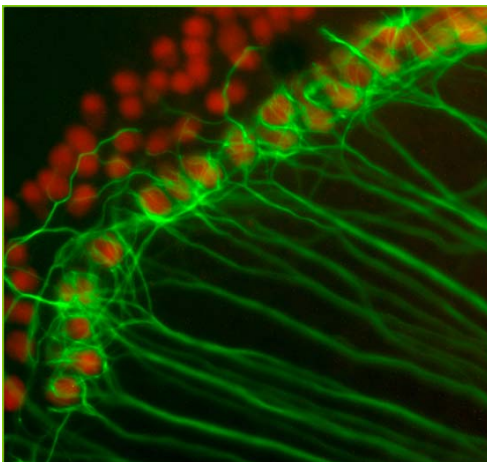


## INFORME de la ACTIVIDAD DESARROLLADA

Baltimore, marzo de 2010

Quisiera agradecer a la Fundación Fulbright por la ayuda recibida para el desarrollo de mi trabajo en el estudio de la regeneración celular en el oído interno. Durante el periodo de disfrute de la beca me he incorporado a un grupo de investigación especializado en el estudio de las sinapsis entre las células ciliadas del oído interno y las neuronas auditivas. Las células ciliadas son las encargadas de recibir los movimientos de los líquidos endolaberínticos producidos por las ondas acústicas y transformarlos en una señal eléctrica (despolarización de la célula ciliada). La célula ciliada, al despolarizarse, libera neurotransmisores que, a su vez, producen la despolarización de las neuronas auditivas. La señal eléctrica transmitida por las neuronas auditivas recorre el tronco cerebral con diferentes estaciones sinápticas importantes para el procesamiento bilateral y espaciotemporal del sonido. Finalmente la corteza auditiva en el lóbulo temporal es excitada y se realiza el procesamiento cortical de la señal auditiva.

Desde un punto de vista fisio-patológico la sinapsis entre la célula ciliada y la neurona auditiva es un apasionante campo de estudio porque es uno de los lugares principales donde se produce una lesión tras una excesiva estimulación sonora (trauma acústico). La sobrecarga de estimulación acústica produce una liberación del neurotransmisor glutamato por la célula ciliada (*Fig 1 núcleo celular de la célula ciliada en color rojo*), el cual puede ser tóxico para las neuronas auditivas (*Fig 1 color verde*). Si su estimulación es repetida, produce la retracción de la fibra de la neurona auditiva y la posible apoptosis celular (perdida celular). Los fenómenos de retracción y posible regeneración de esta conexión sináptica entre la célula ciliada y la neurona auditiva merecen ser estudiados utilizando técnicas de biología molecular y electrofisiología.



*Figura 1. Órgano de Corti cultivado en un incubador celular. Las neuronas auditivas establecen contactos con las células ciliadas y, de esta manera, transmiten la información de la coclea al área auditiva cerebral. Verde- neuronas (Neurofilamento-H), Rojo- células ciliadas (Math-1),*

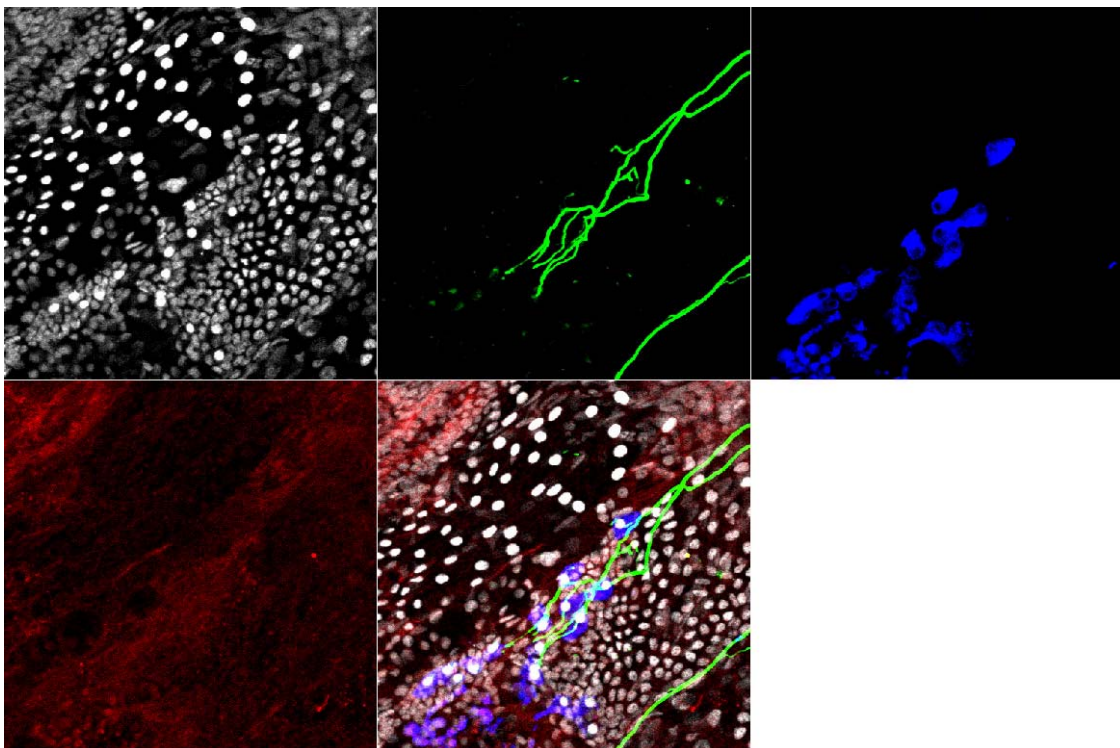
El conocimiento de los factores involucrados en este mecanismo de toxicidad y regeneración celular puede posibilitar el desarrollo de un tratamiento o prevención para el trauma acústico.

