed no expression differences among genotypes (Table 1A and B), but *Ndp52*, *Tlr1* and *Tlr6* transcripts did. *Ndp52* is decreased in the cochlea of *Igf1*^{-/-} deficient mouse and it plays an important role in immunity by modulating autophagy. NDP52 is an autophagy receptor for ubiquitin-coated pathogens with the ability to bind LC3 and ubiquitylated cargo simultaneously (Kraft et al., 2010; Thurston et al., 2009). *Tlr1* and *Tlr6* are members of the toll-like receptor (TLR) family that have a key role in the innate immune system (Shi and Kehrl, 2008; Yordy et al., 2013). RNA array data showed increased *Tlr1* and decreased *Tlr6* expression in the *Igf1*^{-/-} mouse cochlea when compared to wild type ones, whereas expression of other members of the TLR family was unmodified. Activation of TLR1 through MydD88, along with other members of the TLR family

Table 1
Comparative expression levels of autophagy genes in the cochlea of E18.5 *Igf1*^{+/+} and *Igf1*^{-/-} mice.

Gene symbol	Gene	<i>Igf1</i> ^{+/+} expression	<i>Igf1</i> ^{-/-} expression	Fold change
A. Genes of the autophagy machinery				
Genes involved in autophagosome formation				
<i>Atg12</i>	Autophagy-related 12 (yeast)	5.41	5.36	-0.053
<i>Atg16l1</i>	Autophagy-related 16-like 1 (yeast)	7.44	7.44	-0.002
<i>Atg4b</i>	Autophagy-related 4B (yeast)	7.09	7.09	-0.001
<i>Atg4d</i>	Autophagy-related 4D (yeast)	5.42	5.39	-0.023
<i>Atg5</i>	Autophagy-related 5 (yeast)	6.79	6.79	-0.001
<i>Becn1</i>	Beclin 1	7.16	7.16	0.006
<i>Gabarap</i>	Gaba receptor associated protein	10.95	10.95	-0.003
<i>Gabarapl1</i>	Gaba receptor-associated protein-like 1	8.46	8.45	-0.004
<i>Gabarapl2</i>	Gaba receptor-associated protein-like 2	8.25	8.24	-0.016
<i>Map1lc3a</i>	Microtubule-associated protein 1lc3a	9.81	9.81	-0.001
<i>Rgs19</i>	Regulator of G-protein signalling 19	7.20	7.10	-0.104
<i>Ulk1</i>	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)	6.28	6.22	-0.057
Genes responsible for autophagic transport				
<i>Atg10</i>	Autophagy-related 10 (yeast)	6.19	6.19	-0.006
<i>Atg16l1</i>	Autophagy-related 16-like 1 (yeast)	7.44	7.44	-0.002
<i>Atg3</i>	Autophagy-related 3 (yeast)	4.54	4.49	-0.051
<i>Atg4b</i>	Autophagy-related 4B (yeast)	7.09	7.09	-0.001
<i>Atg4d</i>	Autophagy-related 4D (yeast)	5.42	5.39	-0.023
<i>Atg7</i>	Autophagy-related 7 (yeast)	4.39	4.41	0.027
<i>Gabarap</i>	Gaba receptor associated protein	10.95	10.95	-0.003
<i>Gabarapl2</i>	Gaba receptor-associated protein-like 2	8.25	8.24	-0.016
<i>Rab24</i>	RAB24, member RAS oncogene family	7.65	7.54	-0.109
Genes responsible for autophagosome-lysosome/vacuole fusion				
<i>Gabarap</i>	Gaba receptor associated protein	10.95	10.95	-0.003
<i>Lamp1</i>	Lysosomal membrane glycoprotein 1	10.51	10.51	-0.003
<i>Npc1</i>	Niemann Pick type C1	7.70	7.70	-0.005
Genes involved in autophagy and ubiquitination				
<i>Bag3</i>	Bcl2-associated athanogene 3	7.35	7.12	-0.233
<i>Atg7</i>	Autophagy-related 7 (yeast)	4.39	4.41	0.027
<i>Foxo3</i>	Forkhead box O3	7.57	7.56	-0.004
<i>Hdac6</i>	Histone deacetylase 6	8.01	8.01	0.006
<i>Nbr1</i>	Neighbour of Brca1 gene 1	8.55	8.35	-0.204
<i>Ndp52</i>	Nuclear domain 10 protein 52	3.21	2.11	-1.099
Genes with protease activity				
<i>Atg4b</i>	Autophagy-related 4B (yeast)	7.09	7.09	-0.001
<i>Atg4d</i>	Autophagy-related 4D (yeast)	5.42	5.39	-0.023
B. Genes of the autophagy regulatory network				
Regulatory genes in autophagy and apoptosis				
<i>Atg12</i>	Autophagy-related 12 (yeast)	5.41	5.36	-0.053
<i>Atg5</i>	Autophagy-related 5 (yeast)	6.79	6.79	-0.001
<i>Bad</i>	Bcl-associated death promoter	7.02	7.03	0.010
<i>Bak1</i>	Bcl2-antagonist/killer 1	3.43	3.42	-0.010
<i>Bax</i>	Bcl2-associated X protein	8.09	8.08	-0.004
<i>Bcl2</i>	B-cell leukemia/lymphoma 2	5.06	5.02	-0.033
<i>Becn1</i>	Beclin 1	7.16	7.16	0.006
<i>Bid</i>	BH3 interacting domain death agonist	4.87	4.87	0.004
<i>Casp3</i>	Caspase 3	7.73	7.68	-0.041
<i>Casp8</i>	Caspase 8	7.12	6.89	-0.227
<i>Ctsb</i>	Cathepsin B	8.48	8.45	-0.031
<i>Dapk1</i>	Death associated protein kinase 1	7.79	7.79	-0.005
<i>Fadd</i>	Fas TNFRSF6-associated via death domain	6.11	6.05	-0.059
<i>Mapk8</i>	Mitogen activated protein kinase 8	6.74	6.73	-0.007
<i>Pik3c3</i>	Phosphoinositide-3-kinase, class 3. Vps34	6.80	6.80	0.008
<i>Pik3cg</i>	Phosphoinositide-3-k catalytic γ polypeptide	3.48	3.37	-0.111
<i>Sqstm1</i>	Sequestosome 1	9.67	9.67	-0.002
<i>Uvrag</i>	UV radiation resistance associated gene	7.70	7.48	-0.219
Regulatory genes in autophagy and cell cycle				
<i>Cdkn1b</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27)	5.70	5.73	0.030
<i>Cdkn2a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	3.74	3.56	-0.175
<i>Eif4ebp1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4Ebp1	7.04	7.04	0.006
<i>Eif2ak4</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2ak4	6.05	6.32	0.278
<i>Ulk1</i>	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)	6.28	6.22	-0.057
Autophagy regulatory genes in other cellular networks				
<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	9.95	9.95	-0.001
<i>Ctss</i>	Cathepsin S	7.71	7.71	0.000
<i>Mapk14</i>	Mitogen activated protein kinase 14	5.26	5.13	-0.131
<i>Pik3r4</i>	Pik3 regulatory subunit polypeptide 4. Vps15	7.53	7.52	-0.007
<i>Rps6kb1</i>	Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1	6.08	6.05	-0.028
<i>Tlr1</i>	Toll-like receptor 1	1.42	3.04	1.615
<i>Tlr6</i>	Toll-like receptor 6	3.49	1.17	-2.314
Autophagy induction by intracellular pathogens				
<i>Eif2ak3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2ak3	7.29	7.21	-0.082

