



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica
Escuela de Pregrado

**ROL DEL RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha 9/\alpha 10$ EN LA CONDUCTA DE
ATENCIÓN SELECTIVA A ESTÍMULOS VISUALES EN
PRESENCIA DE DISTRACTORES AUDITIVOS**

Memoria para la optar al Título Profesional de Bioquímico

Patrocinante

Dr. Alfonso Paredes

Departamento de Bioquímica y Biología

Molecular

Directores de Memoria

Dr. Paul Delano

Dr. Gonzalo Terreros

Programa de Fisiología y Biofísica

PASCAL MICHEL SAMIR JORRATT CALLEJAS

2016

*la rebelión consiste en mirar una rosa
hasta pulverizarse los ojos*

Alejandra Pizarnik

AGRADECIMIENTOS

A Gonzalo Terreros, por enseñarme cosas que no están en Wikipedia. A Paul Delano por dejarme jugar ajedrez en el laboratorio. A Fernando Vergara por las conversaciones de fútbol. A Luis Alberto Spinetta por iluminar mi trabajo. A mi familia, por no preguntarme cuánto tiempo me faltaba.

ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIACIONES	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 Anatomía del sistema eferente auditivo	17
1.2 Fisiología del sistema olivococlear	20
1.3 Probables funciones del sistema eferente auditivo	20
1.4 Ratón genéticamente modificado para el receptor nicotínico $\alpha 9$	22
1.5 Estímulos auditivos y comportamiento	22
1.6 Ansiedad y tareas cognitivas	23
1.7 Propuesta	24
2. HIPÓTESIS	25
2.1 Objetivo general	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. METODOLOGÍA	26
3.1 Animales	26
3.2 Genotipificación de ratones	27
3.3 Ensayo de atención visual	28
3.4 Protocolo experimental	31
3.5 Distractores auditivos	33
3.6 Respuesta auditiva del tronco cerebral (ABR)	33
3.7 Prueba de campo abierto	36
3.8 Laberinto en cruz elevado	38
3.9 Análisis estadísticos	40

4. RESULTADOS	42
4.1 Genotipificación	42
4.2 Comportamiento durante el protocolo experimental	44
4.2.1 Eficiencia de respuestas	44
4.2.2 Respuestas correctas y omitidas	46
4.2.3 Latencia de respuestas correctas	47
4.2.4 Respuestas incorrectas	48
4.2.5 Respuestas anticipadas y durante el intervalo inter-ensayo	48
4.2.6 Número de errores	49
4.2.7 Densidad de las latencias de respuestas	52
4.2.8 Correlación de parámetros conductuales	55
4.3 Ansiedad	59
4.3.1 Campo abierto	59
4.3.2 Laberinto en cruz elevado	60
4.4 Electrofisiología	66
5. DISCUSIÓN	69
6. CONCLUSIONES	77
7. REFERENCIAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de las vías aferentes auditiva	15
Figura 2. Diagrama de la vía directa e indirecta a la amígdala	16
Figura 3. Diagrama de las vías córtico-cocleares	18
Figura 4. Diagrama de la sinapsis entre las fibras OCM con las CCE	19
Figura 5. Diagrama esquemático del panel frontal de la caja operante	29
Figura 6. Curso temporal de la tarea de discriminación de estímulos visuales	30
Figura 7. Protocolo experimental de evaluación conductual	32
Figura 8. Diagrama con las dimensiones del campo abierto	37
Figura 9. Esquema con las dimensiones del laberinto en cruz elevado	40
Figura 10. Genotipificación de los ratones WT y KO	43
Figura 11. Desempeño conductual de los ratones WT y KO en los 12 días del protocolo experimental	45
Figura 12. Desempeño conductual de los ratones WT y KO en los 12 días del protocolo experimental	46
Figura 13. Desempeño conductual de los ratones WT y KO analizados por periodos del protocolo experimental	50
Figura 14. Desempeño conductual de los ratones WT y KO analizados por periodos del protocolo experimental	51
Figura 15. Densidad de las latencias de las respuestas correctas	52

Figura 16. Densidad de las latencias de las respuestas incorrectas	53
Figura 17. Densidad de las latencias de las respuestas anticipadas	54
Figura 18. Correlaciones entre eficiencia de respuesta (%) y respuestas anticipadas	56
Figura 19. Correlaciones entre las respuestas incorrectas y respuestas anticipadas	58
Figura 20. Evaluación del número total de presiones de palancas y porcentajes del peso corporal	59
Figura 21. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad previo al protocolo experimental	61
Figura 22. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad posterior al protocolo experimental	62
Figura 23. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad posterior al protocolo experimental	64
Figura 24. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad posterior al protocolo experimental	65
Figura 25. Diferencias en los episodios y latencia de congelamiento	66
Figura 26. Ejemplo de una onda de ABR en ratones WT y KO	67
Figura 27. Umbrales de ABR y supresión de la onda I por ruido contralateral	68

ABREVIATURAS

ABR	Respuesta auditiva del tronco cerebral
ACh	Acetilcolina
C+T	Clic + tono
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Células ciliadas internas
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
COS	Complejo olivar superior
dB	Decibeles
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GABA	Ácido γ -aminobutírico
ITI	Intervalo inter-ensayo
KO	Knock out
LCE	Laberinto en cruz elevado
MC	Microfónico coclear
OC	Olivococlear
OCL	Olivococlear lateral
OCM	Olivococlear medial
PAC	Potencial de acción compuesto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

POST	Post distractor
PRE	Pre distractor
RB	Ruido blanco
RM-ANOVA	Anova de medidas repetidas
rpm	Revoluciones por minuto
SK2	Canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña
SPL	Nivel de presión sonora
WT	Wild type

RESUMEN

Durante la atención selectiva, los sujetos voluntariamente centran sus recursos cognitivos en un estímulo específico mientras ignoran otros. Uno de los mecanismos propuestos como base biológica de la atención selectiva son los filtros de las respuestas sensoriales periféricas mediado por las estructuras superiores del cerebro, conocidos como mecanismos *top-down*. Uno de los requisitos para la modulación *top-down* es la presencia de las vías corticofugales. El sistema eferente auditivo en mamíferos es una red neuronal única que se origina en la corteza auditiva y que tiene proyecciones a células receptoras de la cóclea a través de las fibras olivococleares, las cuales han sido propuestas como la base neuroanatómica del filtro auditivo durante la atención a estímulos de diferentes modalidades. Sin embargo, hasta ahora no existe evidencia directa que las neuronas olivococleares estén involucradas en paradigmas de atención selectiva. El objetivo de este trabajo es estudiar el rol del receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$, principal receptor involucrado en la sinapsis entre las neuronas olivococleares mediales y las células ciliadas externas, en la conducta de atención selectiva a estímulos visuales en presencia de distractores auditivos. Para esto, se entrenaron ratones *wild type* y *knock-out* para la subunidad $\alpha 9$ del receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$ (KO- $\alpha 9$) en una prueba de discriminación visual de dos opciones. Se estudiaron las consecuencias

conductuales de la presentación de diferentes tipos de distractores auditivos. También se realizaron pruebas de campo abierto y laberinto en cruz elevado para determinar si estos distractores auditivos produjeron cambios en la actividad locomotora y ansiedad. Además se evaluaron los efectos del ruido contralateral en las respuestas del nervio auditivo, como una medida de la fuerza del reflejo olivococlear.

Los resultados de este trabajo muestran que los ratones KO- $\alpha 9$ tienen un reflejo olivococlear disminuido y una tendencia de peor desempeño en el paradigma de atención selectiva a estímulos visuales, por lo que se propone que una sinapsis olivococlear medial intacta es necesaria para reducir la sensibilidad coclear durante esta tarea. Además, ya que los ratones KO- $\alpha 9$ recorrieron una menor distancia en el laberinto en cruz elevado luego de la presencia de los distractores auditivos, se propone que la ausencia de una sinapsis olivococlear medial intacta provoca una disminución de la actividad locomotora.

Esta tesis contribuye al entendimiento del rol de la sinapsis colinérgica entre las células ciliadas externas y las neuronas olivococleares mediales durante la atención selectiva a estímulos visuales.

ABSTRACT

Role of nicotinic receptor $\alpha 9/\alpha 10$ in selective attention to visual stimuli using auditory distractors

During selective attention, subjects voluntarily focus their cognitive resources on specific stimuli while ignoring others. One of the mechanisms proposed as a biological correlate of selective attention is the filtering of peripheral sensory responses mediated by higher brain structures, known as *top-down* mechanisms. *Top-down* filtering of peripheral responses needs the presence of corticofugal pathways. The efferent auditory system in mammals is a singular neural network that originates in the auditory cortex and projects to the receptor cells in the cochlea through olivocochlear (OC) fibers. The OC system has been proposed as the neuroanatomical basis of the peripheral auditory filter during attention to visual stimuli. However, to date, there is no direct evidence that OC neurons are involved in selective attention paradigms. The aim of this work is to study the behavioral role of $\alpha 9/\alpha 10$ nicotinic receptors, which are the main target of cholinergic synapses between medial olivocochlear neurons and outer hair cells, during selective attention to visual stimuli in the presence of auditory distractors. Methods: *wild type* and *knock-out* mice for $\alpha 9$ subunit of nicotinic receptor $\alpha 9/\alpha 10$ (KO- $\alpha 9$) were trained in a two-visual discrimination task. The

behavioral consequences of the presentation of different types of auditory distractors in the visual attention task were studied. Open field tests and elevated plus maze were also performed to determine whether these auditory distractors produced changes in locomotor activity and anxiety. In addition the effects of contralateral noise were evaluated in auditory nerve responses, as a measure of the strength of the olivocochlear reflex.

We found that the KO- α 9 mice have a significant decrease in the olivocochlear reflex strength and a tendency to worse performance in the paradigm of selective attention to visual stimuli. These results suggest that intact medial olivocochlear synapses are necessary to reduce cochlear sensitivity during attention. Furthermore, since the KO- α 9 mice traveled a shorter distance in the elevated plus maze after the presence of auditory distractors, it is proposed that the lack of an intact medial olivocochlear synapses causes a decrease in locomotor activity.

This work contributes to the understanding of the role of cholinergic synapses between medial olivocochlear neurons and outer hair cells during selective attention to visual stimuli.

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas sensoriales detectan y procesan los estímulos que nos llegan desde el entorno, permitiéndonos responder a estos modificando nuestra conducta. Uno de los sistemas sensoriales involucrados en este proceso es el sistema auditivo, cuya función es detectar vibraciones mecánicas externas, las que son transducidas en las células ciliadas del oído interno. Las células ciliadas cocleares hacen sinapsis con neuronas del nervio auditivo. Estas conducen las respuestas a los estímulos sensoriales en forma de potenciales de acción por la vía auditiva para ser interpretada como sonido por el cerebro. A continuación se describen los mecanismos fisiológicos involucrados en la detección de estímulos auditivos en mamíferos.

Las ondas acústicas del medio externo son captadas por el oído externo, posteriormente son transmitidas a través del oído medio hacia la cóclea, donde se encuentra el órgano de Corti, que permite transducir las vibraciones mecánicas en cambios del potencial de membrana debido a la presencia de células receptoras (Elgoyhen et al, 2009). Existen aproximadamente 16.000 de estas células pilosas en cada cóclea humana que están dispuestas en cuatro filas, de las cuales tres son de células ciliadas externas (CCE) y una de células ciliadas internas (CCI) (Elgoyhen et al, 2012). La información auditiva es conducida desde la cóclea al sistema auditivo central a través de la vía auditiva principal que incluye al nervio auditivo, núcleo coclear, complejo olivar superior

(COS), lemnisco lateral, colículos inferiores, tálamo auditivo (cuerpo geniculado medial) y la corteza auditiva (Delano et al, 2012) (figura 1).

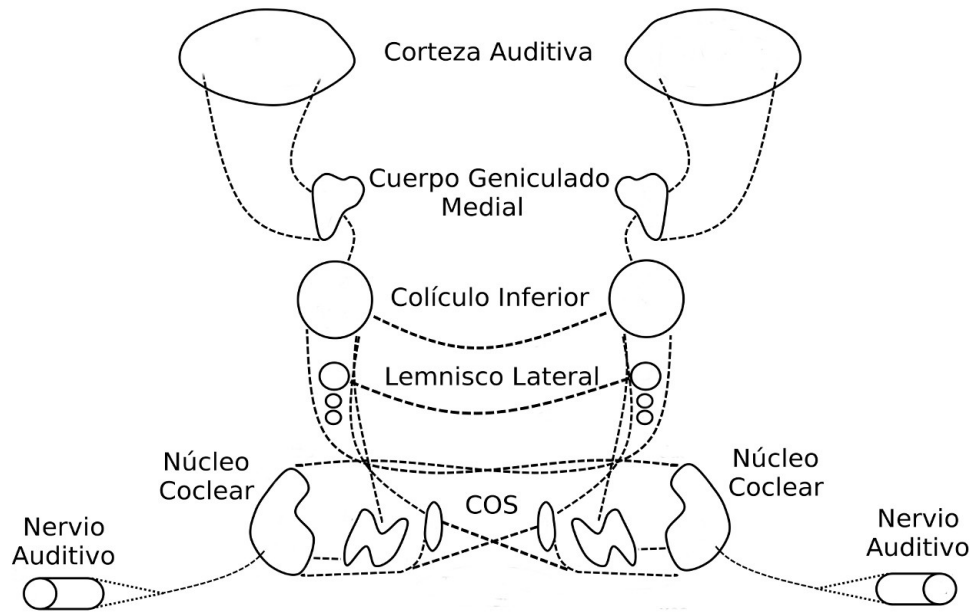


Figura 1. Diagrama de las vías aferentes auditiva. Las líneas segmentadas muestran las conexiones ascendentes y cruzadas desde el nervio auditivo a la corteza auditiva. Modificada de Delano et al, 2012.