Durante mi estancia como Postdoctoral fellow en el Departamento de

Otorrinolaringología del Hospital Johns Hopkins de Baltimore he realizado una labor investigadora en el laboratorio de Elisabeth Glowatzki PhD. Este equipo de trabajo esta especializado en la técnica de electrofisiología de la actividad sináptica en el oído interno en la sinapsis entre la célula ciliada y la neurona auditiva. En este laboratorio he realizado principalmente cultivos celulares, trasplantes celulares *in vitro* junto a técnicas de inmunohistoquímica. Hemos utilizado animales de laboratorio (ratones wild type, ratones transgenicos *Math1-cGFP*, *Thy-CFP* y *Tau-GFP*) cumpliendo las normas de manejo de animales de laboratorio de la Universidad Johns Hopkins. Los cultivos celulares se realizaron en una sala especial aislada y esterilizada con cámaras de cultivo e incubadores celulares. He realizado la valoración de los cultivos utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Realizamos un estudio de la expresión de marcadores presinápticos y postsinápticos en la sinapsis entre la célula ciliada y la neurona auditiva. Además hemos utilizado unidades de electrofisiología para el estudio de la expresión de canales y receptores en la membrana de las neuronas auditivas y las células ciliadas del oído interno.

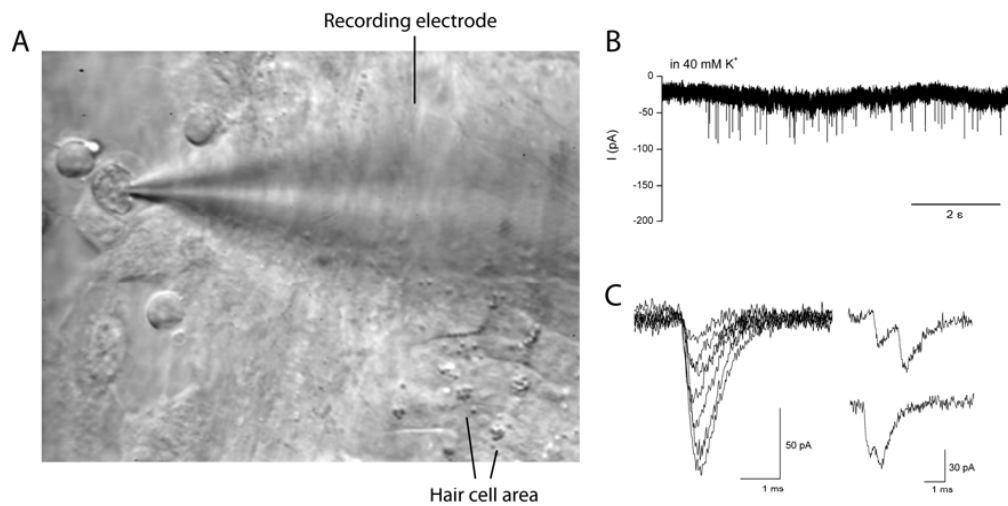
**1. Trasplantes celulares *in vitro* en el órgano de Corti.** Hemos estudiado la re-innervación de las células ciliadas con las neuronas auditivas y la formación de nuevas sinapsis mediante biología molecular y electrofisiología.

Hemos desarrollado un sistema de cultivo *in vitro* en este laboratorio que, en primer lugar, cultiva las células ciliadas aisladas de ratones recién nacidos y posteriormente cultiva neuronas auditivas aisladas de otro animal. Mediante estudios de inmunohistoquímica hemos comprobado la formación de nuevas prolongaciones y conexiones entre neuronas trasplantadas y las células ciliadas del oído interno (*Figura 2*).