Table 1 (continued)

Gene symbol	Gene	<i>Igf1</i> ^{+/+} expression	<i>Igf1</i> ^{-/-} expression	Fold change
<i>Irfng</i>	Interferon gamma	0.48	0.49	0.005
<i>Lamp1</i>	Lysosomal membrane glycoprotein 1	10.51	10.51	-0.003

The cochlear transcriptomes of both genotypes were studied using GeneChip[®] Mouse Genome 430A2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA), a whole mouse genome expression array with a coverage of over 39,000 transcripts. Autophagy genes were identified and classified according to their biological function in A) Autophagy machinery genes and B) Regulation of autophagy genes. A probabilistic framework method (PPLR), which reduces the number of false positives in the estimation of differentially expressed genes, was used to calculate expression levels of selected genes which are shown as fold change (FC; *Igf1*^{-/-} minus *Igf1*^{+/+} expression levels) as reported (Sanchez-Calderon et al., 2010).

including TLR6, activates autophagy in macrophages (Shi and Kehrl, 2008).

3.2. Lifelong expression of autophagy and IGF system genes in the *Igf1*^{-/-} mouse cochlea

Next we studied the time course of the expression of the key autophagy genes *Atg4b*, *Atg5*, *Atg9a* and *Becn1* (Fig. 1A) from E18.5 to P0, P30–60, P270 and P365 ages in cochleae (Fig. 1B). qRT-PCR confirmed RNA array data and showed that *Atg4b*, *Atg5*, *Atg9a* and *Becn1* are equally expressed in the E18.5 cochlea of both genotypes. Gene expression studies showed a similar time course in both genotypes. Interestingly, a significant increase of around 2-fold in *Becn1* and 4.5-fold in *Atg9a* transcripts was observed from the age of P30 onwards, when compared with the perinatal ages E18.5 and P0, which showed similar expression levels. *Atg4b*, *Atg5* mRNA levels followed a similar pattern in the cochlea although with lower increases (around 1.5-fold) than those observed in *Becn1* and *Atg9a* expression. Although there were no significant differences among the genotypes studied, P270 cochleae showed a greater dispersion in null mice values than those observed in wild type mice at any age (data not shown). These results suggest the presence of two subpopulations in nine-month old (P270) null mice; thus, 3/6 null mice showed increased *Atg4b*, *Atg5* and *Becn1* expression as compared to wild type mice. Dispersion preceded a significant decrease of around 0.5-fold in *Becn1*, *Atg4b*, *Atg5* in P365 cochleae. P365 null mice cochleae showed a statistically significant decrease when compared to null P270 but not with respect to P365 wild type cochleae (Fig. 1B). Thus, these data show that autophagy gene expression is regulated throughout cochlear maturation and ageing.

Temporal expression profiles of the genes coding for IGF system elements, *Igf1r*, *Igf2* and *Ins2*, and inflammation-associated cyclooxygenase 2 (*Cox2*), were studied in cochlea from E18.5, P30–60, P270 and P250 mice (Table 2). Wild type mouse cochleae showed a significant decrease over the natural life of *Igf1r* (0.79-, 0.56- and a 0.12-fold decrease between E18.5 and P30–60, P270 or P365, respectively) and lower expression levels than in adult null mouse cochleae (Table 2). *Igf2* expression remained high during development and dropped dramatically after birth in the wild type cochlea (0.07, 0.05 and 0.01-fold between E18.5 and P30–60, P270 or P365, respectively.) *Igf2* expression levels showed statistically significant differences between wild type and mutant mice at P270 (Table 2). *Ins2* was not detected at any of the time points studied.

To explore if activity-associated inflammation could be one of the stimuli triggering autophagy in the cochlea, we studied the time course of *Cox2* expression, an enzyme of the inflammatory cascade whose participation has been reported in autophagy (Ricciotti and FitzGerald, 2011). Indeed, *Cox2* transcripts showed parallel temporal profiles to those of autophagy genes. *Cox2*

expression levels showed a significant 1.5-fold increase in P0 compared to E18.5 cochlea. When both stages, E18.5 and P0, were compared to adult P30–6, P270 and P365 cochleae, 0-, 9-, 14- and 5-fold increases were observed in the adult with respect to perinatal cochleae. Statistically significant differences were observed between genotypes in P365 mice (Table 2). These data show that during cochlear maturation and ageing there is a decrease in the expression of IGF system genes that is concomitant with the increase in inflammatory mediators and autophagy gene transcripts.

3.3. Autophagy machinery genes *Becn1*, *Atg4b* and *Atg5* are expressed in the vestibule and brain of *Igf1*^{+/+} and *Igf1*^{-/-} mice

The time course of *Atg4b*, *Atg5* and *Becn1* expression was studied from E18.5, P0, P30/60 and P270 mice vestibule and brain homogenates (Fig. 2). Expression levels in cochlear nuclei were also determined at the age of P150 (Fig. 2A, striped bottom bars).

Similarly to what was found in cochlea, a significant increase in *Becn1*, *Atg4b* and *Atg5* transcripts was shown in the vestibule associated with age (Fig. 2). There were no differences among genotypes from E18.5 to P60, but the P270 *Igf1*^{-/-} mouse vestibule showed a significant increase in expression of the three genes compared to the wild type samples. These data taken together suggest that autophagy rises in the adult inner ear from P0 to nine months.

We used a homogenate of whole brain as the neural tissue of reference and no striking differences could be observed among ages or genotypes (Fig. 2). To specifically evaluate the central auditory pathway, the cochlear nuclei were dissected and gene expressions compared between P150 *Igf1*^{-/-} and *Igf1*^{+/+} mice (Fig. 2, striped bars, bottom). In this brain portion, a significant increase in *Becn1* and *Atg5* expression levels was found between null and wild type mice.

Finally, a global analysis was conducted to compare autophagy gene expression in three organs (cochlea, vestibule and brain) of two genotypes (wild type and null mice) at four ages (E18.5, P0, P30–60 and P270). *Becn1*, *Atg4b* and *Atg5* expression levels were significantly different between organs; the lowest expression levels were observed in the vestibule. The cochlea and brain showed a 1.5- and 2-fold increase with respect to the vestibular tissue, respectively. Postnatal ages P30–60 and P270 showed a significant increase of approximately 1.5-fold in gene expression when compared to the perinatal ages E18.5 and P0 in the three organs studied. No statistically significant differences between genotypes were obtained (data not shown).

3.4. Autophagic flux is modulated with age in the mouse inner ear

In addition to studying gene expression, we wanted to know if there was an increase of autophagic flux in the inner ear with age.