Además de la vía auditiva principal que va a la corteza auditiva, existen otras vías cerebrales que transmiten información auditiva asociada a estímulos que requieren respuestas emocionales, por ejemplo, en la detección de un estímulo auditivo asociado al peligro. Este tipo de información es conducida a la amígdala a través del tálamo auditivo mediante una vía directa y una vía indirecta mediada por la corteza (LeDoux et al, 1997) (figura 2). La primera vía al ser más corta y rápida proporciona una información que permite responder rápidamente al estímulo, mientras que la segunda al ser más lenta permite un

procesamiento perceptual más exhaustivo evitando respuestas inadecuadas (LeDoux et al, 1997).

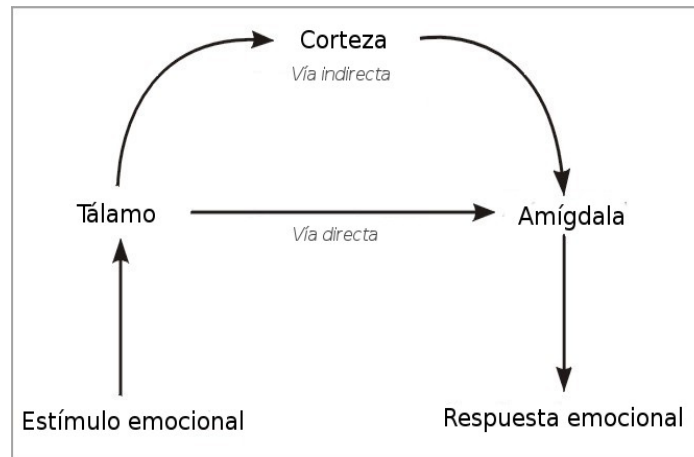


Figura 2. Diagrama de la vía auditiva directa e indirecta a la amígdala. Modificada de LeDoux et al, 1999.

Por otra parte, además de los circuitos aferentes que van desde la periferia hacia los núcleos centrales existe una información auditiva que va desde los centros nerviosos centrales hacia la periferia. Esta se transmite a través del sistema eferente auditivo que va desde la corteza auditiva hacia el tálamo auditivo y los colículos inferiores, y desde aquí al COS y finalmente a la cóclea, innervando directamente a las CCE a través de neuronas olivococleares mediales (OCM) (Brown et al, 1987). De esta manera las vías neuroanatómicas del sistema eferente auditivo tienen un rol fundamental en la modulación del sistema aferente, formando varios circuitos de retroalimentación.

En las siguientes páginas se presenta una revisión actualizada de la anatomía y función del sistema eferente auditivo, presentando además la

evidencia que soporta los fundamentos e hipótesis de esta propuesta experimental.

1.1 Anatomía del sistema eferente auditivo

El sistema eferente auditivo se origina a partir de proyecciones descendentes de neuronas piramidales ubicadas en la capa V y VI de la corteza auditiva. Estas inervan al colículo inferior, al complejo olivar superior, al tálamo auditivo y al núcleo coclear (Coomes et al, 2005) (figura 3).

Desde el complejo olivar superior se originan fibras olivococleares (OC) que inervan directamente la cóclea y según su anatomía se pueden clasificar en dos grupos: olivococleares laterales (OCL) y OCM (Mulders et al, 2000). Las primeras se caracterizan por ser fibras delgadas y no mielinizadas que hacen contacto sináptico con las fibras aferente del nervio auditivo, en la parte inferior de las CCI, mientras las segundas son fibras gruesas y mielinizadas que inervan directamente a la región basolateral de las CCE (Warr et al, 1992).

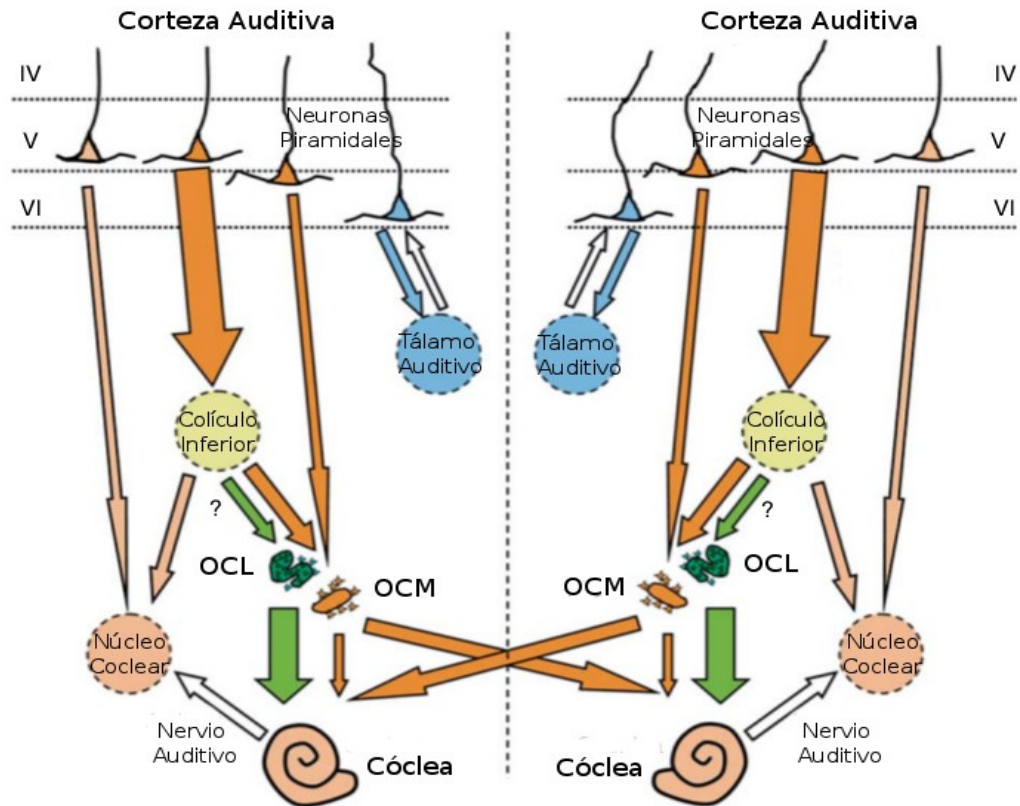


Figura 3. Diagrama de las vías eferentes córtico-cocleares. Las flechas celestes muestran las proyecciones que emergen desde la capa VI de la corteza cerebral al tálamo auditivo. Las flechas naranjas indican las proyecciones al colículo inferior ipsilateral y al núcleo coclear. Las flechas beige indican las proyecciones desde diferentes poblaciones de neuronas de la capa V al núcleo coclear. Las flechas verdes indican las proyecciones desde las fibras del OCL a la cóclea y las posibles conexiones del colículo inferior a las fibras OCL (flecha verde). Modificada de Robles y Delano, 2008.

La sinapsis que se realiza entre las fibras OCM y las CCE es de carácter inhibitorio a través de un mecanismo indirecto, siendo el principal neurotransmisor involucrado la acetilcolina (ACh) (Eybalin et al, 1993), aunque se ha demostrado en algunas especies la liberación de GABA y CGRP (Raphael et al, 2003). La ACh activa a un receptor nicotínico formado por cinco

subunidades con estequiometría $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ (Plazas et al, 2005), que se ubica en la CCE y que corresponde a un canal iónico de alta permeabilidad al Ca^{+2} (Elgoyhen et al, 1994).

El receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$ presenta un perfil fisiológico poco usual, ya que posee características tanto muscarínicas como nicotínicas además de poseer un patrón de transcripción restringido a la cóclea y no al sistema nervioso central (Verbitsky et al, 2000). La unión de dos moléculas de ACh al receptor nicotínico provoca una corriente de entrada de Ca^{+2} a la CCE y ésta provoca la apertura de los canales SK2 (canal de potasio dependiente de calcio de conductancia pequeña) de la membrana basolateral de las CCE, lo que genera hiperpolarización de la célula (Marcotti et al, 2004) (figura 4).

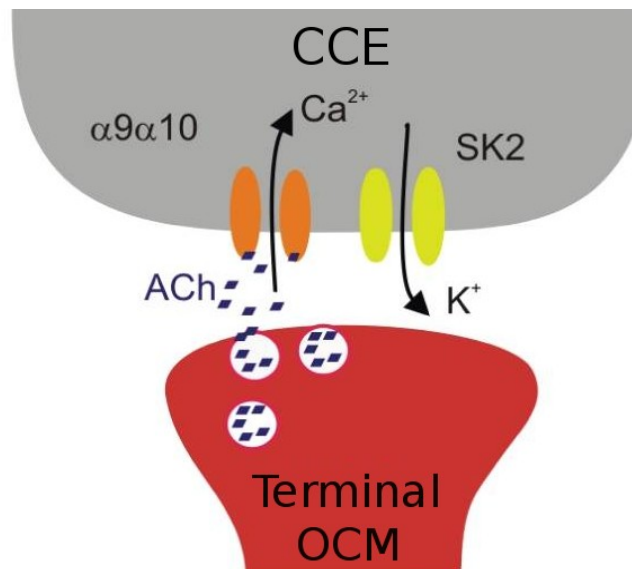


Figura 4. Diagrama de la sinapsis entre las fibras OCM con las CCE. Las moléculas de ACh liberadas se unen al receptor $\alpha 9/\alpha 10$ presente en las CCE lo que produce la entrada de Ca^{+2} que activa los canales SK2, lo que produce una corriente de salida de iones K^+ , provocando hiperpolarización de la CCE. Modificada de Taranda et al, 2009.

A pesar que el receptor homomérico recombinante $\alpha 9$ es funcional, el similar $\alpha 10$ no lo es (Elgoyhen et al, 2001). La subunidad $\alpha 10$ sirve como componente estructural que aumenta la dependencia al voltaje-corriente y la sensibilidad al calcio (Sgard et al, 2002).

1.2 Fisiología del sistema olivococlear

La fisiología de las fibras OCM puede ser estudiada a través de la estimulación eléctrica del cuarto ventrículo. Esto provoca la estimulación exclusiva de las neuronas OCM, que proyectan a la cóclea contralateral cruzando el piso del cuarto ventrículo, sin afectar la respuesta sobre las fibras OCL que proyectan principalmente de manera ipsilateral (Liberman et al, 1998). Esta estimulación produce una disminución en la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC) que es una respuesta neural combinada y sincronizada del nervio auditivo y un aumento de los potenciales de receptor o potenciales microfónicos cocleares (MC) (Galambos et al, 1956; Elgueda et al, 2011). De esta forma, este patrón de modificación disociado del PAC y MC se utiliza como un signo de activación de fibras OCM.

1.3 Probables funciones del sistema eferente auditivo

Algunas de las funciones propuestas del sistema eferente auditivo son la

protección frente al daño provocado por estímulos auditivos de alta intensidad (> 85 dB SPL (nivel de presión sonora)) (Maison et al, 2000), el anti-enmascaramiento de estímulos acústicos en presencia de ruido de fondo (Kawase et al, 1993), la modulación auditiva durante los ciclos de sueño/vigilia (Velluti et al, 1989) y la modulación de la sensibilidad coclear durante la atención selectiva (Oatman et al, 1971; Delano et al, 2007).

La atención selectiva corresponde al proceso en el cual el sujeto se enfoca en un canal sensorial o en una dimensión del estímulo mientras ignora el resto (Steckler et al, 1996). En investigaciones de atención selectiva a estímulos visuales con presentación de estímulos auditivos, se ha observado una disminución de las respuestas evocadas en el núcleo coclear (Hernández-Peón et al, 1956), en el nervio auditivo (Oatman et al, 1971) e incluso a nivel de potenciales cocleares en chinchillas (Delano et al, 2007). Específicamente en este último estudio, se registró el PAC mientras las chinchillas realizaban pruebas de atención selectiva a estímulos visuales en presencia de distractores auditivos y se constató una disminución del PAC y un aumento del potencial MC cuando las respuestas entregadas eran correctas (Delano et al, 2007). Estos resultados sugieren un efecto inhibitorio de parte del sistema eferente auditivo sobre las respuestas cocleares, que se relaciona conductualmente con la posibilidad de evadir un distractor auditivo. Sin embargo, aún no se ha comprobado que este efecto dependa de la sinapsis $\alpha 9/\alpha 10$ del sistema olivococlear medial en las CCE.

1.4 Ratón genéticamente modificado para el receptor nicotínico $\alpha 9$ (KO- $\alpha 9$)

El estudio de este receptor y del sistema eferente auditivo ha permitido el desarrollo de un ratón genéticamente modificado que carece del gen que codifica para la subunidad $\alpha 9$ del receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$ (Vetter et al., 1999). Este grupo de investigadores demostró que al realizar estimulación eléctrica de las fibras eferentes olivococleares en ratones KO- $\alpha 9$ no se produjo disminución del PAC y la electromotilidad de las CCE no se vio afectada, lo que sugiere que la mantención de la función eferente es dependiente de la presencia de este receptor (He et al, 2004). Por otra parte, no existen diferencias en los umbrales auditivos, ni en la detección de tonos entre el ratón KO- $\alpha 9$ con el tipo silvestre (*wild type* (WT)) (Prosen et al., 2000, May et al, 2002), a pesar de esto, aún no se ha evaluado el desempeño del ratón KO- $\alpha 9$ en tareas de atención selectiva a estímulos visuales en presencia de distractores auditivos.