*Figura 2. Órgano de Corti cultivado junto a neuronas auditivas durante 2-3 días in Vitro en un incubador celular. Blanco-DAPI (núcleos celulares), Verde- neuronas (Neurofilament-H), Azul- células ciliadas (Myosina VIIa), Rojo- marcador postsináptico (PSD-95).*

Hemos creado un método para el estudio de la actividad sináptica entre la célula ciliada y la neurona auditiva. En estos nuevos contactos entre las células ciliadas y las neuronas auditivas se forman sinapsis que son activas funcionalmente. Hemos realizado grabaciones del cuerpo neuronal o de la fibra nerviosa en un lugar cercano a la célula ciliada, para ver si la actividad sináptica está presente y comprobar su funcionalidad. Utilizando nuestra metodología, podemos comprobar si las nuevas sinapsis entre las células ciliadas y las neuronas transplantadas en cultivos celulares funcionan de una manera adecuada.



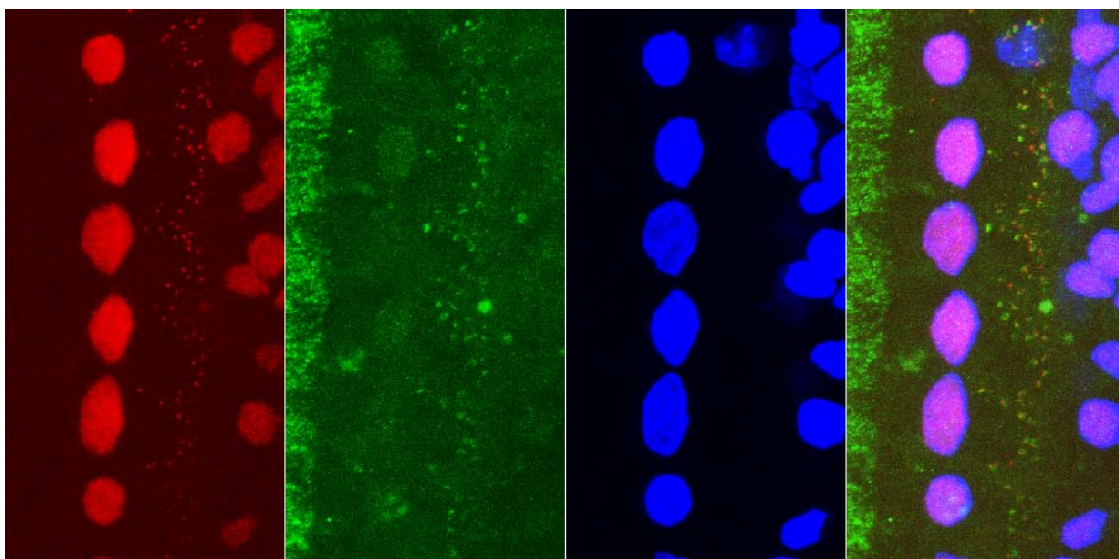
*Figura 3: Corrientes sinápticas grabadas en una neurona auditiva transplantada en un órgano de Corti denervado in vitro. A. Localización de la neurona en proximidad a las células ciliadas. B. Las corrientes sinápticas grabadas demuestran que la sinapsis recién formada entre una célula ciliada y una neurona es funcional. C. Las Corrientes sinápticas grabadas se asemejan a las Corrientes sinápticas grabadas en un órgano de Corti con una innervación normal.*

En una sinapsis normal, la estimulación de las células ciliadas debería resultar en la liberación de neurotransmisores que provocan la descarga eléctrica en la fibra nerviosa auditiva. Estas son características que hemos estudiado en la nueva sinapsis.

## 2. Estudio de la expresión de marcadores pre y postsinápticos en la sinapsis auditiva entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva.