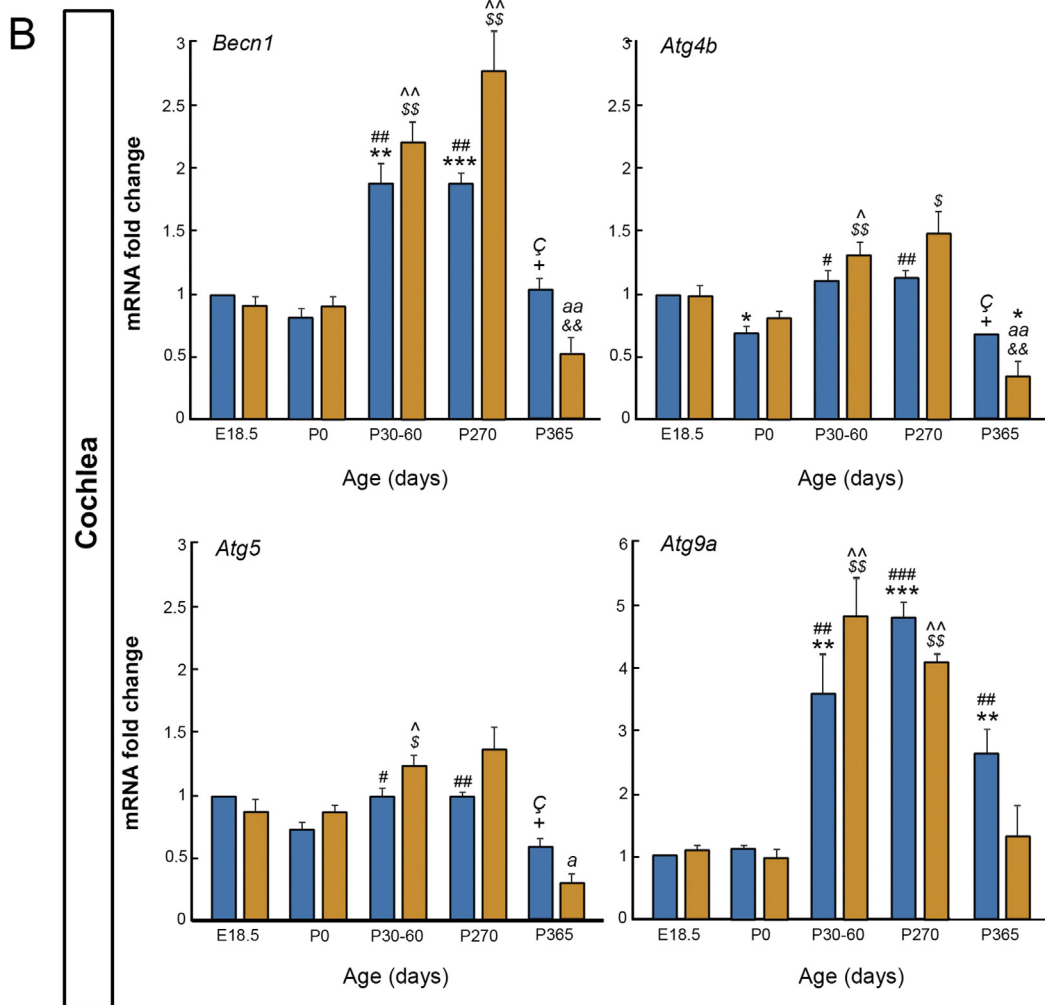
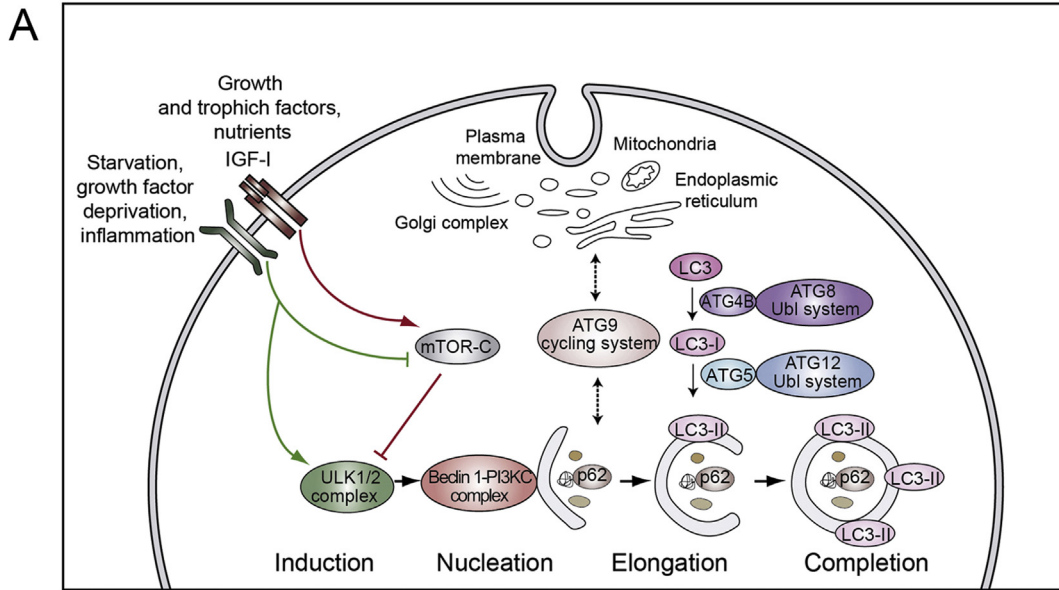


Fig. 1. Autophagy machinery genes *Becl1*, *Atg4b*, *Atg5* and *Atg9a* are expressed in the cochlea of *Igf1*^{+/+} and *Igf1*^{-/-} mice. (A) Simplified overview of the factors involved in autophagosome formation. Growth factor deprivation, inflammation or nutrient starvation regulates the activation of the ULK1/2 complex which phosphorylates and activates the PI3K complex III (PI3KC). The ATG9 cycling system provides a membrane to the developing autophagosome from different donor sources. Autophagosome formation also requires the action of two Ubiquitin-like (Ubl) systems, ATG8-Ubl and ATG12-Ubl for the elongation and completion of the autophagosome. LC3 is converted into the cytosolic form, LC3-I, by

Table 2
Time course of expression of IGF system genes and *Cox2*.

Age (days)	Gene symbol	Fold change qRT-PCR
E18.5	<i>Igf1r</i>	1.09 ± 0.09
	<i>Igf2</i>	0.62 ± 0.02
	<i>Ins2</i>	ND
P30–60	<i>Cox2</i>	0.90 ± 0.08
	<i>Igf1r</i>	2.06 ± 0.16*
	<i>Igf2</i>	2.98 ± 0.68
	<i>Ins2</i>	ND
P270	<i>Cox2</i>	1.15 ± 0.35
	<i>Igf1r</i>	2.88 ± 0.21**
	<i>Igf2</i>	2.84 ± 0.57*
	<i>Ins2</i>	ND
P365	<i>Cox2</i>	1.92 ± 0.16
	<i>Igf1r</i>	0.72 ± 0.18
	<i>Igf2</i>	0.81 ± 0.26
	<i>Ins2</i>	ND
	<i>Cox2</i>	0.47 ± 0.07*

Expression levels of *Igf1r* (insulin-like growth factor 1 high affinity receptor), *Igf2* (insulin-like growth factor 2), *Ins2* (insulin 2) and *Cox2* (cyclooxygenase 2) genes in E18.5, P30–60, P270 and P365 wild type and null mice were compared using qRT-PCR. Gene-expression values were calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Data are expressed as the fold-change (FC) ± SEM of the level in null versus wild type mice. Samples of at least three mice of each genotype were evaluated in triplicate. *P < 0.05 versus wild type and **P < 0.01 versus wild type. ND: Not detected.