1.5 Estímulos auditivos y comportamiento

Los estímulos auditivos de alta intensidad (> 85 dB SPL) pueden producir un cambio en el comportamiento de animales, de hecho, este tipo de estimulación es ampliamente utilizada como modelo de ansiedad y depresión en ratas (Evans et al, 2002). Se ha observado en estudios de tinnitus (fenómeno que consiste en la percepción de sonido en ausencia de estimulación auditiva o

eléctrica (McKenna et al, 2014)) generado por la exposición a sonidos intensos, que la amígdala podría estar siendo activada debido a la elevación del flujo sanguíneo cerebral regional (Shulman et al, 1995) y al incremento de la inmunoreactividad de *c-fos* (Wallhausser-Franke et al, 2003). Por lo tanto, es importante evaluar la ansiedad en animales luego de exponerlos a estímulos auditivos de alta intensidad.

1.6 Ansiedad y tareas cognitivas

A pesar que no se ha descrito con precisión el impacto de la ansiedad sobre los procesos cognitivos, sí se ha observado una estrecha relación (Robinson et al, 2013), siendo para algunos autores la disfunción cognitiva una de las características primarias de la ansiedad patológica (McNaughton et al, 1997; Hindmarch et al, 1998). Para entender esta relación en ratones, un grupo de investigadores utilizaron un tablero agujereado modificado, que consiste en una arena cerrada con agujeros en la superficie donde se deposita comida como recompensa y luego se esconde colocando un cilindro sobre cada agujeros. Este ensayo permite medir tareas espaciales y visuo-espaciales en paralelo a la ansiedad y se observó que los ratones ansiosos (están menos tiempo con la cabeza inclinada hacia el interior de los cilindros) desempeñan una peor tarea cognitiva (aciertan menos al agujero correcto, el que contenía la comida), concluyendo que hay estrecha relación entre la ansiedad y el desarrollo de

tareas cognitivas (Ohl et al, 2003).

Además, es importante tener en cuenta que hay notorias diferencias de comportamiento (tareas de memoria, aprendizaje, motoras, etc.) según la cepa de ratón que se estudie (Rogers et al, 1999). Los ratones KO- α 9 provienen, en parte de la cepa C57BL/6J, que ha sido descrita como unas de las que presenta mayor ansiedad (Trullas et al, 1993), además de ser utilizada ampliamente en estudios de impulsividad (Helms et al, 2006; Loos et al, 2010).

1.7 Propuesta

En esta tesis se busca determinar que la modulación de la sensibilidad coclear producida durante tareas de atención visual selectiva es mediada por el receptor nicotínico α 9/ α 10 en la sinapsis entre OCM y CCE. Se realizó mediante el entrenamiento de ratones KO- α 9 y WT en la tarea de atención selectiva a estímulos visuales en presencia de los distractores auditivos (i) clics y tonos, (ii) ruido blanco. Además, se busca determinar si el distractor auditivo produce cambios en el estado de ansiedad entre estos genotipos.

2. HIPÓTESIS

El desempeño conductual durante una prueba de atención selectiva a estímulos visuales en presencia de distractores auditivos es dependiente de la sinapsis entre las fibras olivococleares mediales y las células ciliadas externas mediada por el receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$.

2.1 *Objetivo general*

Estudiar el rol del receptor $\alpha 9/\alpha 10$ en la conducta de atención selectiva a estímulos visuales en presencia de distractores auditivos y su relación con la conducta ansiogénica en ratones expuestos a estímulos auditivos.

2.2 *Objetivos específicos*

- Evaluar el papel del receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$ en la tarea de atención selectiva a estímulos visuales comparando los parámetros conductuales entre los ratones KO- $\alpha 9$ y *wild type*.
- Evaluar el efecto de los estímulos auditivos intensos en la ansiedad en ratones KO- $\alpha 9$ y *wild type* mediante ensayos conductuales.
- Estudiar la relación entre la ansiedad y el desempeño en tareas de atención selectiva a estímulos visuales.

3. METODOLOGÍA

3.1 Animales

Se utilizaron 10 ratones WT y 9 ratones KO $\alpha 9$ -nAChR machos de entre 60 y 80 días post-natal al inicio del entrenamiento y con un peso entre 23 y 35 gramos. Los ratones son procedentes de la cruce de *CBA/CaJ* x *129S4/SvEv* (Vetter et al., 1999). Fueron criados en grupos de a dos en cajas de policarbonato (27,5 cm de largo, 16,5 cm de ancho, 13,0 cm de alto) dentro de una sala apropiada para estos fines con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (la luz se enciende a las 8.00 A.M.) y una temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Los ratones contaron con acceso *ad-libitum* al agua y fueron privados de alimento diariamente solo durante el periodo experimental hasta que alcanzaron entre un 88-92% de su peso *ad-libitum* inicial. Los animales fueron manipulados y pesados todos los días por los mismos investigadores, quienes además realizaron todos los experimentos conductuales bajo la modalidad *ciego*, por lo que el perfil genético de los ratones fue desconocido hasta finalizado el protocolo conductual. Con el fin de confirmar el perfil genético de los animales, una vez finalizado el protocolo conductual se realizó la genotipificación mediante PCR de ADN extraído del tejido obtenido de la cola de los animales.

Los procedimientos cumplieron con las reglas internacionales para

experimentación con animales de acuerdo a la «*Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals*» (publicación número 86-23 National Institute of Health, 1996) y se enmarcaron dentro del proyecto aprobado por el comité de Bioética Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, CBA #0548 FMUCH.

3.2 Genotipificación de ratones

El ADN de los ratones se obtuvo digiriendo parte de la cola (aproximadamente 0,5 cm de largo) en 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 0,5 mM, EDTA 0,5 M, SDS 10%, NaCl 1,2%) y 6 µl de Proteinasa K 20 mg/ml durante 120 minutos a 55°C con agitación para desintegrar el tejido y dejar el ADN en suspensión. Luego el homogenizado se centrifugó por 10 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se recuperó y se le agregó 1,5 volumen de isopropanol 100% para precipitar el ADN. El *pellet* se centrifugó una vez más y se resuspendió en 50 µl de agua estéril e incubó a 50°C por 5 minutos para finalmente ser guardado a -20°C.

La técnica de PCR para genotipificación se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 12,5 µl de una solución GoTaq® DNA polymerase (contiene la enzima ADN polimerasa Taq en un buffer con MgCl₂), 8,5 µl de agua, 2 µl de ADN, 0,5 µL de partidor α9-1 20 µM (5' CTGGACCTACAATGGAAACC 3'), 0,5 µL de partidor α9-2 20 µM (5' GATCTCTGCCACCATTAGCT 3'), 0,5 µL de partidor KNeo3 20 µM (5' CTGTGCTCGACGTTGTCACT 3'), 0,5 µL de partidor

KNeo4 20 μ M (5' CGAGCTCTAGAGATTTGATC 3'). El tamaño del fragmento amplificado fue de 383 pb, en el caso de poseer la secuencia α 9 (ratones WT) y de 480 pb en el caso de poseer la secuencia de neomicina (ratones KO, ya que en la generación de estos se introdujo una mutación puntual en el exón 4 y se agregó un *cassette* de neomicina en el intrón 3-4 (Vetter et al., 1999)) y estos fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa 0,8%. Cada fragmento fue amplificado con un programa de PCR que comenzó con un ciclo de 95°C de 2 minutos, luego 30 ciclos de (i) 95°C a 30 segundos, (ii) 57°C a 60 segundos y (iii) 72°C a 90 segundos, finalizando con un ciclo de 10 minutos a 72°C.

3.3 Ensayo de atención visual

Los ratones fueron entrenados en una tarea de discriminación de estímulos visuales de dos opciones similares a los usados anteriormente en chinchillas (Delano et al., 2007) y ratas (Hamame et al., 2006, 2008). Se utilizó una caja operante (17 cm de largo, 20 cm de ancho, 28 cm de altura) en una sala sonoro-amortiguada. El panel frontal de la caja operante poseía 2 luces laterales y una luz central como lo muestra la figura 5.

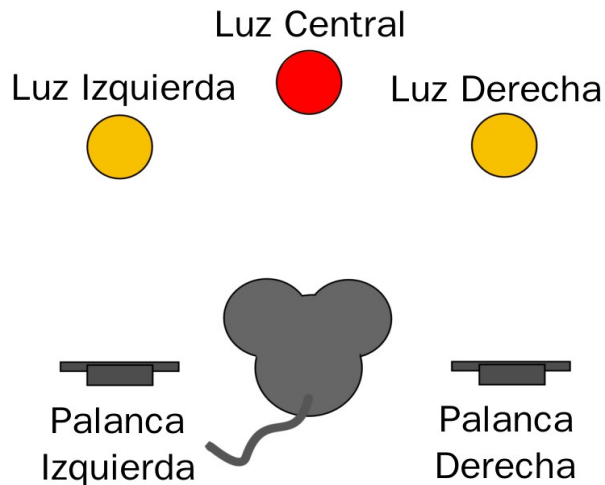


Figura 5. Diagrama esquemático del panel frontal de la caja operante.

Cada ensayo se inició con la presentación de una luz central durante 2 segundos, tras lo cual se encendió al azar una de las 2 luces laterales por un periodo de 0,5 segundos (figura 6).

Las respuestas se clasificaron en:

- Correctas: Cuando el ratón presionó la palanca situada bajo la luz lateral que se encendió (luz objetivo) dentro de un tiempo igual o menor a 5 segundos desde su encendido. Esta respuesta fue recompensada con 14 mg de un pellet diseñado para estos fines (*Dustless precision pellet*, Bioserv®, EEUU).
- Incorrectas: Cuando el ratón presionó la palanca contraria a la luz objetivo durante el tiempo igual o menor a 5 segundos desde su encendido.
- Omitidas: Cuando el ratón no presionó ninguna palanca durante el

tiempo asignado.

- Anticipada: Cuando presionó cualquiera de las palancas durante el encendido de la luz central.

Luego del tiempo de respuesta existió un intervalo variable de inter-ensayo (ITI) de 8 ± 2 segundos. Las respuestas incorrectas, anticipadas o durante en el intervalo inter-ensayo fueron castigadas apagando todas las luces por 12 segundos.

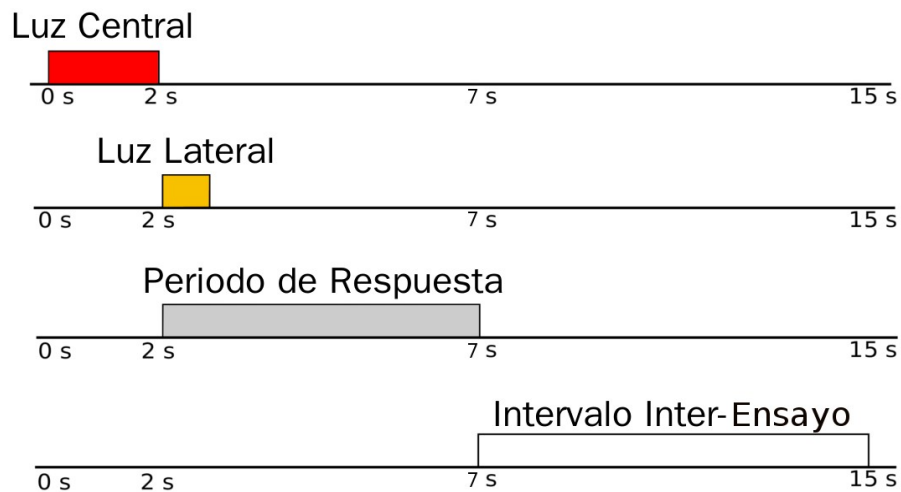


Figura 6. Curso temporal de la tarea de discriminación de estímulos visuales.

Las variables conductuales que fueron medidas son la latencia de las respuestas correctas e incorrectas (tiempo entre el inicio del encendido de la luz lateral y la presión de la palanca correspondiente y contraria respectivamente), latencia de las respuestas anticipadas (tiempo entre el inicio del encendido de la

luz central y la presión de cualquier palanca), porcentaje de eficiencia de respuestas ($[\text{Respuestas correctas}/(\text{respuestas correctas} + \text{incorrectas})] \times 100$), número de respuestas correctas, incorrectas, omitidas, anticipadas, durante el intervalo inter-ensayo y errores (presión de cualquier palanca durante el tiempo de castigo).

Tanto la caja operante como la presentación del estímulo y la adquisición de datos estuvieron controladas por un programa escrito en lenguaje C (desarrollada en LabWindows/CVI 9.0 ©) diseñado en el laboratorio para estos fines.

3.4 Protocolo experimental

Cuando los ratones alcanzaron el criterio de tres días consecutivos de porcentaje de eficiencia de respuestas igual o superior a 70% se dio inicio a la primera parte del protocolo experimental (pre distractor) que consta de la evaluación de su rendimiento durante 12 días, los que fueron divididos en cuatro periodos de tres días (figura 7). Cada día del protocolo experimental comprendía una sesión con un total de 154 ensayos.

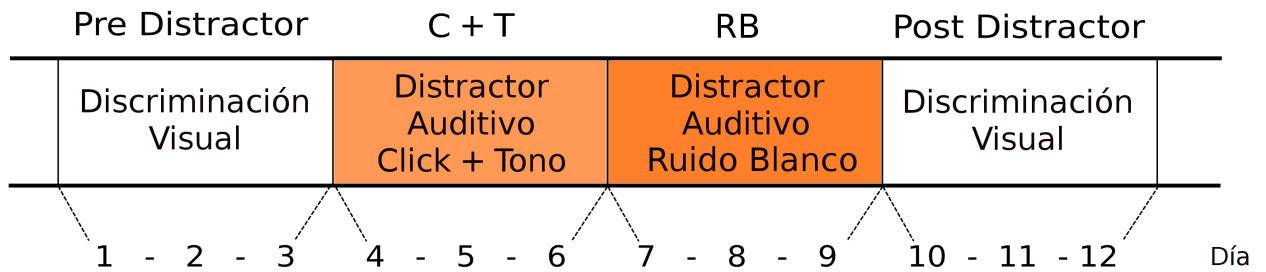


Figura 7. Protocolo experimental de evaluación conductual. La figura muestra los 12 días del protocolo experimental, los cuales pueden ser divididos en fases cada una de 3 días. La primera fase (pre distractor), así como la última (post distractor) consiste en la realización de la prueba en ausencia de distractores auditivos. Las fases C+T y RB consiste en la aplicación de la prueba en presencia de distractores auditivos. C+T: Click + Tono, RB: Ruido Blanco.