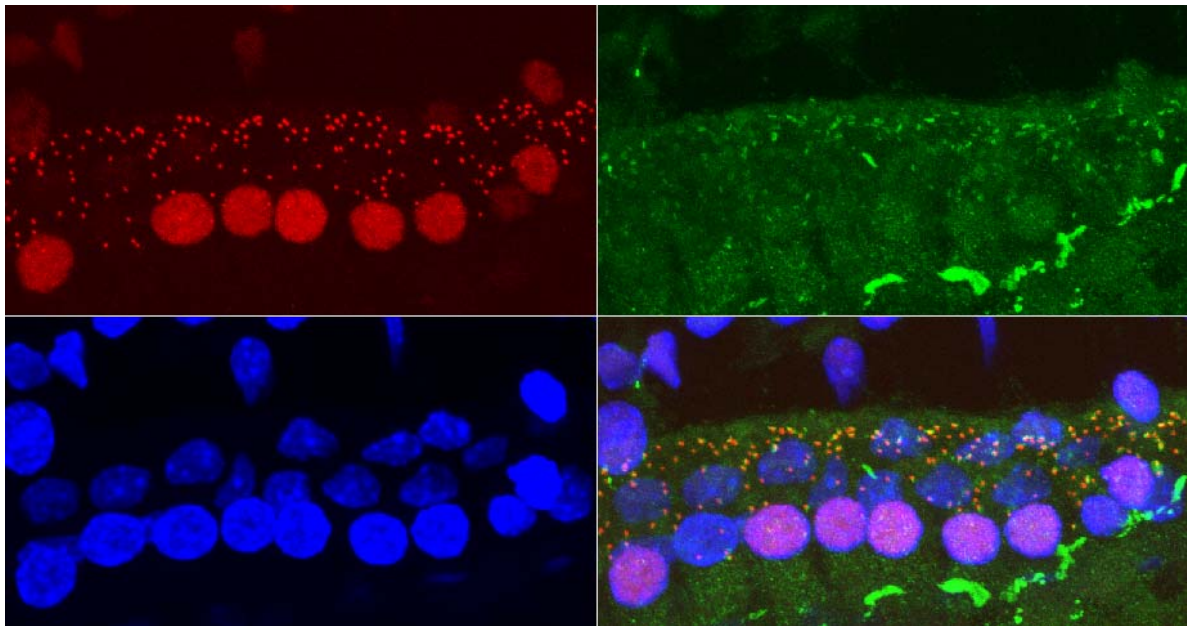
Mediante técnicas de inmunohistoquímica hemos estudiado la expresión de diferentes receptores glutamatergicos en la sinapsis entre la célula ciliada y la neurona auditiva. Dependiendo de la madurez de la sinapsis se expresan diferentes subtipos de estos receptores. La sobre-estimulación acústica produce un exceso de actividad en la sinapsis entre la célula ciliada y la neurona auditiva con un aumento de la liberación de neurotransmisores (glutamato) que puede tener un efecto tóxico en la terminación de la neurona auditiva. Así una cantidad excesiva de glutamato produce la retracción de la fibra auditiva conllevando un cambio en la expresión de marcadores postsinápticos. Para la regeneración de la unión sináptica se cree que la expresión de GluR1 (subtipo de receptor AMPA) en la terminación nerviosa es importante para el establecimiento de la unión sináptica de nuevo. Además, el glutamato (neurotransmisor) liberado por la célula ciliada es uno de los mecanismos neurotróficos que guían el crecimiento de la terminación sináptica hacia la célula ciliada. La expresión adecuada de estos marcadores sinápticos hace que la sinapsis se mantenga, madure y pueda ser resistente a un posible trauma acústico. Estas moléculas pueden tener un papel en la excitotoxicidad producida en el trauma acústico o en la isquemia del oído interno.

La expresión postsináptica del receptor AMPA GluR2 en la neurona auditiva tiene importancia desde un punto de vista fisiopatológico. El  $\text{Ca}^{2+}$  es un importante marcador intracelular en las neuronas y un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede producir un daño neuronal. El receptor AMPA GluR2 es impermeable al  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que hace a la neurona auditiva más resistente a un daño por exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  ante una sobre-estimulación acústica. Hemos comprobado la expresión de dicho receptor en la sinapsis entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva (*Fig 4*). En la literatura es sabido que en el desarrollo del oído interno la expresión del receptor AMPA GluR2 se produce cuando se instaura la estimulación acústica. Esta expresión de este marcador puede ser un mecanismo protector del oído ante una eventual subida del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en un trauma acústico.



*Figura 4. Expresión de marcadores pre y postsinápticos en la sinapsis entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva en el oído interno de un mamífero. CTBP2-rojo es un marcador presináptico en la célula ciliada. GluR2-verde es un marcador de receptores AMPA postsináptico en la neurona auditiva. DAPI-azul es un marcador de los núcleos celulares. El marcador GluR2 impermeable al  $Ca^{2+}$  es expresado en las terminaciones de las neuronas auditivas lo que las hace más resistentes a un trauma acústico.*

El receptor AMPA GluR3 es permeable al  $Ca^{2+}$  y, por lo tanto, más sensible a una lesión por un trauma acústico, hemos comprobado su expresión en la sinapsis entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva (Fig 5).