To this end, the relative levels of LC3-II and of SQSTM1/p62 were compared between perinatal (E18.5) and adult (P270) ages in the cochlea, vestibule and brain (Fig. 3). LC3-II relative levels were significantly increased by 2-fold with age and concomitantly, SQSTM1/p62 protein levels decreased in the cochlea (Fig. 3A). Although the adult *Igf1*^{-/-} vestibule showed a significant increase in the LC3-II relative levels, there were no significant differences in LC3-II relative levels with age in the wild type vestibule and brain (Fig. 3B and C, respectively). SQSTM1/p62 levels showed a decrease in all the tissues tested although of different magnitudes when adult and perinatal ages were compared (Fig. 3A–C). There were no noticeable differences between genotypes at any age (Fig. 3).

3.5. Autophagy is abundant in spiral ganglion neurons

Detection of LC3B was carried out in frozen sections of E18.5–P90 cochleae from wild type and null mice (Fig. 4). LC3B (green) labelling was localized in the spiral ganglion (Fig. 4A, D, G and J, asterisks). SOX2 labelling (red) was used to visualize glial cells, confirming that LC3B positive labelling was associated with neurons. LC3B localization is typically displayed as brighter punctate labelling throughout the cytoplasm when autophagy is activated (Koike et al., 2005). Embryonic neurons showed dispersed and low intensity labelling (Fig. 4B, C, H and I). In contrast, P30–90 spiral ganglion neurons showed a bright punctate cytoplasm (Fig. 4E, F, K and L). LC3B labelling intensity quantification (Fig. 4M) confirmed its increase in adult cochlea. No significant differences were found between genotypes at any age.

4. Discussion

In this work we show that the molecular machinery of autophagy is expressed and active in the inner ear from perinatal stages to adult mice. Increased transcription of *Atg* genes has been reported during *Drosophila* development (Lee et al., 2003) and also in mice under stressful conditions (Kouroku et al., 2007; Seiliez et al., 2010). Here we show that *Becn1*, *Atg4b*, *Atg5* and *Atg9* genes are expressed in the inner ear and up-regulated from perinatal (E18.5 and P0) to adult ages (P30–60 and P270) as the postnatal inner ear gains functional maturity. Autophagy was induced in several mouse tissues immediately after birth (Kuma et al., 2004), however no significant differences were found in cochlear and vestibular expression of ATG coding genes between E18.5 and P0. On the contrary, up-regulation occurs later, from P30 onwards. Autophagy acts as a source of energy during the perinatal period and accordingly, *Atg5*, *Atg7*, *Atg9* and *Atg16* mutant mice die shortly after birth and exhibit reduced levels of amino acids in blood and adipose tissue (Kuma et al., 2004). Autophagy could be operational even without evident up-regulation of *Atg* genes (Martinet et al., 2006). Therefore, our results do not exclude a role for autophagy during early inner ear development; quite the opposite, it seems to be an important on-going process considering the wide variety of autophagy genes that are significantly expressed in the E18.5 cochlea. In fact, an even earlier expression can be envisioned as it plays fundamental roles in the chicken otic vesicle (Aburto et al., 2012b).

Our results show significant up-regulation of the autophagy machinery between P0 and P30 which suggests that it plays a role in the onset of inner ear function. Indeed the auditory receptor starts its functional maturation at P14 and completes it at P30 (Rueda et al., 1996). Furthermore, autophagy is maintained at an elevated level in young adult mice to later decrease with age as the results from one-year-old mice suggest. With age, inflammation increases, proteostasis is impaired and requirements for cell maintenance mechanisms increase (Lopez-Otin et al., 2013). In this context, increasing autophagy would contribute to maintaining adult hearing, an idea supported by the fact that otic injury also increases autophagy (Taylor and Kirkegaard, 2008). The lifespan of *Igf1* null mice is one year, during which time mice show profound hearing loss, spiral ganglion degeneration and damaged stria vascularis (Riquelme et al., 2010). General cochlear failure is concomitant with a decrease in the expression of autophagy machinery genes, which can be either a cause or a consequence of the cochlear phenotype.

Conclusions obtained from gene expression data were confirmed by analysis of autophagic proteins. Thus at P270, as compared to E18.5, cochlea and vestibule showed increased LC3-II fragment content concomitant with decreased SQSTM1/p62 levels, which together are an indicator of autophagy induction (Bjorkoy et al., 2009; Klionsky et al., 2008). SQSTM1/p62 levels significantly decreased in all tissues and genotypes studied at P270, whereas LC3-II relative levels showed a trend to increase in wild type vestibule and in brain from both genotypes. LC3-II relative levels can be easily affected by several factors (Mizushima and

cleavage of ATG4B, and into the membrane associated form, LC3-II, by conjugation with phosphoethanolamine by ATG5 (and the remaining components of the ATG12-Ubl system). SQSTM1/p62 (p62) binds to ubiquitinated proteins and conducts them to the autophagosome (Adapted from Aburto et al., 2012). (B) Wild type (blue bars) and null (orange bars) mice were used to determine cochlear expression levels of *Becn1*, *Atg4b*, *Atg5* and *Atg9a* by using qRT-PCR. 18s RNA was used as the endogenous control gene. Samples from 3 to 6 mice of each genotype were studied at the ages indicated. Data from triplicate samples were normalized to E18.5 levels and expressed as mean ± SEM of $2^{-\Delta\Delta Ct}$. The significance of differences was evaluated using Student's t-test. Data were compared to wild type mice of different ages with the following significance *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 versus E18.5, #P < 0.05, ##P < 0.01 and ###P < 0.001 versus P0, §P < 0.05 versus P30–60, +P < 0.05 versus P270. Comparison to null mice data rendered the following significance: †P < 0.05, ††P < 0.01 and †††P < 0.001 versus E18.5, §§P < 0.05, §§§P < 0.01 and §§§§P < 0.001 versus P0, ††P < 0.05 and †††P < 0.01 versus P30–60, ††††P < 0.01 versus P270. Abbreviations: E embryonic day and P postnatal day.