En los tres primeros días (periodo pre distractor) los ratones realizaron la tarea de discriminación visual de dos opciones sin distractores auditivos. En el segundo periodo de tres días se presentaron clics y tonos de 15 kHz a 69 dB SPL y durante el tercer periodo de tres días se presentó un ruido de banda ancha (ruido blanco filtrado con pasa banda entre 5 a 40 kHz) a menos de 90 dB SPL. Finalmente, en los últimos tres días de protocolo experimental (periodo post distractor) los ratones fueron nuevamente evaluados en la tarea de discriminación visual de dos opciones sin distractores auditivos para evaluar y discutir el efecto temporal del entrenamiento.

3.5 Distractores auditivos

Los distractores auditivos utilizados en el protocolo experimental fueron:(i) clics (100 μ s de duración) y tonos de 15 kHz con una duración de 150 ms y (ii) ruido de banda ancha (5-40 kHz) de 150 ms de duración. Los tonos y ruidos blancos fueron construidos con una rampa (ascenso/descenso) de 5 ms.

Todos los estímulos acústicos fueron generados digitalmente a 100 kHz con una tarjeta National Instruments® (PC-MIO-16E4). Para disminuir la habituación de los ratones a los distractores auditivos este fue presentado a intervalos irregulares (2,5 Hz). Los clics, tonos y ruido de banda ancha fueron presentados a través de un altavoz (Realistic super tweeter, Radioshack®, 5-40 kHz respuesta de frecuencia) puesto a 120 cm sobre la base de la caja operante. La calibración de la presión de sonido dentro de la caja operante fue realizada con un micrófono 1/2" Bruel and Kjaer® (Nærum, Denmark) que revela una variación menor a 5 dB en las diferentes posiciones de la jaula.

3.6 Respuesta auditiva del tronco cerebral (ABR)

Se pueden registrar los potenciales evocados del nervio auditivo y de las estructuras del tronco cerebral a través de electrodos posicionados en el cuero cabelludo (Jewett et al., 1970). Se ha observado en las cepas genéticamente relacionadas con 129/SvEv una pérdida temprana de la audición (Zheng et al.,

1999), por lo que fue necesaria la medición de la respuesta auditiva del tronco cerebral para determinar si presentaban un grado de sordera, además de poder validar la percepción del distractor auditivo en todos los ratones evaluados durante el protocolo conductual.

Los potenciales evocados fueron registrados en los 10 ratones WT y 8 ratones KO- α 9 (un ratón KO murió antes de realizar la evaluación electrofisiológica) anestesiándolos mediante inyecciones intraperitoneales de xilacina (0.5 mg/kg) y ketamina (100 mg/kg) preparada en suero. La temperatura del cuerpo se mantuvo a 37-38°C mediante una almohadilla de calefacción. Se obtuvieron dos mediciones diferentes usando una ráfaga de tonos ipsilateral de 15kHz: (i) umbrales de ABR de la onda V (usando diferentes niveles de presión sonora, desde 0 a 90 dB SPL) y (ii) supresión contralateral con ruido blanco de la onda I obtenida con 15 kHz a 60 dB SPL. La onda V fue escogida para obtener los umbrales auditivos, ya que es la respuesta más constante a estímulos auditivos mientras que la onda I fue escogida para la evaluación del ruido contralateral como medición de la fuerza de la supresión del reflejo olivococlear en la respuesta del nervio auditivo (Lichtenhan et al., 2015).

El estímulo auditivo usado en la estimulación de los umbrales auditivos y en la supresión de la onda I fue: (i) tonos de 15 kHz ipsilateral (derecho) de polaridad alterna (duración de 15 ms, 5 ms de tiempo de rampa de ascenso/descenso) entregado a diferentes niveles de presión sonora con el fin

de obtener el umbral auditivo al tono utilizado como distractor. El ruido blanco (5-40 kHz) fue presentado de forma contralateral al estímulo y tuvo una duración de 200 ms y fue entregado a 55-60 dB SPL. Los tonos y el ruido de banda ancha fueron presentados a una tasa de 4 Hz y fueron digitalmente generados por dos tarjetas National Instruments® PCI boards (6071-E) sincronizadas a 100,000 muestras/s, atenuados por un atenuador programable PA-5 (Tucker Davis Technologies® system III) y entregadas por 2 tweeters (uno para el estímulo auditivo ipsilateral y el segundo para ruido el contralateral).

Las señales de ABR fueron adquiridas mediante una técnica similar a la descrita por Melki et al., 2014. Se insertaron dos electrodos subcutáneos de aguja localizados detrás de la oreja izquierda y derecha en dirección a la ventana redonda y un tercer electrodo en la línea media del cráneo como electrodo de referencia. Las señales electrofisiológicas fueron amplificadas 10,000x y filtradas entre 0,3 y 3 kHz usando un preamplificador diferencial BMA-200 (Cwe-inc®) y un segundo filtro (Krohn-Hite®, model 3323). Las señales fueron adquiridas y digitalizadas a 40,000 muestras/s con una tarjeta National Instruments® PCI boards (6071-E). Las amplitudes de los potenciales evocados (ABR de la onda I y V) fueron obtenidos por un promedio de 512 pruebas, sin y con ruido contralateral usando un programa diseñado en el laboratorio para estos fines (LabWindows®).

Los umbrales de ABR fueron definidos como las más baja intensidad del tono (dB SPL) que fue capaz de evocar una respuesta electrofisiológica

evaluada por reconocimiento visual del investigador. La atenuación efectiva en la amplitud de la onda I de los ratones WT y KO $\alpha 9$ -nAChR por ruido contralateral fue calculada en dB referenciado a la amplitud de la onda I sin ruido contralateral:

$$\text{dB}_{\text{reducción de amplitud}} = 20 * \text{Log}_{10} \left[\frac{\text{amplitud de la onda I con ruido}}{\text{amplitud de la onda I sin ruido}} \right]$$

Todos los procedimientos electrofisiológicos fueron realizados por el mismo investigador bajo modalidad ciego para el genotipo del animal y llevadas a cabo en una sala sono-amortiguada una vez que el protocolo experimental conductual finalizó.

3.7 Prueba de campo abierto

Se utilizó un paradigma de campo abierto (*“open field”*) con el fin de realizar un análisis de la actividad motora, exploratoria y ansiedad de los ratones antes del inicio del protocolo experimental. El campo abierto se compone de una superficie cuadrada (50 cm x 50 cm x 22 cm de alto) subdividida digitalmente, para efectos de análisis, en un cuadrado céntrico (25 cm x 25 cm) y periferia. La superficie, así como todo el aparato, fue construido en acrílico y de color gris claro de acuerdo a las especificaciones de Seibenhener y Wooten, 2015.

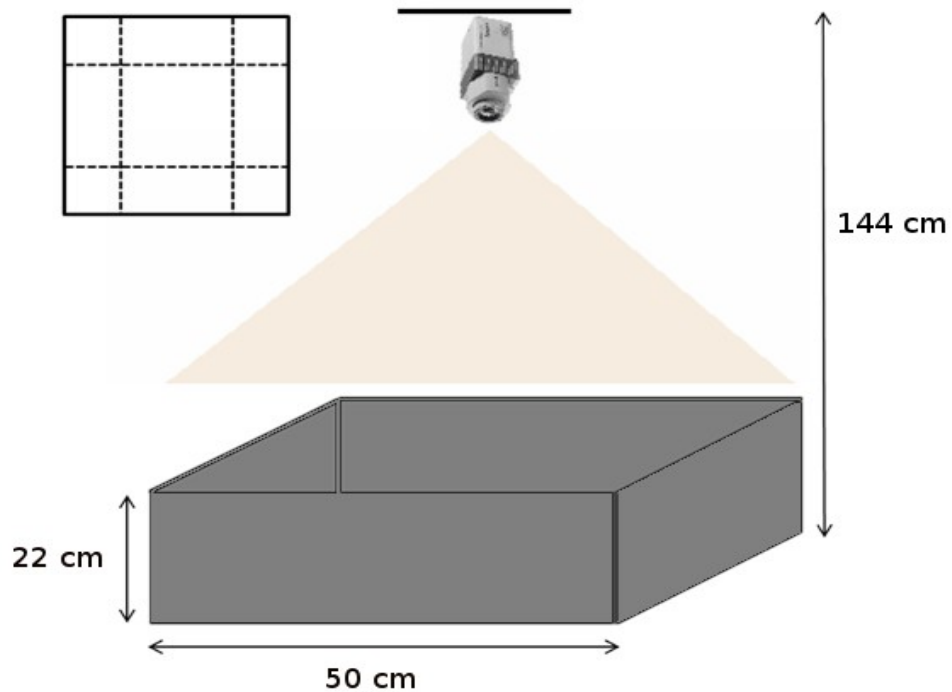


Figura 8. Diagrama con las dimensiones del campo abierto.

Todos los ensayos fueron realizados el mismo día colocando a los animales seleccionados aleatoriamente en el centro del campo abierto permitiendo que se moviera libremente durante 5 minutos, tiempo en el que fue grabado a través de una cámara posicionada a 144 cm sobre la estructura. La intensidad de la luz fue medida con un luxómetro, el promedio en el centro del laberinto fue 40 lux con una variación de 2 lux en la periferia. Las grabaciones fueron analizadas mediante el software ANY-maze 4.70 (Stoelting Co, Illinois, EE.UU) evaluando las siguientes variables conductuales: (i) tiempo de permanencia en la zona céntrica y periférica, (ii) visitas a cada zona, (iii) distancia total recorrida en cada zona. Este análisis permitió obtener

información de la actividad locomotora, exploratoria y una medida de ansiedad (Prut et al., 2002), y así descartar posibles efectos de la actividad locomotora o ansiedad en el rendimiento durante el ensayo de atención selectiva a estímulos visuales.

3.8 Laberinto en cruz elevado

El laberinto en cruz elevado (LCE) es un paradigma conductual ampliamente usado para medir la respuesta de ansiedad de los ratones (Pellow et al., 1985) la cual fue medida posterior al protocolo conductual. El LCE consiste en una cruz conformada por cuatro brazos perpendiculares (dos abiertos sin paredes y dos cerrados por paredes de 16 cm de altura) de igual dimensión (30 cm x 5 cm) y una plataforma central (5 cm x 5 cm). Los brazos cerrados así como los abiertos están posicionadas en forma opuesta entre sí. Al igual que el campo abierto, toda la estructura era de acrílico y de color gris claro, además se encontraba elevado a 40 cm de altura sobre una plataforma metálica.

El LCE fue realizado en el interior de una sala iluminada por 3 ampolletas ubicadas en la parte superior del aparato y de una intensidad de 100 W conectada a un *dimmer* que permitía regular la intensidad lumínica y producir una iluminación consistente en los brazos. El LCE se ubicó dentro de un sector de la sala rodeado con cortinas negras para evitar la visualización de cualquier distractor visual cuando los ratones se encontraran en el brazo abierto. La

intensidad de la luz fue medida con un luxómetro, el promedio en el brazo abierto fue 105 lux y en el brazo cerrado 75 lux, con una variación menor a 10 lux entre los brazos opuestos. El paradigma conductual se inició ubicando al ratón en el centro del laberinto mirando hacia uno de los brazos abiertos, tras lo cual se permitía que explorara libremente durante 5 minutos, tiempo durante el cual fue grabado por una cámara. Las grabaciones fueron analizadas mediante el software ANY-maze 4.70 evaluando los siguientes parámetros: (i) número de ingreso y porcentaje total de ingreso a los brazos cerrados y abiertos, (ii) tiempo de permanencia en los brazos, (ii) distancia recorrida en los brazos y la distancia total recorrida en el laberinto.

Un mayor número de ingresos o mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados es considerado un comportamiento ansioso (Pellow et al, 1985). El fundamento de este ensayo se basa en la preferencia de los roedores por los espacios cerrados frente a los abiertos, la exposición a un ambiente novedoso promueve tanto la exploración como el miedo, generando un conflicto de aproximación/evitación (Montgomery., 1955).

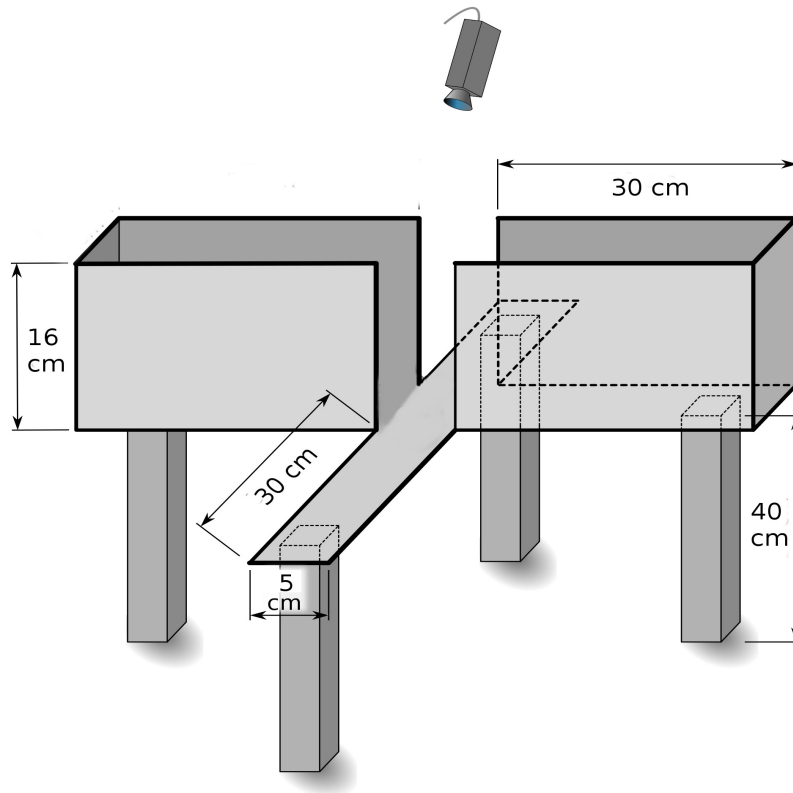


Figura 9. Esquema con las dimensiones del laberinto en cruz elevado. Dimensiones y protocolo basados en Walf y Frye, 2007.