*Figura 5. Expresión de marcadores pre y postsinápticos en la sinapsis entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva en el oído interno de un mamífero. CTBP2-rojo es un marcador presináptico en la célula ciliada. GluR2/3-verde es un marcador de receptores AMPA postsináptico en la neurona auditiva. DAPI-azul es un marcador de los núcleos celulares. Podemos apreciar la próxima localización de los marcadores pre y postsinápticos.*

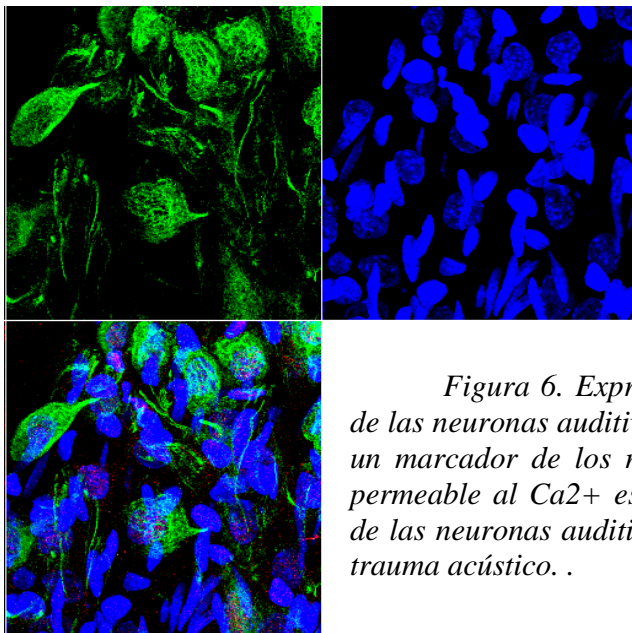
Consideramos que el estudio de las moléculas encargadas de la formación de una nueva sinapsis funcional entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva es un método de valoración de posibles tratamientos para evitar los efectos del trauma acústico o de la isquemia en el oído interno

### 3. Estudio de la expresión de marcadores pre y postsinápticos en la sinapsis auditiva entre las células ciliadas externas y las neuronas auditivas.

La literatura científica desconoce actualmente el tipo de receptores en la neurona auditiva que contacta la célula ciliada externa encargados de la transmisión de la señal acústica. Probablemente estos receptores son diferentes a los expresados en la neurona auditiva que contacta las células ciliadas internas (Matsubara et al. 1996; Pujol and Puel 1999). Además las proteínas presinápticas “ribbons” están ausentes en las células ciliadas externas adultas en algunos animales (Dunn and Morest 1975; Liberman et al. 1990). Las sinapsis entre las células ciliadas externas y las neuronas auditivas se reconocen actualmente por la localización en el microscopio electrónico de vesículas oticas presinápticas y por el engrosamiento de la membrana postsináptica (Liberman et al. 1990).

Los receptores NMDA están presentes también en la coclea (Niedzielski and Wenthold 1995). En la unión sináptica entre la célula ciliada interna y la neurona auditiva han sido implicados en la respuesta citotóxica que se produce tras la agresión acústica o química (Puel et al. 1994). Por el momento no se conoce la expresión de estos marcadores en las neuronas auditivas que contactan las células ciliadas externas.

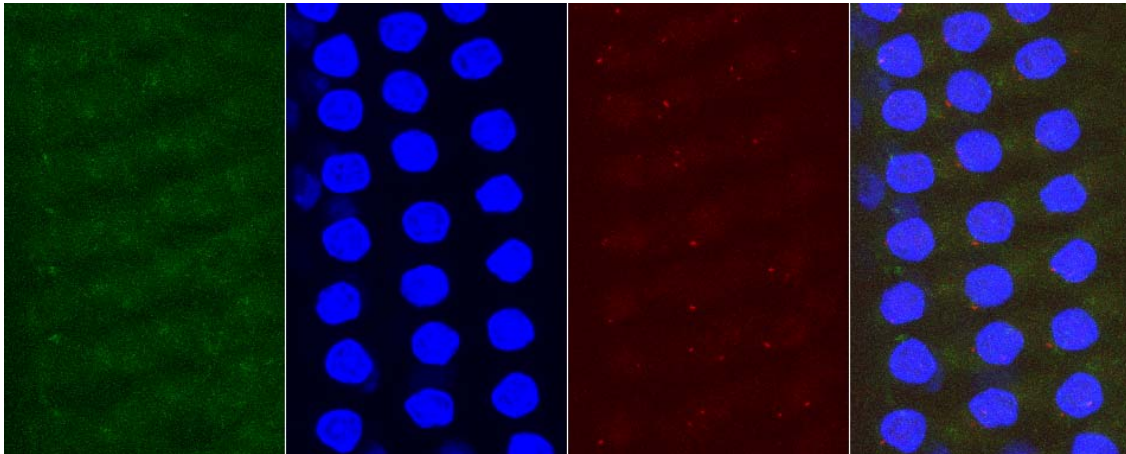
Hemos comprobado la expresión del marcador postsináptico GluR3 en los cuerpos neuronales de las neuronas auditivas en el modiollo coclear de un mamífero adulto (*Fig 6*).