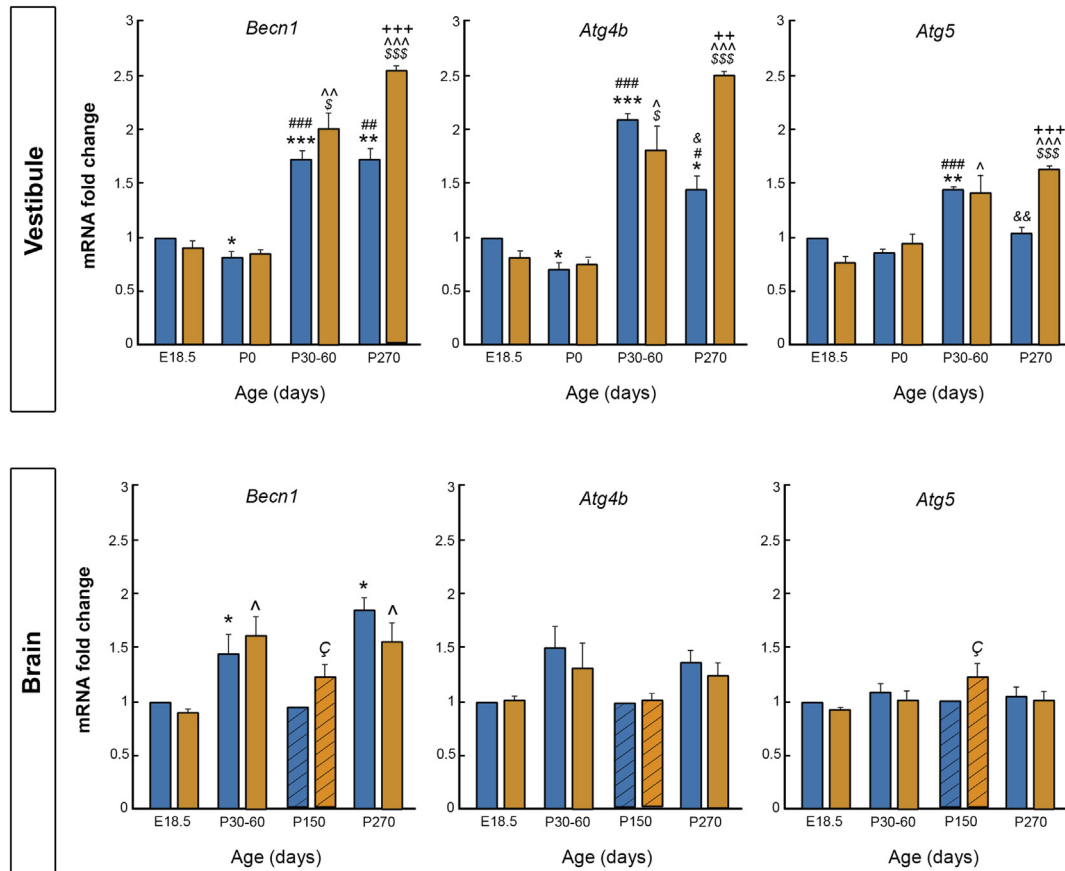


Fig. 2. Autophagy machinery genes *Becn1*, *Atg4b* and *Atg5* are expressed in the vestibule and brain of *Igf1*^{+/+} and *Igf1*^{-/-} mice. Wild type (blue bars) and null (orange bars) mice were used to determine the expression levels of *Becn1*, *Atg4b* and *Atg5* in the vestibule, homogenate brain and cochlear nuclei (striped bars) by using qRT-PCR. 18s RNA was used as the endogenous control gene. Samples from 3 to 6 mice of each genotype were studied at the ages indicated. Data from triplicate samples were normalized to E18.5 levels and expressed as mean \pm SEM of 2^{- $\Delta\Delta C_t$} . The significance of differences was evaluated using Student's t-test. Data were compared to wild type mice of different ages with the following significance *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 versus E18.5, #P < 0.05, ##P < 0.01 and ###P < 0.001 versus P0, &P < 0.05 and &&P < 0.01 versus P30–60, ^CP < 0.05 versus P150, ^TP < 0.05 and ⁺P < 0.01 versus P270. Comparison with the null mice data rendered the following significance: [^]P < 0.05, [~]P < 0.01 and ⁻⁻⁻P < 0.001 versus E18.5, ^SP < 0.05, ^{SS}P < 0.01 and ^{SSS}P < 0.001 versus P0. Abbreviations: E embryonic day and P postnatal day.

Yoshimori, 2007). In addition, increasing presence of LC3B was observed in cochlear sections by immunostaining. Positive staining for LC3B formed granular structures in the soma of spiral neurons at P30 and onward but not at E18.5, where the staining was diffuse. These results confirm the presence of autophagosomes at P30 (Koike et al., 2005).

It has been proposed that neurons show high levels of autophagy due to their reduced or absent renovation rate to reduce oxidative species, inflammation, damaged organelles and protein aggregates that would otherwise be deleterious (Damme et al., 2014; Son et al., 2012). In this regard, our data suggest that the activation of the hearing receptor and, consequently, the increased activity of the afferent neurons are stimuli that trigger cochlear autophagy. Autophagy in the vestibule has additional functions in otoconial biogenesis (Marino et al., 2010) which may explain why autophagy genes in the vestibule showed greater up-regulation than those in the cochlea.

IGF-1 regulates autophagy in different contexts, sometimes with opposite actions depending on the cell type and situation, therefore its role is not well-defined yet (Renna et al., 2013; Wang et al., 2014). Our results indicate that tissues from *Igf1*^{-/-} mice show mostly the same temporal expression profiles as those obtained

from wild type mice. We did not observe any consistent differences between genotypes except in vestibules of P270 *Igf1*^{-/-} mice where *Becn1*, *Atg4b* and *Atg5* levels were higher than in *Igf1*^{+/+} mice. In addition, no significant differences between genotypes were observed in the autophagic flux measured by LC3-II and SQSTM1/p62 levels. Although our data suggest that IGF-1 does not play a key role in the control of autophagy, the deficiency of this factor in the cochlea might be partly compensated. Indeed, IGF-1 deficiency in the cochlea is compensated at its receptor level by the actions of other insulin family factors (Sanchez-Calderon et al., 2010). However, the deficiency is not fully compensated by that and IGF-1 absence causes a pro-inflammatory state, which might be revealed by the differential regulation of the toll-like receptor family observed in the *Igf1*^{-/-} cochlea, and which add to those upstream of *Cox2* induction but which autophagy resolves. Inhibition of downstream insulin/IGF-1 signalling in certain species has been associated with expanded lifespans and reduced neurodegeneration (Cohen et al., 2009; Holzenberger et al., 2003). In contrast, the broadest understanding is that maintenance of IGF-1 levels is of central importance for neuronal survival during ageing and accelerated degeneration (Muller et al., 2012; Trueba-Saiz et al., 2013). This paradox could be due to the fact that IGF-1 actions are