3.9 Análisis estadísticos

Se utilizó un test Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos. En los casos de una distribución normal se usó un ANOVA de medidas repetidas de dos vías (RM-ANOVA) para comparar las diferencias entre los días (Genotipos [WT, KO] x Días [1 a 12]), periodos (Genotipos [WT, KO] x Periodos [Pre distractor, T+C, RB, Post distractor]) y bloques a lo largo de la sesión (Genotipos [WT, KO] x Bloques [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]). Los datos con distribución no normal fueron transformados según la fórmula: $\text{Log}(X+1)$ para satisfacer los

requerimientos del modelo de ANOVA. A estos análisis se le realizó una prueba *post-hoc* Bonferroni.

Las diferencias en las distribuciones de las latencias entre ratones WT y KO fue evaluada a través de una prueba Kolmogorov-Smirnov y en los parámetros medidos por el campo abierto y el laberinto en cruz elevado por t-test. Para evaluar las correlaciones entre las variables conductuales se usó una correlación de Spearman. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como valor de diferencia significativa en todas las pruebas estadísticas.

4. RESULTADOS

Para comunicar los resultados de forma comprensible, se dividió la totalidad de los resultados en cuatro secciones: (4.1) genotipificación, (4.2) comportamiento durante protocolo experimental, (4.3) actividad locomotora y ansiedad, (4.4) electrofisiología.

4.1 Genotipificación

Como medida de control experimental del perfil genético de los ratones, se realizaron PCRs de ADN extraído del tejido obtenido de la cola de los animales. Ya que en la generación de los ratones KO se introdujo una mutación puntual en el exón 4 y se agregó un *cassette* de neomicina en el intrón 3-4 (Vetter et al., 1999), su confirmación se realizó mediante partidores específicos para la secuencia de neomicina los que generaron un fragmento amplificado de un tamaño de 480 pb mientras que en los ratones WT se utilizaron partidos específicos para la secuencia $\alpha 9$, los que generaron un fragmento amplificado de un tamaño de 383 pb. Esto fue verificado por electroforesis en geles de agarosa 0,8%. En ninguno de los ratones se observó la banda del cassette de neomicina junta a la secuencia de $\alpha 9$, lo que significó la ausencia de ratones heterocigotos. Los ratones WT presentaron solo la banda de la secuencia $\alpha 9$, es decir, estuvo presente en sus dos alelos (145, 181, 184, 199, 202, 215, 220,

221, 222, 223 en la figura 10), mientras los ratones KO presentaron solo el cassette de neomicina, presente también en sus dos alelos (136, 137, 194, 195, 196, 197, 159, 168, 170 en la figura 10).

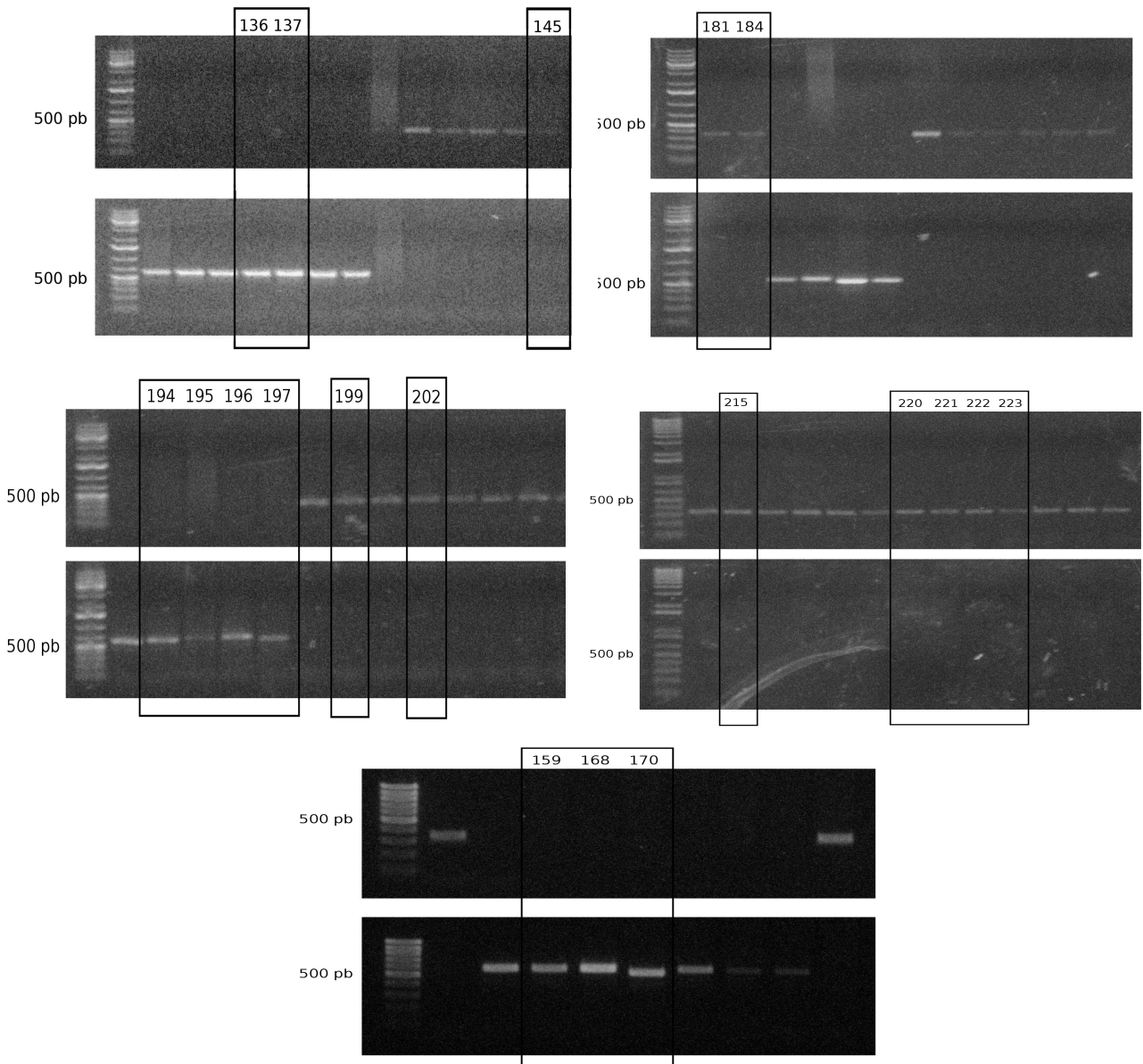


Figura 10. Genotipificación de los ratones WT y KO. En el panel superior de cada imagen se utilizaron los partidores para la secuencia $\alpha 9$ y en la parte inferior partidores para el cassette de neomicina. Cada número representa a uno de los ratones.

4.2 Comportamiento durante el protocolo experimental.

Se entrenaron 10 ratones WT y 9 KO en la tarea de atención visual y se analizaron las variables conductuales de dos formas: (i) durante los 12 días (análisis día por día) y (ii) durante los cuatro periodos del protocolo, lo cual es el promedio de tres días correspondiente a cada etapa del protocolo experimental. (Fig. 7).

4.2.1 Eficiencia de respuestas

El análisis de la eficiencia de respuestas evaluadas durante los 12 días de duración del protocolo mostró que las diferencias no fueron significativas entre ambos genotipos (ANOVA-RM de dos vías, $F_{(1,11)} = 8,535$; $p < 0.001$). Un análisis *post-hoc* de Bonferroni, determinó que existe una tendencia de disminución ($p = 0,06$) en los ratones KO comparadas con los ratones WT para el día 5, lo cual corresponde al segundo día de la presentación del distractor auditivo C+T (WT = $87,35\% \pm 4,42$ (promedio \pm desviación estándar); KO = $80,13\% \pm 9,98$) (figura 11A). Esta diferencia en el segundo día del periodo T+C no fue suficiente para que el periodo completo fuera significativamente diferente entre ambos genotipos, sin embargo, al comparar los periodos dentro del mismo genotipo se observaron diferencias significativas (ANOVA-RM de dos vías, $F_{(1,3)} = 14.771$; $p < 0.001$). Un análisis *post-hoc* Bonferroni determinó que

existieron diferencias en los ratones WT entre el periodo pre distractor y el periodo de distractor auditivo C+T, RB y post distractor. En cambio, en los ratones KO las diferencias estuvieron entre el periodo pre distractor con el periodo de distractor auditivo ruido blanco y post distractor, además entre el periodo de distractor auditivo click + tono y post-distractor (figura 12A).

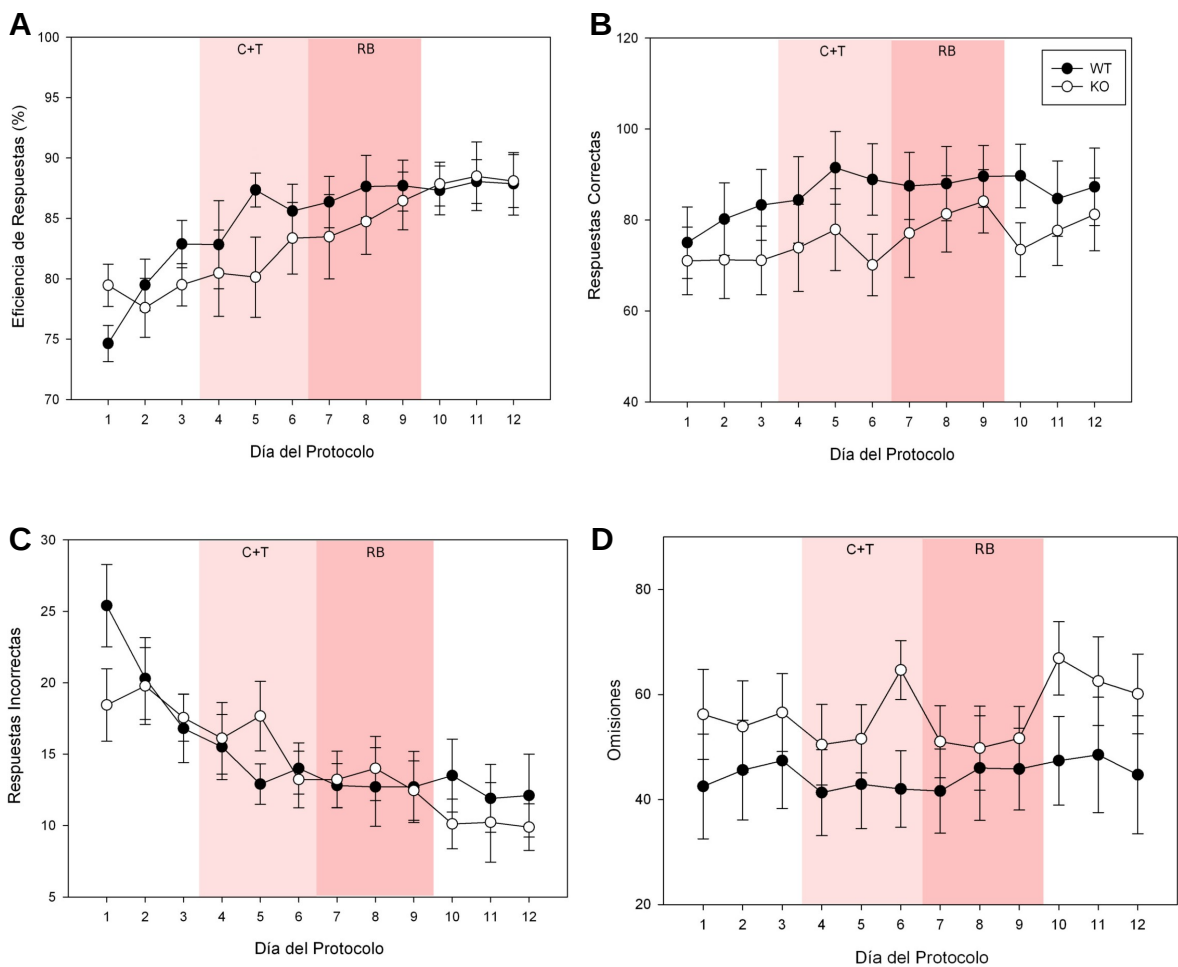


Figura 11. Desempeño conductual de los ratones WT y KO en los 12 días del protocolo experimental. A. Eficiencia de respuestas B. Número de respuestas correctas. C. Número de respuestas incorrectas. D. Número de respuestas omitidas. Los puntos negros y blancos representan el promedio \pm error estándar de los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente. ANOVA-RM de dos vías.