*Figura 6. Expresión de GluR3-verde en el perikarion de las neuronas auditivas en el ganglio coclear. DAPI-azul es un marcador de los núcleos celulares. El marcador GluR3 permeable al  $Ca^{2+}$  es expresado en los cuerpos neuronales de las neuronas auditivas lo que las hace más sensibles a un trauma acústico. .*

La sinapsis entre las células ciliadas externas y las neuronas auditivas tienen la peculiaridad en comparación con las del sistema nervioso central de tener un cuerpo denso presináptico (Hashimoto et al., 1990; Friedmann and Ballantyne, 1984) que localiza la sinapsis y el lugar donde se produce el daño celular. Esta característica facilita

el análisis morfológico. En nuestros estudios hemos hallado la expresión de marcadores presinápticos en las células ciliadas externas del tipo ribbon CTBP2 (Fig 7). Estos marcadores indican la especialización de estas sinapsis con una liberación de los neurotransmisores regulable y sensible a las diferencias de la intensidad del estímulo acústico. En cuanto a la expresión de marcadores postsinápticos en las sinapsis entre las células ciliadas externas y las neuronas auditivas, por el momento, no hemos hallado la expresión de GluR2/3 (Fig 7).



*Figura 7. Expresión de marcadores pre y postsinápticos en la sinapsis entre las células ciliadas externas y las neuronas auditivas en el oído interno de un mamífero. CTBP2-rojo es un marcador presináptico en las células ciliadas. GluR3-verde es un marcador de receptores AMPA postsináptico en la neurona auditiva. DAPI-azul es un marcador de los núcleos celulares. El marcador presináptico CTBP2 es expresado en las células ciliadas mientras que el marcador postsináptico GluR2/3 (permeable al  $Ca^{2+}$ ) no aparece expresado en las terminaciones de las neuronas auditivas. Esta característica puede hacer a dichas células más sensibles a un trauma acústico.*

Con este sistema de estudio de trasplantes celulares y de modificación de la expresión de marcadores sinápticos *in vitro* podemos avanzar en el estudio de los mecanismos que facilitan la formación de nuevas sinapsis en el oído interno. Este conocimiento será importante para la creación de nuevas terapias celulares en el oído interno en la hipoacusia neurosensorial. Tanto las neuronas auditivas como las células madre adultas utilizadas como tratamiento celular necesitarán de la formación de sinapsis con las células ciliadas para conseguir un oído interno funcional.

#### 4. Cambios en la orientación anatómica del oído interno en pacientes candidatos a un implante coclear.

Los cirujanos que realizan implantes cocleares destacan la importancia que tiene la precisión en la inserción del implante para reducir el riesgo de lesión en la cóclea y conseguir un buen resultado en la audición postimplante. En cócleas malformadas los resultados de la implantación coclear son inconsistentes.

Nuestra hipótesis es que la orientación de la cóclea en la base del cráneo varía dependiendo de la edad del paciente. Queremos desarrollar un modelo de análisis de la anatomía del oído interno que guiará al cirujano en la intervención de un implante coclear. Este cambio en la orientación creemos que es secundario a modificaciones en las dimensiones de la base del cráneo con el crecimiento. El conocimiento de estas diferencias anatómicas en función a la edad y al desarrollo del oído interno tiene repercusiones quirúrgicas a la hora de realizarse una intervención de implante coclear, principalmente en casos de dismorfia coclear. Mediante este estudio morfométrico del oído interno podemos orientar al cirujano a la hora de la inserción del implante en el oído interno y, de esta manera, conseguir una cirugía funcional que permita conservar los “restos” auditivos del oído intervenido.