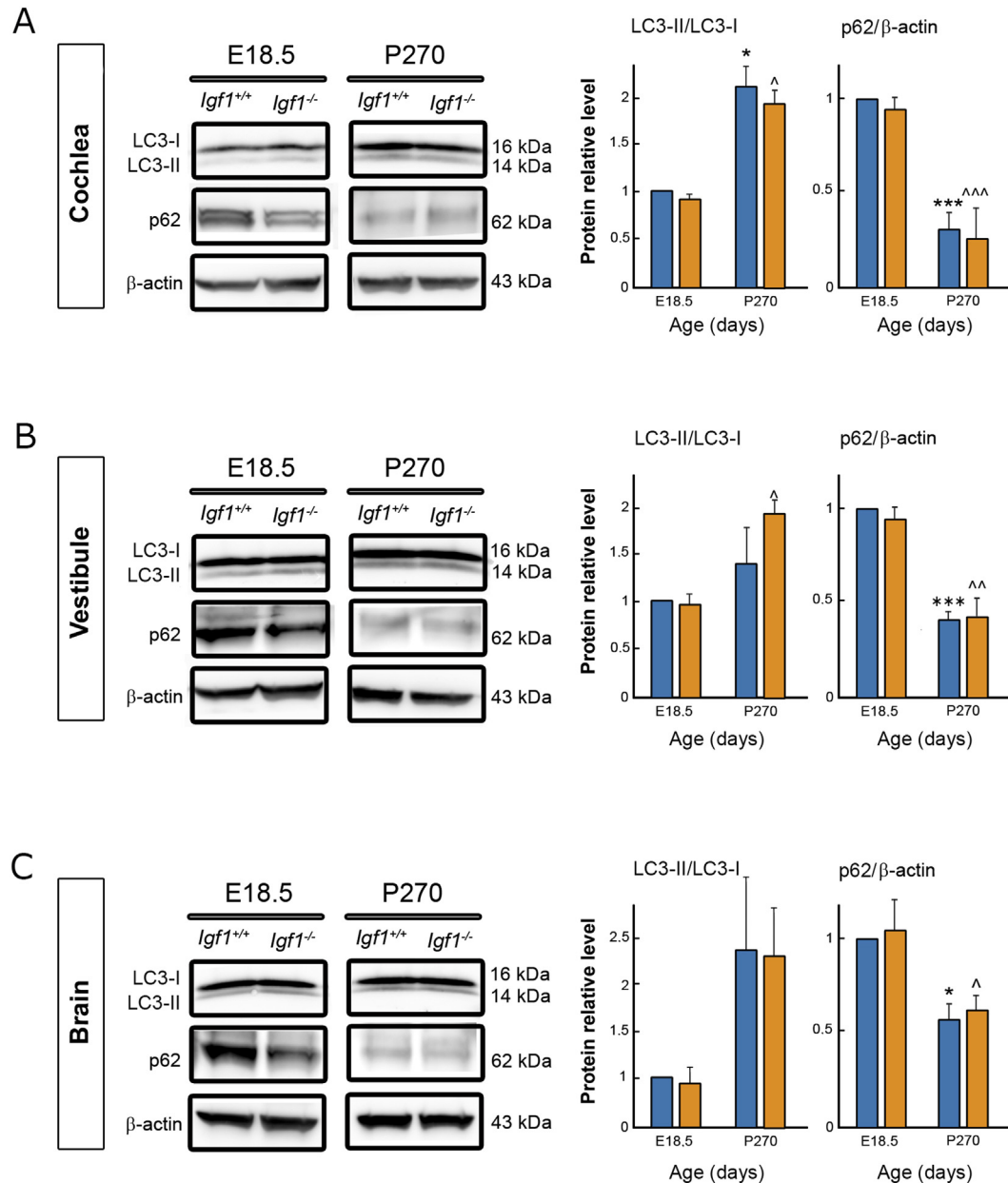


Fig. 3. Autophagy flux increases with age in the mouse inner ear. Levels of the LC3-II/LC3-I ratio and SQSTM1/p62 (p62) of E18.5 and P270 wild type and null mice cochlea (A), vestibule (B) and brain (C) were determined by Western blotting. SQSTM1/p62 was normalized to β -actin levels. A representative blot of samples obtained from 3 to 6 mice from each age and genotype are shown. Average values were calculated from densitometric measurements, compared to the E18.5 wild type and plotted in the graph bars to the right (wild type mice, blue bars, and null mice, orange bars). Results were expressed as the mean \pm SEM. The significance of the differences was evaluated using Student's t-test. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus E18.5 wild type; $^{\wedge}P < 0.05$, $^{\wedge\wedge}P < 0.01$ and $^{\wedge\wedge\wedge}P < 0.001$ versus E18.5 knockout.

complex and highly regulated. They range from short-term metabolic actions to long-term proliferation, survival and even differentiation. Therefore, the outcome of IGF-1 actions could even be divergent, depending on the physiopathological context (Varela-Nieto et al., 2013).

5. Conclusions

Our results show that autophagy machinery genes are expressed throughout the natural life of mice in their cochlea and

vestibule. Autophagy gene expression is up-regulated, concurring with the onset of functional activity. There is effective autophagic flux in the inner ear from the first month of life, and LC3B expression is intense in spiral ganglion neurons. These data suggest that autophagy is a housekeeping mechanism necessary for spiral neuron activity. Chronic IGF-1 deficiency caused by the deletion of the *Igf1* gene did not show any evident impact in the expression pattern of autophagy genes over time. However, a role for IGF-1 in this process cannot be ruled out as null mice up-regulate compensatory IGF system elements.