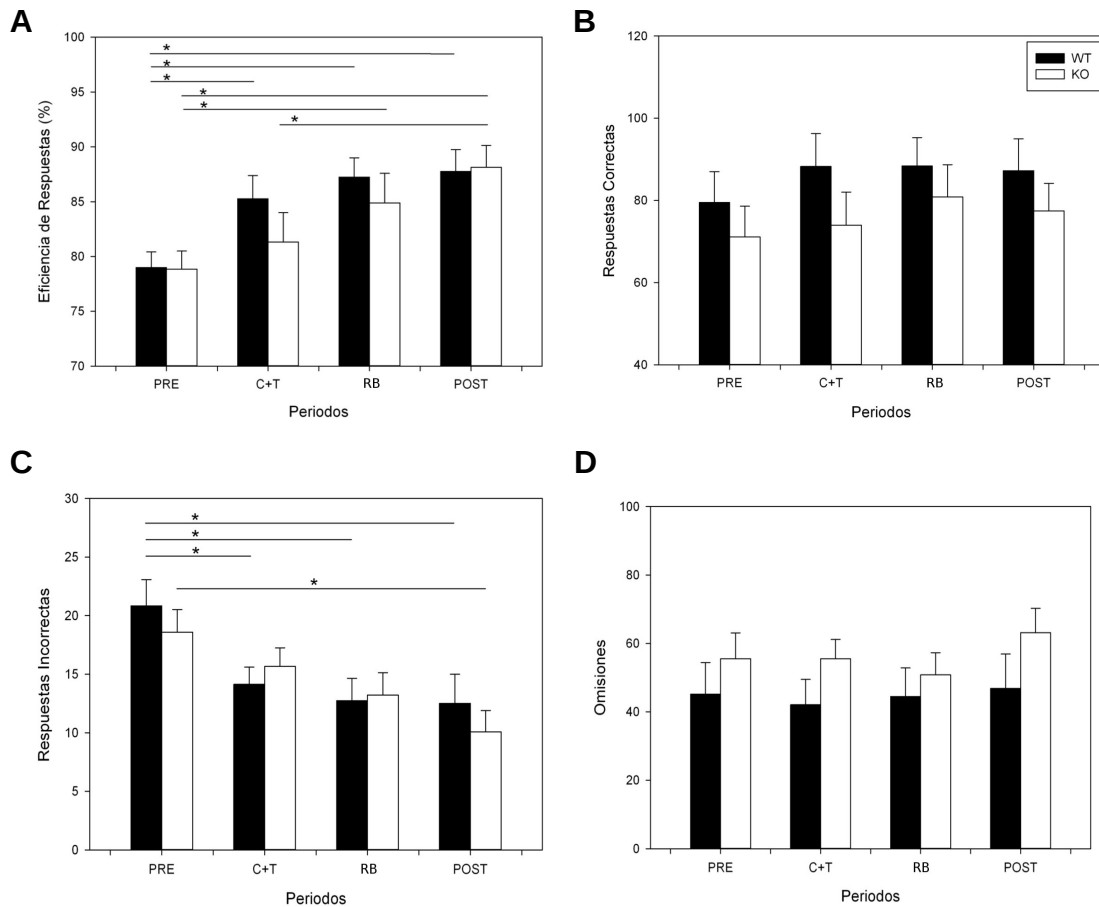


Figura 12. Desempeño conductual de los ratones WT y KO analizados por periodos del protocolo experimental. Cada periodo corresponde al promedio de los tres días para la fase del protocolo experimental mostrada (Pre, C+T, RB, Post). A. Eficiencia de respuestas. B. Número de respuestas correctas. C. Número de respuestas incorrectas. D. Número de respuestas omitidas. Las barras negras y blancas representan el promedio \pm error estándar de los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente. ANOVA-RM de dos vías (* $p < 0,05$).

4.2.2 Respuestas correctas y omitidas

Respecto al número de respuestas correctas, variable que determina la eficiencia de respuestas, se observó que aumentó en los ratones WT hasta la

presentación del distractor auditivo RB donde se mantuvo constante, en cambio en los ratones KO la progresión fue menos regular, no estando determinado por la fase del protocolo (figura 11B). El análisis diario del número de respuestas correctas mostró que la mayor diferencia entre ambos genotipos estuvo en el día 6 (WT = $88,9 \pm 24,81$; KO = $70,11 \pm 20,38$), correspondiente al tercer día de presentación del distractor auditivo C+T, lo cual fue coincidente con el día de mayor diferencia en las respuestas omitidas (WT = $42,0 \pm 22,96$; KO = $64,44 \pm 16,84$) (figura 11D). En el análisis por periodos se observó que hubo una mayor diferencia de respuestas correctas entre genotipos durante el periodo de distractor auditivo C+T, periodo en que los ratones WT aumentaron sus respuestas correctas respecto al periodo pre distractor, mientras que los ratones KO no mostraron diferencias (figura 12B). La diferencia de respuestas correctas disminuyó durante el periodo de distractor auditivo RB. Paradójicamente la mayor diferencia de respuestas omitidas estuvo en el periodo post distractor (figura 12D).

4.2.3 Latencia de respuestas correctas

Hubo una disminución de la latencia de las respuestas correctas que se acentuó a partir del día 4, con la presentación del distractor auditivo C+T y que se mantuvo hasta el último día del protocolo experimental en ambos genotipos (figura 13D). El análisis por periodo reveló una disminución significativa en la

latencia (ANOVA-RM de dos vías, $F_{(1,3)} = 5,833$; $p = 0,002$), la que un análisis *post-hoc* de Bonferroni determinó que estaba entre el periodo del distractor auditivo C+T y pre distractor solo en los ratones WT (figura 14D).

4.2.4 Respuestas incorrectas

El análisis de las respuestas incorrectas evaluadas durante los 12 días mostró una disminución progresiva de las respuestas incorrectas, siendo en el día 5 del protocolo experimental donde hubo mayor diferencia entre genotipos (WT = $12,9 \pm 4,48$; KO = $17,66 \pm 7,31$) (figura 11C). No hubo diferencias significativas entre genotipos por periodo, pero al comparar los periodos por genotipo se observó una disminución significativa (ANOVA-RM de dos vías, $F_{(1,3)} = 11,960$; $p < 0,001$). Un análisis *post-hoc* Bonferroni determinó que las diferencias en los ratones WT estuvieron entre el periodo pre-distractor con el periodo de distractor auditivo C+T, RB y post distractor. En los ratones KO la disminución fue significativa solo entre el periodo pre distractor y el periodo post distractor (figura 12C).

4.2.5 Respuestas anticipadas y durante el intervalo inter-ensayo

En ambos genotipos se constató un mayor número de respuestas anticipadas durante los días 4 (WT = $12,8 \pm 15,38$; KO = $13,55 \pm 14,26$) y 7 (WT = $12,1 \pm 13,13$; KO = $12,66 \pm 17,94$) del protocolo experimental, lo cual corresponde al

primer día de la presentación del distractor auditivo C+T y RB respectivamente, esto fue seguido de una disminución en los días posteriores (figura 13A). Una tendencia parecida se observó en las respuestas durante el intervalo inter-ensayo en los ratones KO, en cambio los ratones WT mantuvieron la cantidad de respuestas constantes hasta el día 7 del protocolo experimental (segundo día del distractor auditivo RB), a partir de ahí hubo una disminución progresiva (figura 13B). Por periodo se observó que las respuestas anticipadas (figura 14A) y durante el intervalo inter-ensayo (figura 14B) se mantuvieron constantes durante los tres primeros periodo y disminuyeron durante el periodo post distractor en ambos genotipos, al comparar los periodos por genotipo no se observaron diferencias significativas.

4.2.6 Número de errores

Respecto al número de errores, que es una variable dependiente de las respuestas incorrectas, anticipadas y de respuestas en el intervalo inter-ensayo, se observó un aumento no significativo en el primer día de cada distractor auditivo (figura 13C), lo cual podría ser atribuida a la presentación de los distractores auditivos. Interesantemente, en los ratones WT la mayor cantidad de errores se registró en el día 4 del protocolo experimental, por lo que el distractor auditivo C+T tuvo un mayor efecto, a diferencia de los ratones KO en donde la mayor cantidad de errores se registró en el día 7, correspondiente al

distractor RB. Al analizar por periodo, se observó una disminución significativa (ANOVA-RM de dos vías, $F_{(1,3)} = 5,915$; $p = 0,002$), la que un análisis *post-hoc* de Bonferroni determinó que estaba entre el periodo de distractor auditivo C+T y post distractor para los ratones WT y entre el periodo de distractor auditivo RB y post distractor para los ratones KO (figura 14C).

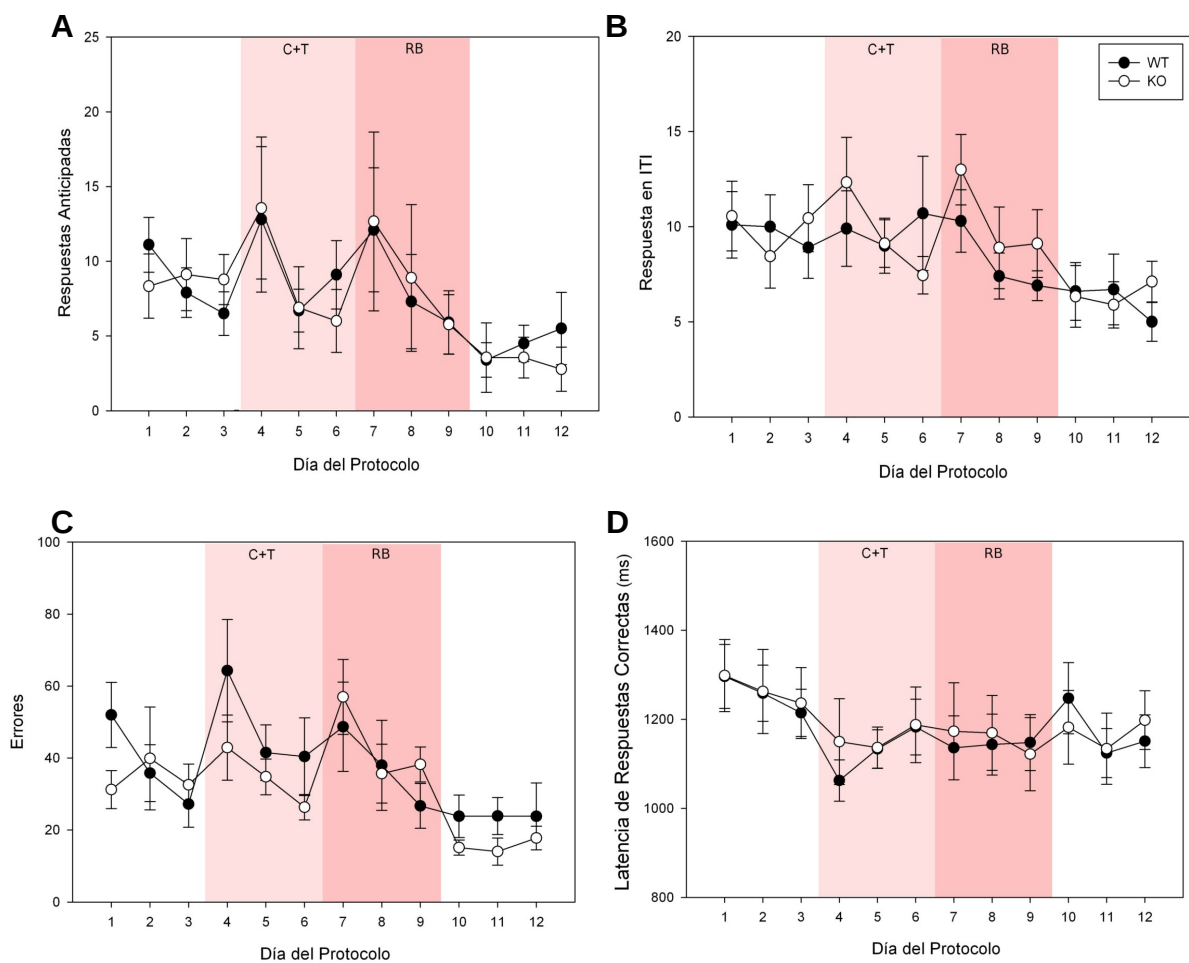


Figura 13. Desempeño conductual de los ratones WT y KO en los 12 días del protocolo experimental. A. Respuestas anticipadas. B. Respuestas en ITI. C. Errores. D. Latencia de respuestas correctas. Los puntos negros y blancos representan el promedio \pm error estándar de los ratones WT ($n=10$) y KO ($n=9$) respectivamente. ANOVA-RM de dos vías.

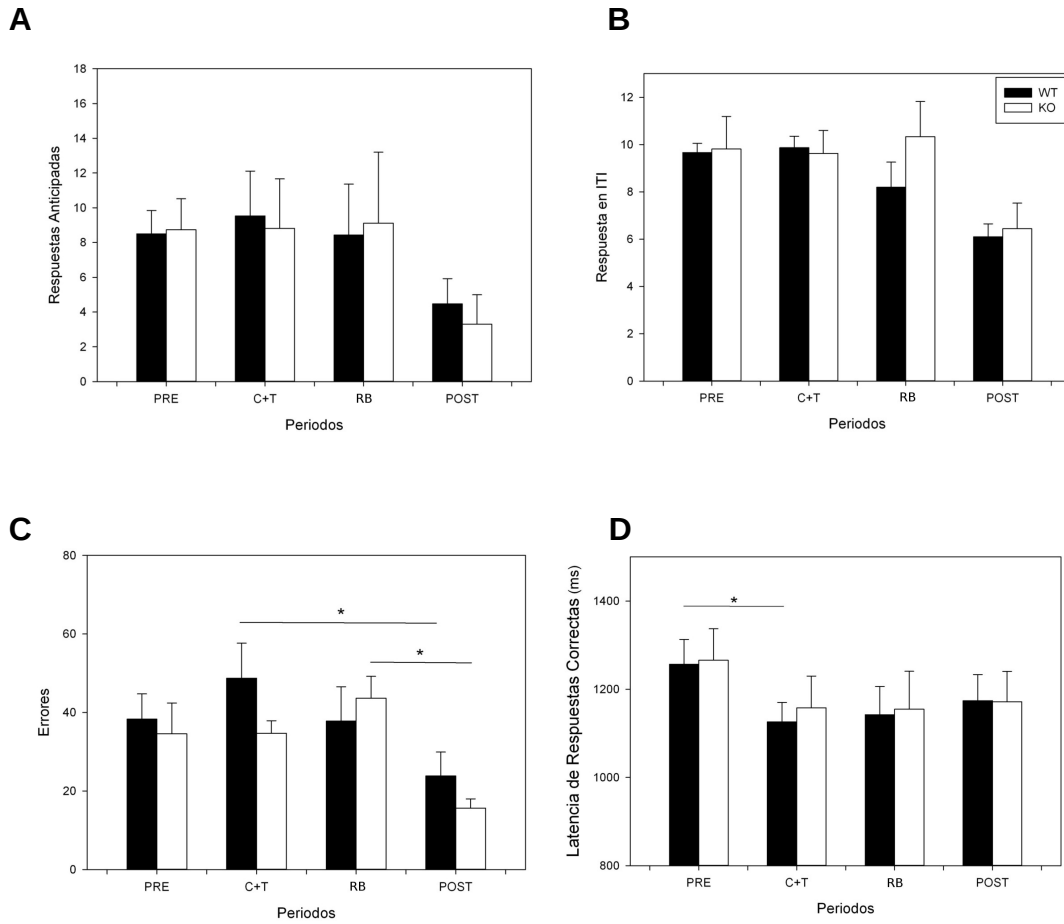


Figura 14. Desempeño conductual de los ratones WT y KO analizados por periodos del protocolo experimental. Cada periodo corresponde al promedio de los tres días para la fase del protocolo experimental mostrada (Pre, C+T, RB, Post). A. Respuestas anticipadas. B. Respuestas en ITI. C. Errores. D. Latencia de respuestas correctas. Las barras negras y blancas representan promedio \pm error estándar para los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente. ANOVA-RM de dos vías (* $p < 0,05$).