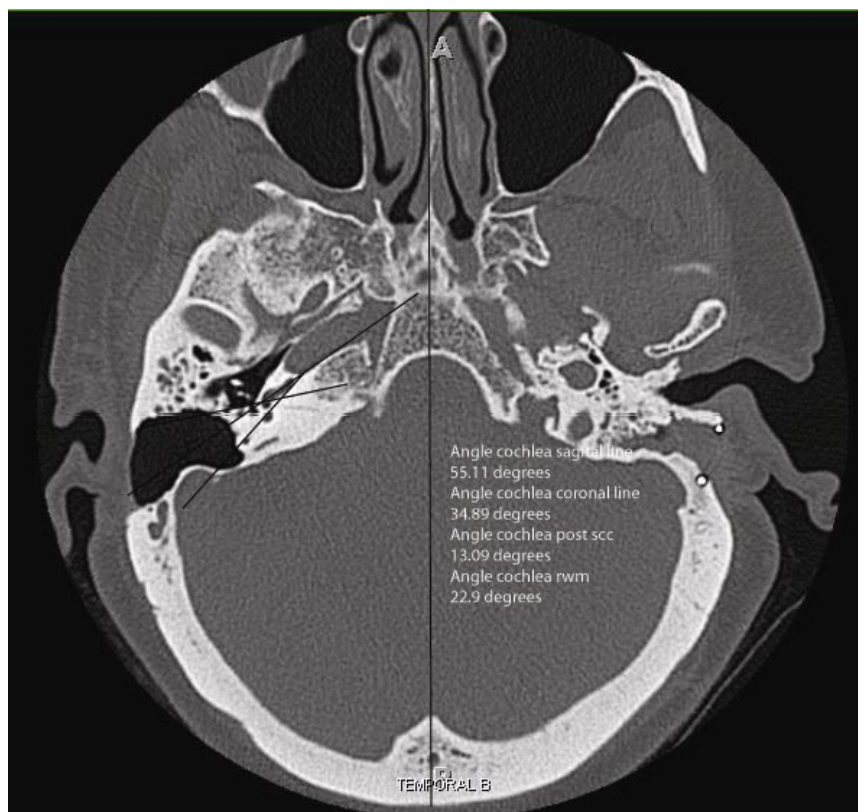
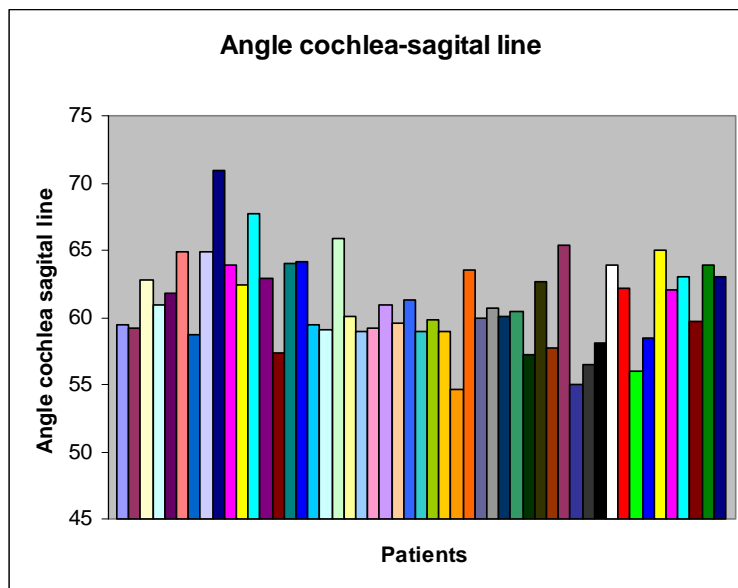


Figura 8. TAC Axial de paciente candidato a ser intervenido con un implante coclear por presentar hipoacusia neurosensorial profunda. Medida de ángulos de la cóclea con diferentes referencias anatómicas para valoración de la trayectoria de

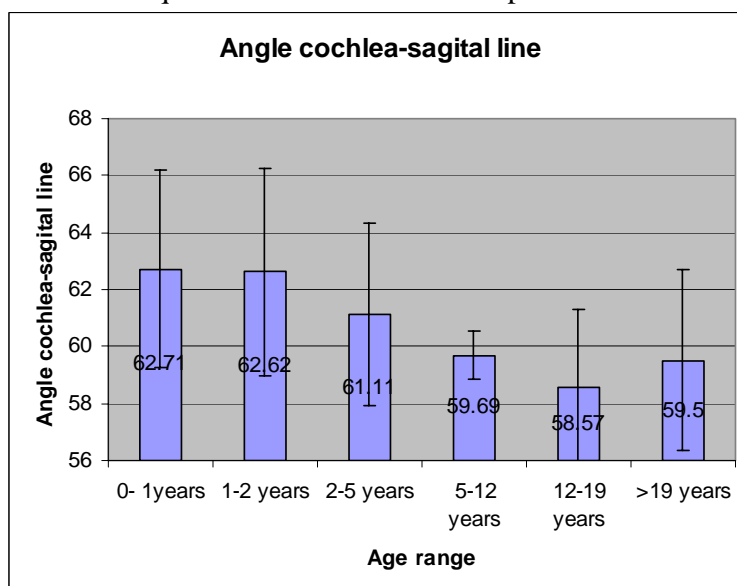
*inserción del implante.*

Estamos valorando los cambios en la orientación de la cóclea en pacientes candidatos a un implante coclear dependiendo de la edad mediante estudios de TAC de alta resolución. Hemos realizado estudios morfométricos de unos 60 pacientes de edades comprendidas entre los 4 meses y los 87 años.