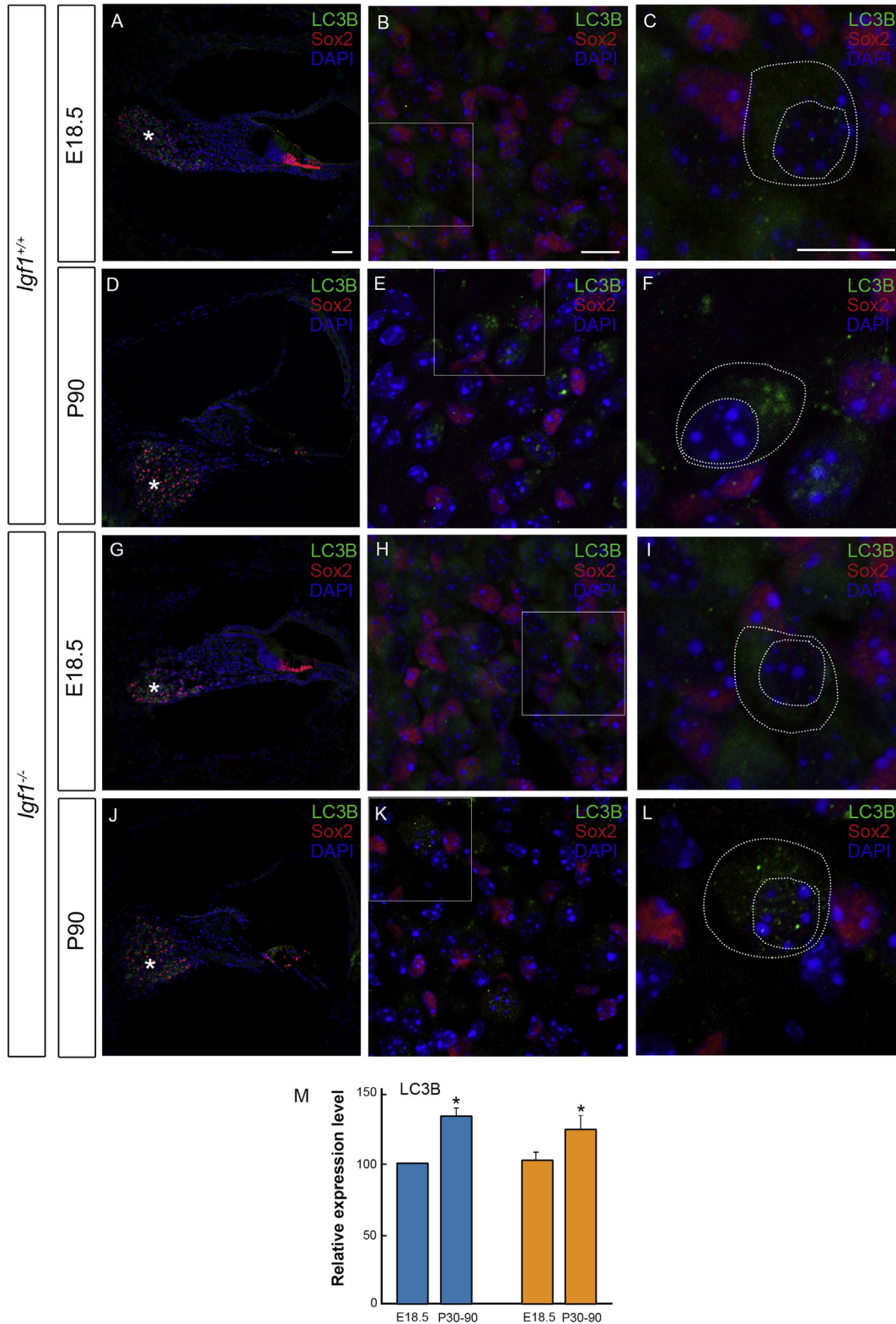


Fig. 4. Autophagy is localized in the neurons of the spiral ganglion. Immunostaining for LC3B showed localization of autophagy in the spiral ganglion neurons (**A, D, G and J**; asterisks show the area enlarged in **B, E, H, and K**, respectively). LC3B subcellular localization was evident in the neuronal cytoplasm (**B, E, H and K**; dotted white squares show the area enlarged in **C, F, I and L**, respectively). In **C, F, I and L**, selected neurons are circled for comparison. SOX2 staining of glial cells is shown in red (**A–L**). E18.5 wild type and null mice cochlea showed diffuse LC3B labelling in the cytoplasm (green, **B, C, H and I**). P90 wild type and null mouse cochlea presented a bright punctate LC3B labelling (green, **E, F, K and L**). Intensity of LC3B immunofluorescence in spiral ganglion was quantified using ImageJ software (**M**). Data were obtained from 4 to 12 sections from at least 3 mice of each age and genotype and are shown relative to those of E18.5 wild type mice as mean ± SEM. The significance of the differences was evaluated using Student's t-test: *P < 0.05 versus E18.5 wild type. Scale bars: 25 μm (**A, D, G and J**), 10 μm (**B, C, E, F, H, I, K and L**).

Statement of author contributions

MM and IVN, designed the experiments. LRdR acquired the mice samples; RIR, SP and LRdR, performed the experiments; RIR, SP, LRdR, MM and IVN analysed and interpreted the data. RIR, LRdR, MM and IVN wrote the manuscript. SP provided critical revisions. All authors gave their approval of the final version to be published.

Acknowledgements

The authors wish to thank the members of the Genomics and Non-invasive Neurofunctional Evaluation facilities (IIBm, CSIC-UAM) for their technical support and Laura Barrios for statistical analysis support (CSIC). We would also like to warmly thank our colleagues in the Neurobiology of Hearing group for sharing unpublished data and for helpful discussions. This work was supported by Spanish grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-24391 and SAF2014-53979-R) and European FP7-INNOVA2-AFHELO and FP7-PEOPLE-IAPP-TARGEAR to IVN. LRdR and RdI hold CIBERER and CSIC/SAF2011-24391 contracts, respectively. The cost of this publication has been paid in part by FEDER funds.

References

- Aburto, M.R., Hurlé, J.M., Varela-Nieto, I., Magarinos, M., 2012a. Autophagy during vertebrate development. *Cells* 1, 428–448.
- Aburto, M.R., Sanchez-Calderon, H., Hurlé, J.M., Varela-Nieto, I., Magarinos, M., 2012b. Early otic development depends on autophagy for apoptotic cell clearance and neural differentiation. *Cell Death Dis.* 3, e394.
- Bains, M., Florez-McClure, M.L., Heidenreich, K.A., 2009. Insulin-like growth factor-I prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation. *J. Biol. Chem.* 284, 20398–20407.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Johansen, T., 2006. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2, 138–139.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., Johansen, T., 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzym.* 452, 181–197.
- Camarero, G., Villar, M.A., Contreras, J., Fernandez-Moreno, C., Pichel, J.G., Avendano, C., Varela-Nieto, I., 2002. Cochlear abnormalities in insulin-like growth factor-1 mouse mutants. *Hear. Res.* 170, 2–11.
- Camarero, G., Avendano, C., Fernandez-Moreno, C., Villar, A., Contreras, J., de Pablo, F., Pichel, J.G., Varela-Nieto, I., 2001. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 7630–7641.
- Cohen, E., Paulsson, J.F., Blinder, P., Burstyn-Cohen, T., Du, D., Estepa, G., Adame, A., Pham, H.M., Holzenberger, M., Kelly, J.W., Masliyah, E., Dillin, A., 2009. Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 139, 1157–1169.
- Chen, Y., Klionsky, D.J., 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* 124, 161–170.
- Damme, M., Suntio, T., Saftig, P., Eskelinen, E.L., 2014. Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions. *Acta Neuropathol.* 129 (3), 337–362.
- de Iriarte Rodríguez, R., Magarinos, M., Pfeiffer, V., Rapp, U.R., Varela-Nieto, I., 2015. C-Raf deficiency leads to hearing loss and increased noise susceptibility. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 1–16.
- Feng, T., Yin, Q., Weng, Z.L., Zhang, J.C., Wang, K.F., Yuan, S.Y., Cheng, W., 2014a. Rapamycin ameliorates neuropathic pain by activating autophagy and inhibiting interleukin-1beta in the rat spinal cord. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 34, 830–837. *Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban.*
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D.J., 2014b. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24, 24–41.
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., Cecconi, F., 2007. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121–1125.
- Gordy, C., He, Y.W., 2012. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein & cell* 3, 17–27.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloan, A., Even, P.C., Cervera, P., Le Bouc, Y., 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182–187.
- Hurley, J.H., Schulman, B.A., 2014. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. *Cell* 157, 300–311.
- Jin, M., Klionsky, D.J., 2014. Transcriptional regulation of ATG9 by the Pho23-Rpd3 complex modulates the frequency of autophagosome formation. *Autophagy* 10 (9), 1681–1682.
- Klionsky, D.J., 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118, 7–18.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn Jr., W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., Ohsumi, Y., 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5, 539–545.
- Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., Bamber, B.A., Bassham, D.C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J.S., Bredesen, D.E., Brodsky, J.L., Brumell, J.H., Brunk, U.T., Bursch, W., Camougrand, N., Cebolloero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, L.S., Choi, A., Chu, C.T., Chung, J., Clarke, P.G., Clark, R.S., Clarke, S.G., Clave, C., Cleveland, J.L., Codogno, P., Colombo, M.I., Coto-Montes, A., Cregg, J.M., Cuervo, A.M., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, P.B., Dennis, P.A., Deretic, V., Devenish, R.J., Di Sano, F., Dice, J.F., Difiglia, M., Dinesh-Kumar, S., Distelhorst, C.W., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, F.C., Droge, W., Dron, M., Dunn Jr., W.A., Duzsenko, M., Eissa, N.T., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, E.L., Fesus, L., Finley, K.D., Fuentes, J.M., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, F.B., Jackson, W.T., Gibson, S.B., Gohla, A., Goldberg, A.L., Gonzalez, R., Gonzalez-Estevez, C., Gorski, S., Gottlieb, R.A., Haussinger, D., He, Y.W., Heidenreich, K., Hill, J.A., Hoyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, W.P., Iwasaki, A., Jaattela, M., Jackson, W.T., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, J.U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D.H., Kiel, J.A., Kim, H.P., Kimchi, A., Kinsella, T.J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., et al., 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151–175.
- Koike, M., Shibata, M., Waguri, S., Yoshimura, K., Tanida, I., Kominami, E., Gotow, T., Peters, C., von Figura, K., Mizushima, N., Saftig, P., Uchiyama, Y., 2005. Participation of autophagy in storage of lysosomes in higher eukaryotes from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am. J. Pathol.* 167, 1713–1728.
- Kouyrou, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., Momoi, T., 2007. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14, 230–239.
- Kraft, C., Peter, M., Hofmann, K., 2010. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* 12, 836–841.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., Mizushima, N., 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032–1036.
- Le Grand, J.N., Chakrama, F.Z., Seguin-Py, S., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M., Boyer-Guittaut, M., 2011. GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy* 7, 1098–1107.
- Lee, C.Y., Clough, E.A., Yellon, P., Teslovich, T.M., Stephan, D.A., Baehrecke, E.H., 2003. Genome-wide analyses of steroid- and radiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Curr. Biol.* CB 13, 350–357.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., Efstratiadis, A., 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59–72.
- Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Magarinos, M., 2014. Early development of the vertebrate inner ear. In: Romand, R., Varela-Nieto, I. (Eds.), *Development of Auditory and Vestibular Systems*, fourth ed., pp. 1–30.
- Magarinos, M., Contreras, J., Aburto, M.R., Varela-Nieto, I., 2012. Early development of the vertebrate inner ear. *Anat. Rec. Hob.* 295, 1775–1790.
- Magarinos, M., Aburto, M.R., Sanchez-Calderon, H., Munoz-Agudo, C., Rapp, U.R., Varela-Nieto, I., 2010. RAF kinase activity regulates neuroepithelial cell proliferation and neuronal progenitor cell differentiation during early inner ear development. *PLoS One* 5, e14435.
- Marino, G., Fernandez, A.F., Cabrera, S., Lundberg, Y.W., Cabanillas, R., Rodriguez, F., Salvador-Montoliu, N., Vega, J.A., Germana, A., Fueyo, A., Freije, J.M., Lopez-Otin, C., 2010. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J. Clin. Invest.* 120, 2331–2344.
- Martinet, W., De Meyer, G.R., Andries, L., Herman, A.G., Kockx, M.M., 2006. Detection of autophagy in tissue by standard immunohistochemistry: possibilities and limitations. *Autophagy* 2, 55–57.
- Menardo, J., Tang, Y., Ladrech, S., Lenoir, M., Casas, F., Michel, C., Bourin, J., Ruel, J., Rebillard, G., Maurice, T., Puel, J.L., Wang, J., 2012. Oxidative stress, inflammation, and autophagic stress as the key mechanisms of premature age-related hearing loss in SAMP8 mouse Cochlea. *Antioxidants redox Signal.* 16, 263–274.
- Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes & Dev.* 21, 2861–2873.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542–545.
- Muller, A.P., Fernandez, A.M., Haas, C., Zimmer, E., Portela, L.V., Torres-Aleman, I., 2012. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 9–12.
- Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-de la Rosa, L., Cediell, R., Lassaletta, L., Varela-Nieto, I., 2011. The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 11.
- Nixon, R.A., 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 19, 983–997.
- Reggiori, F., Ungermann, C., 2012. A dimer to bridge early autophagosomal membranes. *Cell* 151, 1403–1405.
- Renna, M., Bento, C.F., Fleming, A., Menzies, F.M., Siddiqi, F.H., Ravikumar, B., Puri, C., Garcia-Arencibia, M., Sadiq, O., Corrochano, S., Carter, S., Brown, S.D., Acevedo-