4.2.7 Densidad de las latencias de respuesta

Ya que no hubo diferencias en el promedio de latencias de las respuestas correctas entre los ratones WT (n=10) y KO (n=9) se analizaron sus distribuciones, junto a las latencias de las respuestas incorrectas y anticipadas. Como la cantidad de ratones por genotipo fue distinta, no se pudo comparar la distribución de las latencias a través de histogramas, por lo que se analizaron a partir de sus densidades, es decir, una ponderación de la cantidad de datos por datos totales.

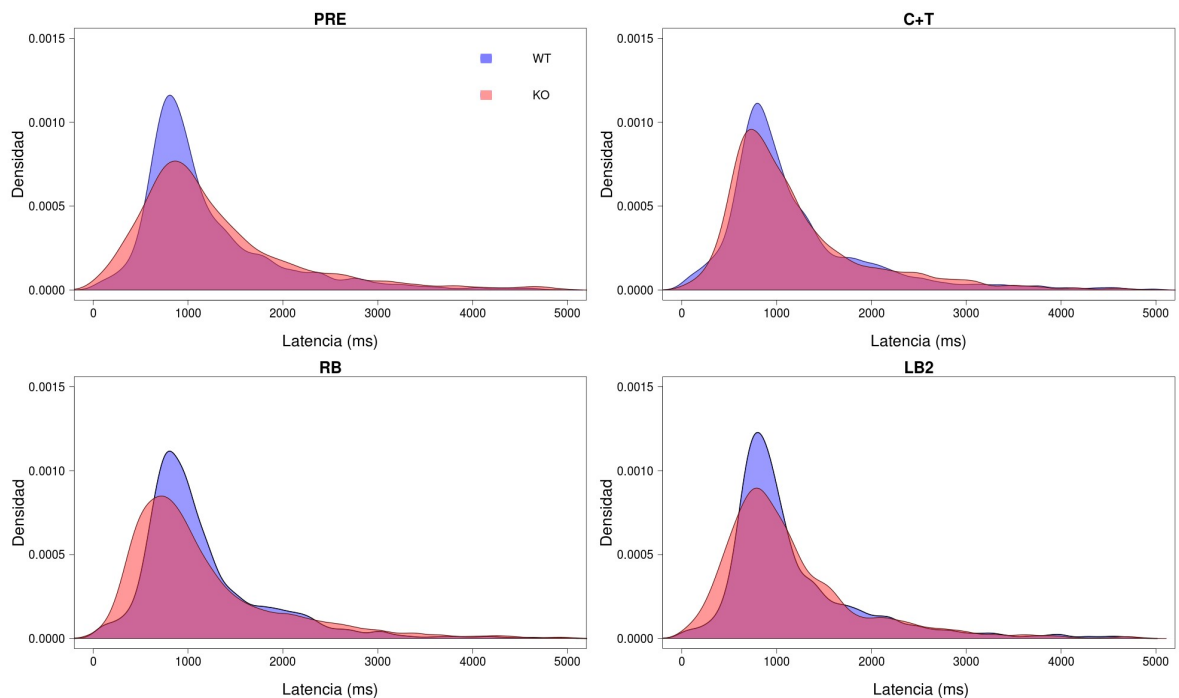


Figura 15. Densidad de las latencias de las respuestas correctas. La distribución en los ratones WT (n=10) permanece constante a lo largo de los periodos mientras que en los ratones KO (n=9) el pico aparece a menor latencia con la presencia de los distractores auditivos.

Hubo diferencias significativas en la distribución de las latencias de las respuestas correctas entre los ratones WT y KO en los cuatro periodos: PRE ($D = 0.081$, $p < 0,005$), C+T ($D = 0.045$, $p = 0.02$), RB ($D = 0.127$, $p < 0,005$) y POST ($D = 0.094$, $p < 0,005$). Además, estas distribuciones en los ratones WT no se vieron afectadas por los distractores auditivos, se mantuvieron constantes al comparar los cuatro periodos. Lo contrario se vio en los ratones KO, durante los cuatro periodo tuvieron distribuciones significativamente distintas (PRE–C+T, $D = 0.069$, $p < 0,005$. PRE–RB, $D = 0.105$, $p < 0,005$. PRE–POST, $D = 0.083$, $p < 0,005$. C+T–RB, $D = 0.091$, $p < 0,05$. C+T–POST, $D = 0.049$, $p = 0.01$. RB–POST, $D = 0.049$, $p = 0.01$).

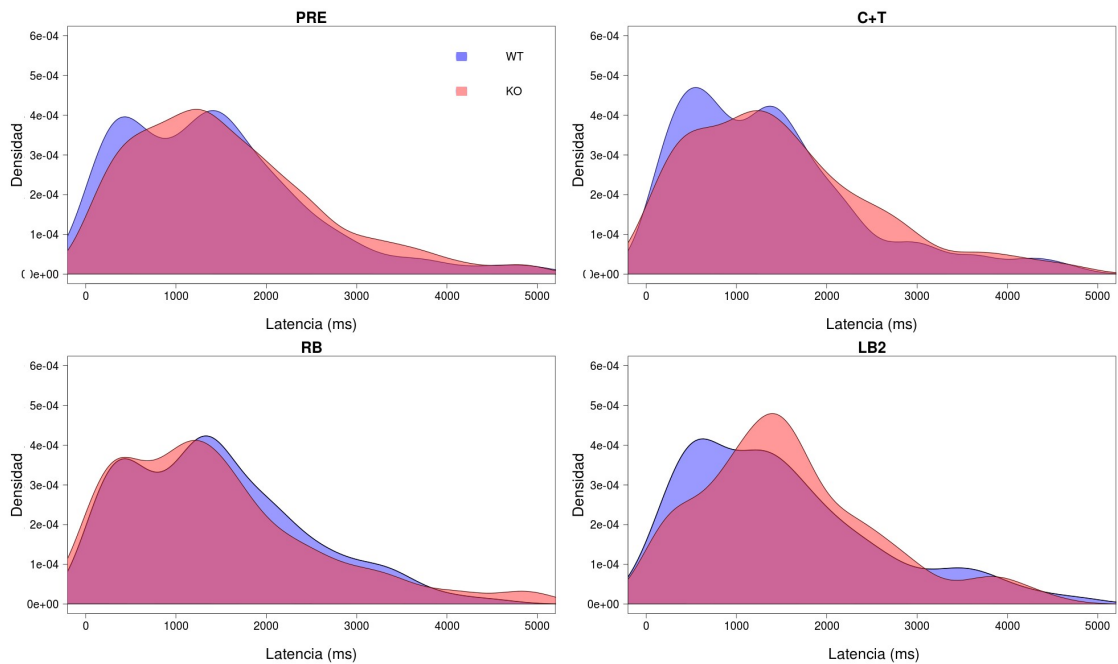


Figura 16. Densidad de las latencias de respuestas incorrectas. La distribución en los ratones WT ($n=10$) permanece constante a lo largo de los periodos mientras que en los ratones KO ($n=9$) cambia la distribución entre el periodo RB y POST. Kolmogorov-Smirnov test ($p < 0,05$).

Hubo diferencias significativas en la distribución de las latencias de las respuestas incorrectas entre los ratones WT y KO durante el periodo PRE ($D = 0.091$, $p = 0.049$) y POST ($D = 0.127$, $p = 0.007$). En los periodos con distractores auditivos no hubo diferencias significativas: C+T ($D = 0.082$, $p = 0.09$) RB ($D = 0.064$, $p = 0.39$). Además, estas distribuciones en los ratones WT no se vieron afectadas por los distractores auditivos, se mantuvieron constantes al comparar los cuatro periodos. En los ratones KO hubo una diferencia significativa entre el periodo RB y POST ($D = 0.136$, $p = 0.006$).

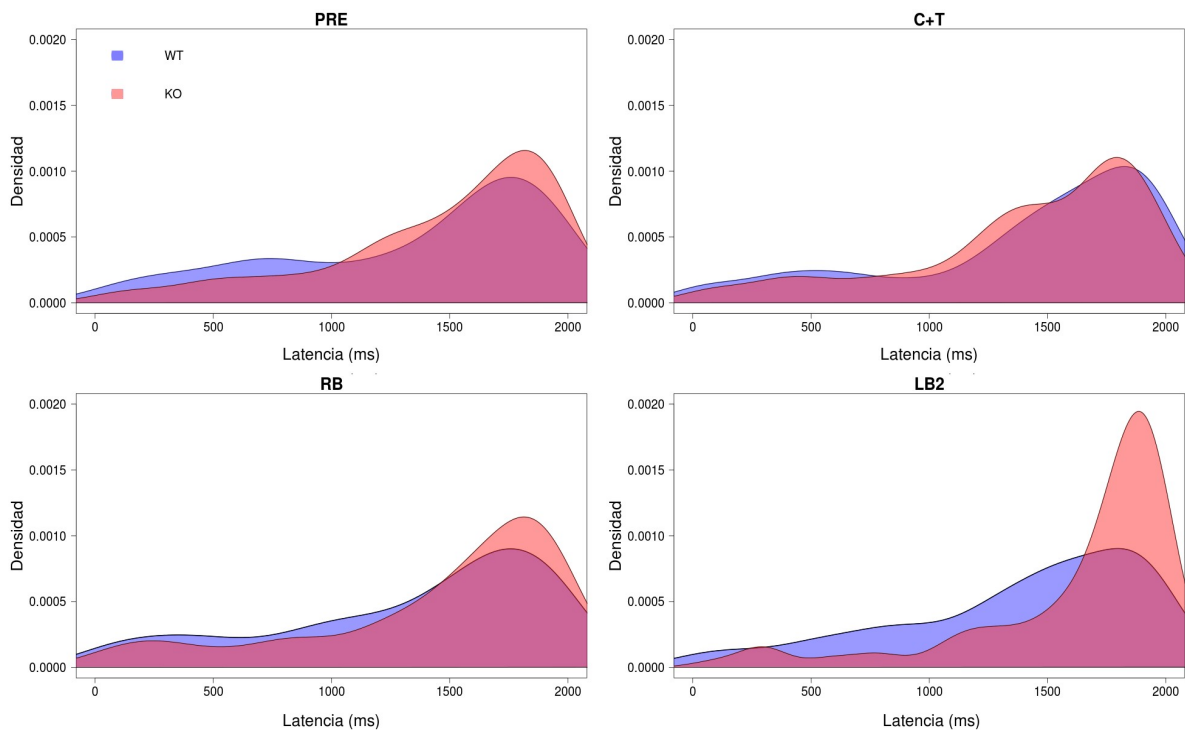


Figura 17. Densidad de las latencias de respuestas anticipadas. La distribución en los ratones WT ($n=10$) permanece constante a lo largo de los periodos mientras que en los ratones KO ($n=9$) cambia la distribución entre los tres primeros periodos y POST. Kolmogorov-Smirnov test ($p < 0,05$).

Hubo diferencias significativas en la distribución de las latencias de las respuestas anticipadas entre los ratones WT y KO solo en el periodo POST ($D = 0.127$, $p\text{-value} = 0.008$). En el resto de periodo no hubo diferencias significativas: PRE ($D = 0.126$, $p\text{-value} = 0.08$), C+T ($D = 0.087$, $p\text{-value} = 0.36$), RB ($D = 0.11$, $p\text{-value} = 0.10$). Además, estas distribuciones en los ratones WT no se vieron afectadas por los distractores auditivos, se mantuvieron constantes al comparar los cuatro periodos. En los ratones KO hubo diferencias entre los tres primeros periodos y POST (PRE–POST, $D = 0.235$, $p\text{-value} < 0,005$. C+T–POST, $D = 0.279$, $p\text{-value} < 0,005$. RB–POST, $D = 0.21897$, $p\text{-value} < 0,005$.)