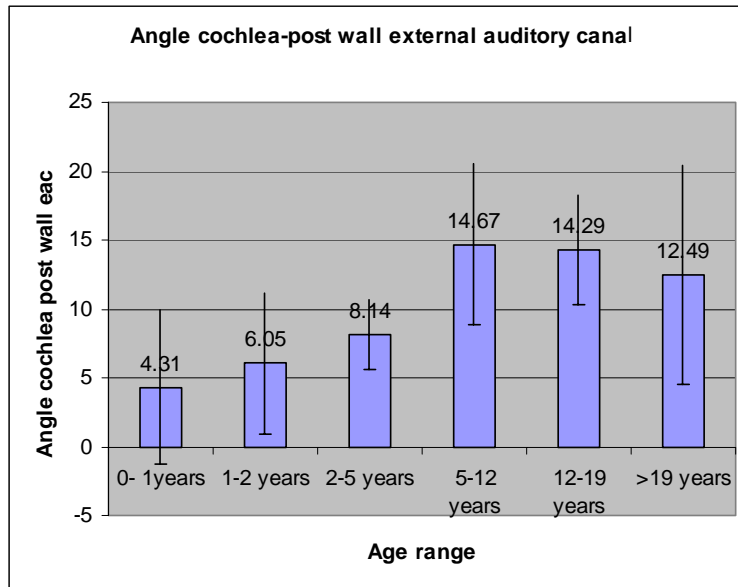
Hemos medido el ángulo de la base de la cóclea respecto a diferentes marcadores de la base del cráneo y hueso temporal. Hallamos una importante variabilidad en dicho ángulo.



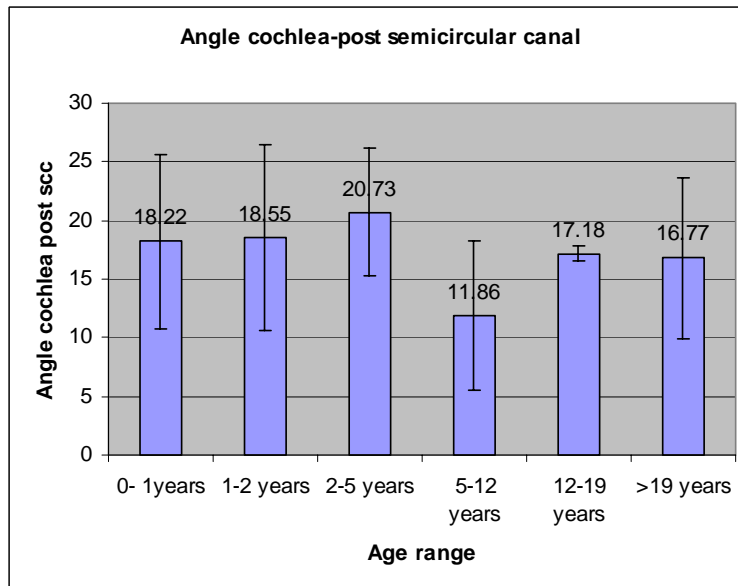
Observamos una variación en el ángulo de la espira basal de la coclea respecto a una línea medio-sagital en la base del cráneo de 62.76 a 59.5 grados (media). El ángulo era menor a medida que avanzaba la edad de los pacientes.



Hubo un aumento significativo en el ángulo de la coclea respecto a la pared posterior del conducto auditivo externo comparando el grupo menor de 1 año y el de mayores de 19 años ( $p < 0.05$ ).



El ángulo de la coclea respecto al canal semicircular posterior es constante a lo largo de las edades estudiadas. Las cocleas dismórficas demostraron una variabilidad mayor en la orientación de la coclea.



La orientación coclear varía en relación con la base del cráneo y con los puntos de referencia utilizados para determinar la cirugía coclear. Esta diferente orientación del oído interno tiene repercusiones quirúrgicas a la hora de realizar la inserción del electrodo del implante coclear. Actualmente se intenta realizar una cirugía que conserve la audición residual del oído intervenido y para conseguirlo es de gran importancia la orientación del electrodo del implante coclear.

En un futuro creemos que la cirugía del oído interno se realizará siguiendo la anatomía particular de cada paciente guiándose de técnicas de imagen con la sensibilidad suficiente para distinguir pequeñas variaciones en la anatomía del oído interno.

Atentamente,

Rodrigo Martínez Monedero