- Arozena, A., Rubinsztein, D.C., 2013. IGF-1 receptor antagonism inhibits autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4528–4544.
- Ricciotti, E., FitzGerald, G.A., 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 986–1000.
- Riquelme, R., Cediél, R., Contreras, J., la Rosa Lourdes, R.D., Murillo-Cuesta, S., Hernandez-Sanchez, C., Zubeldia, J.M., Cerdan, S., Varela-Nieto, I., 2010. A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor 1 deficient mice. *Front. Neuroanat.* 4, 27.
- Rodríguez-de la Rosa, L., Lopez-Herradon, A., Portal-Nunez, S., Murillo-Cuesta, S., Lozano, D., Cediél, R., Varela-Nieto, I., Esbrit, P., 2014. Treatment with N- and C-terminal peptides of parathyroid hormone-related protein partly compensate the skeletal abnormalities in IGF-I deficient mice. *PLoS One* 9, e87536.
- Rubinstein, A.D., Kimchi, A., 2012. Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J. Cell Sci.* 125, 5259–5268.
- Rubinsztein, D.C., Marino, G., Kroemer, G., 2011. Autophagy and aging. *Cell* 146, 682–695.
- Rueda, J., Cantos, R., Lim, D.J., 1996. Tectorial membrane-organ of Corti relationship during cochlear development. *Anat. Embryol.* 194, 501–514.
- Sanchez-Calderon, H., Milo, M., Leon, Y., Varela-Nieto, I., 2007. A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 557–570.
- Sanchez-Calderon, H., Rodríguez-de la Rosa, L., Milo, M., Pichel, J.G., Holley, M., Varela-Nieto, I., 2010. RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One* 5, e8699.
- Schneider, J.L., Cuervo, A.M., 2014. Autophagy and human disease: emerging themes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 26C, 16–23.
- Seiliez, I., Gutierrez, J., Salmeron, C., Skiba-Cassy, S., Chauvin, C., Dias, K., Kaushik, S., Tesseraud, S., Panserat, S., 2010. An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B. Biochem. Mol. Biol.* 157, 258–266.
- Shi, C.S., Kehrl, J.H., 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *J. Biol. Chem.* 283, 33175–33182.
- Sobolewska, A., Gajewska, M., Zarzynska, J., Gajkowska, B., Motyl, T., 2009. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur. J. Cell Biol.* 88, 117–130.
- Son, J.H., Shim, J.H., Kim, K.H., Ha, J.Y., Han, J.Y., 2012. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.* 44, 89–98.
- Taylor, M.P., Kirkegaard, K., 2008. Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. *Autophagy* 4, 286–289.
- Thurston, T.L., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., Randow, F., 2009. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 10, 1215–1221.
- Trueba-Saiz, A., Cavada, C., Fernandez, A.M., Leon, T., Gonzalez, D.A., Fortea Ormaechea, J., Lleo, A., Del Ser, T., Nunez, A., Torres-Aleman, I., 2013. Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Transl. Psychiatry* 3, e330.
- Varela-Nieto, I., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-de la Rosa, L., Lassatetta, L., Contreras, J., 2013. IGF-I deficiency and hearing loss: molecular clues and clinical implications. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 10, 460–472.
- Wang, Y., Wang, W., Li, D., Li, M., Wang, P., Wen, J., Liang, M., Su, B., Yin, Y., 2014. IGF-1 alleviates NMDA-induced excitotoxicity in cultured hippocampal neurons against autophagy via the NR2B/PI3K-AKT-mTOR pathway. *J. Cell. Physiol.* 229, 1618–1629.
- Yordy, B., Tal, M.C., Hayashi, K., Arojo, O., Iwasaki, A., 2013. Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense. *Int. Immunol.* 25, 1–10.