4.2.8 Correlación de parámetros conductuales

Los objetivos planteados en esta tesis supone que los parámetros conductuales evaluados durante el protocolo experimental midieron el desempeño tanto cognitivo como emocional. Es por ello que los resultados fueron comparados entre ellos para poder analizar este supuesto. Respecto a las respuestas anticipadas se observó un correlación significativa en donde a mayor respuestas anticipadas, menor fue la eficiencia de respuestas (figura 18). En el periodo pre distractor la correlación entre estas respuestas fue significativa solo para los ratones WT (WT; $\rho = -0,632$, $p = 0,042$, KO; $\rho = -0,200$, $p = 0,580$), mientras que en los periodos con distractor auditivo C+T (WT; $\rho = -0,818$, $p = 0,001$, KO; $\rho = -0,800$, $p = 0,006$) y RB (WT; $\rho =$

-0,915, $p = <0,001$, KO; $\rho = -0,787$, $p = 0,008$) fue significativo para ambos genotipos. Durante el periodo post distractor la correlación fue significativa solo para los ratones KO (WT; $\rho = -0,565$, $p = 0,081$, KO; $\rho = -0,664$, $p = 0,042$). Es decir, existió una relación entre las respuestas anticipadas (desempeño emocional) y la eficiencia de respuesta (desempeño cognitivo), siendo esta relación inversa.

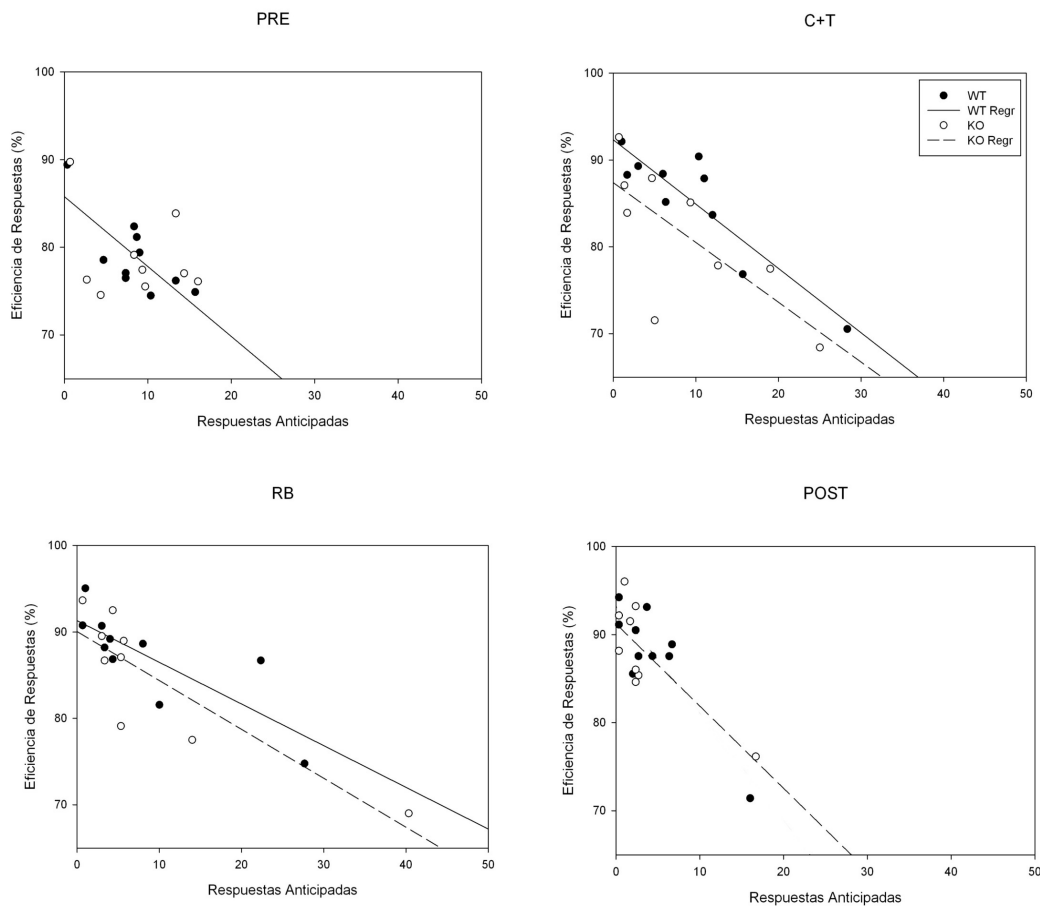


Figura 18. Correlaciones entre eficiencia de respuesta (%) y respuestas anticipadas. Cada punto corresponde al promedio de los tres días del periodo para cada ratón. Hubo una correlación negativa significativa entre la eficiencia de respuestas y las respuestas anticipadas durante los periodos PRE, C+T y RB en los ratones WT ($n=10$) y durante los periodos C+T, RB y POST en los ratones KO ($n=9$). Correlación de Spearman (* $p < 0.05$).

Dado que la eficiencia de respuesta es una variable dependiente de las respuestas correctas e incorrectas, se realizó nuevamente una correlación entre las respuestas anticipadas, pero esta vez con las respuestas correctas e incorrectas. No hubo correlación significativa entre las respuestas correctas y anticipadas para ambos genotipos (gráfico no mostrado), sin embargo lo hubo para las respuestas incorrectas (figura 19). En los ratones WT esta correlación fue significativa para los cuatro periodos, mientras que en los ratones KO no existieron relaciones significativas (Pre, WT; rho = 0,681, p = 0,025, KO; rho = -0,016, p = 0,948 / C+T, WT; rho = 0,697, p = 0,021, KO; rho = 0,533, p = 0,124 / RB, WT; rho = 0,806, p = 0,002, KO; rho = 0,561, p = 0,098 / Post, WT; rho = 0,729, p = 0,013, KO; rho = 0,597, p = 0,076). Esto indica que existió una correlación significativa positiva entre las respuestas anticipadas y las respuestas incorrectas, es decir a mayor respuestas anticipadas, mayor respuestas incorrectas.

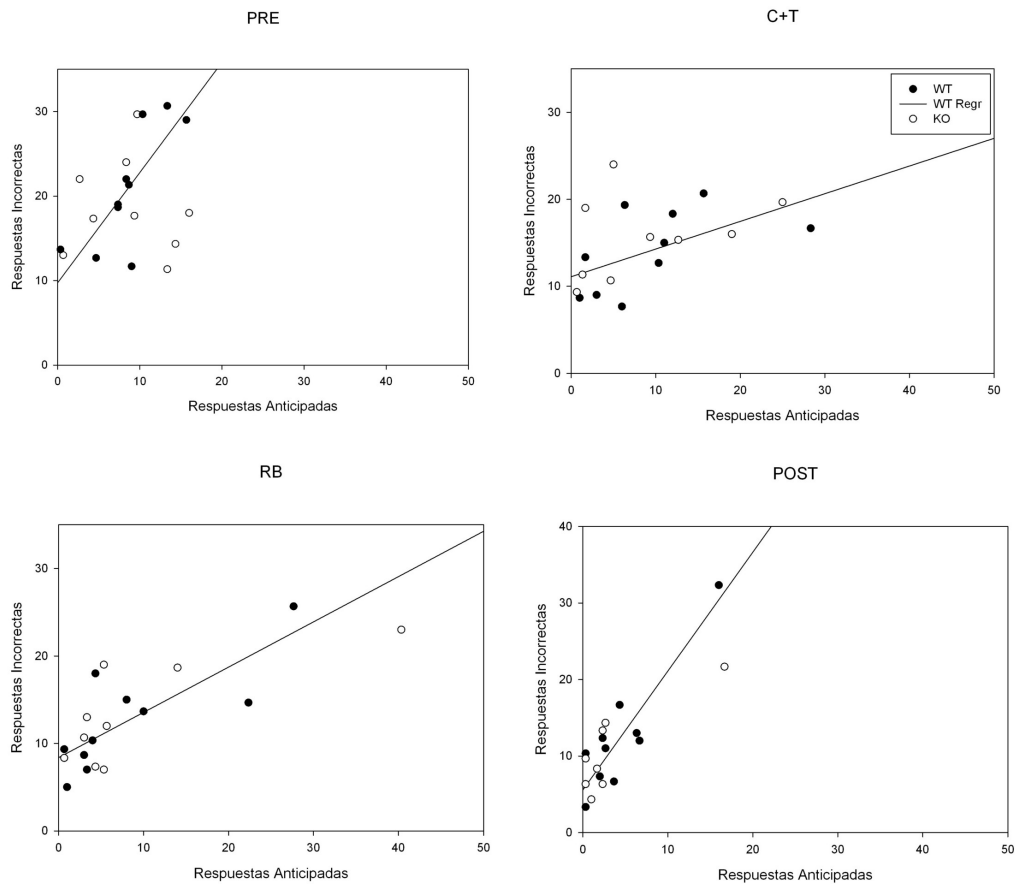


Figura 19. Correlaciones entre las respuestas incorrectas y respuestas anticipadas. Cada punto es el promedio de los tres días del periodo de un ratón. Hubo una correlación positiva significativa entre las respuestas incorrectas y las respuestas anticipadas durante los cuatro periodos en los ratones WT (n=10) y no para los ratones KO (n=9). Correlación de Spearman (* p<0.05).

Finalmente, para descartar efectos motivacionales sobre los parámetros conductuales se comparó el porcentaje del peso corporal *ad-libitum* entre los ratones WT y KO, junto con el número total de veces que presionaron la palanca durante los 12 días del protocolo experimental (figura 20). En ambos casos no hubo diferencias significativas, por lo que los efectos observados no

se debieron a diferencias en la motivación.

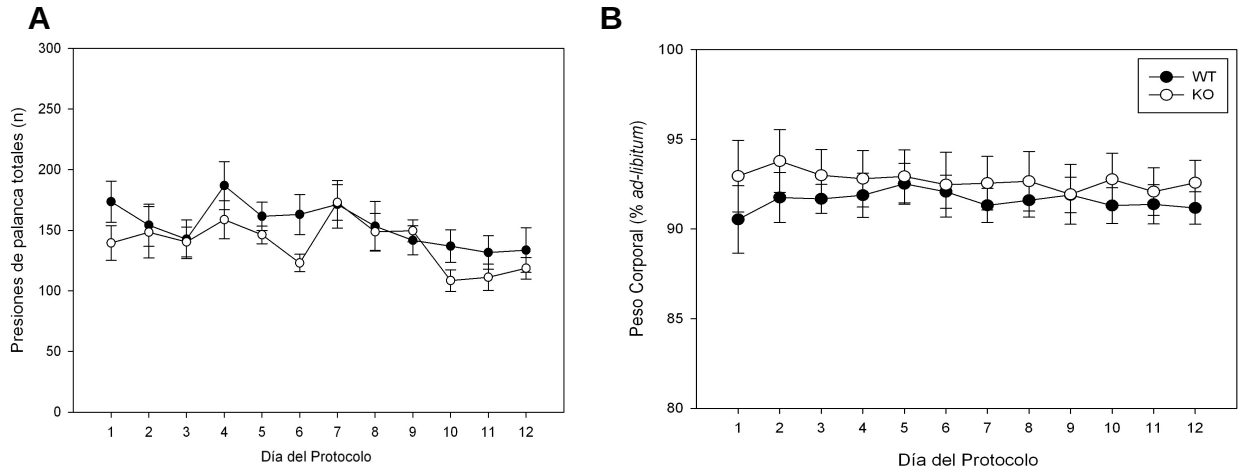


Figura 20. Evaluación del número total de presiones de palancas y porcentajes del peso corporal. A. No hubo diferencia en el número total de palanqueos ni B. en el porcentaje del peso corporal *ad-libitum* durante los doce días del protocolo experimental.

4.3 Actividad locomotora y ansiedad

La evaluación de la ansiedad fue realizada antes del inicio del protocolo conductual y posterior a este. Para ello se midió la actividad locomotora y la ansiedad antes del ingreso al protocolo experimental de 12 días, a través de la prueba de campo abierto (4.3.1) y después del protocolo a través del laberinto elevado en cruz (4.3.2).

4.3.1 Campo Abierto

El paradigma de campo abierto se realizó antes del comienzo del protocolo

experimental de 12 días con el fin de descartar diferencias basales de ansiedad y actividad locomotora entre los genotipos (Seibenhener y Wooten, 2015), las que podrían haber afectado el desempeño en la tarea de discriminación de estímulos visuales. La actividad locomotora se evaluó comparando la distancia total recorrida durante los cinco minutos de duración de la prueba y la distancia recorrida en el centro y en la periferia. No hubo diferencias significativas a pesar que los ratones KO recorrieron una mayor distancia total (WT = 12,188m \pm 8,200; KO = 14,932m \pm 10,360), la cual puede ser explicada por un mayor recorrido en la periferia del campo abierto (WT = 10,883m \pm 7,446; KO = 13,953m \pm 10,215). Los ratones WT tuvieron una mayor distancia recorrida en el centro del campo abierto (WT = 1,304m \pm 1,053; KO = 0,978m \pm 0,658). Como estas diferencias no fueron significativas los ratones WT y KO iniciaron el protocolo experimental sin diferencias basales en su actividad locomotora.

Respecto a la ansiedad, se evaluó comparando las entradas al cuadrado céntrico y a la periferia, además del tiempo de permanencia en estas. No hubo diferencias significativas en el número de entradas al cuadrado céntrico (WT = 5,800 \pm 4,392; KO = 4,778 \pm 3,270), ni en la periferia (WT = 5,700 \pm 4,270; KO = 4,778 \pm 3,270). Tampoco hubo diferencias en el tiempo de permanencia en el centro (WT = 33,900s \pm 37,561; KO = 44,856s \pm 78, 267), ni en la periferia (WT = 266,100s \pm 37,561; KO = 255,144s \pm 78,267). Por lo tanto, la fase de entrenamiento de los ratones WT y KO antes de llegar al criterio para iniciar protocolo experimental de 12 días no generó diferencias de ansiedad entre

genotipos. De esta forma, ambos genotipos iniciaron el protocolo experimental sin diferencias en su conducta locomotora ni en sus niveles de ansiedad.

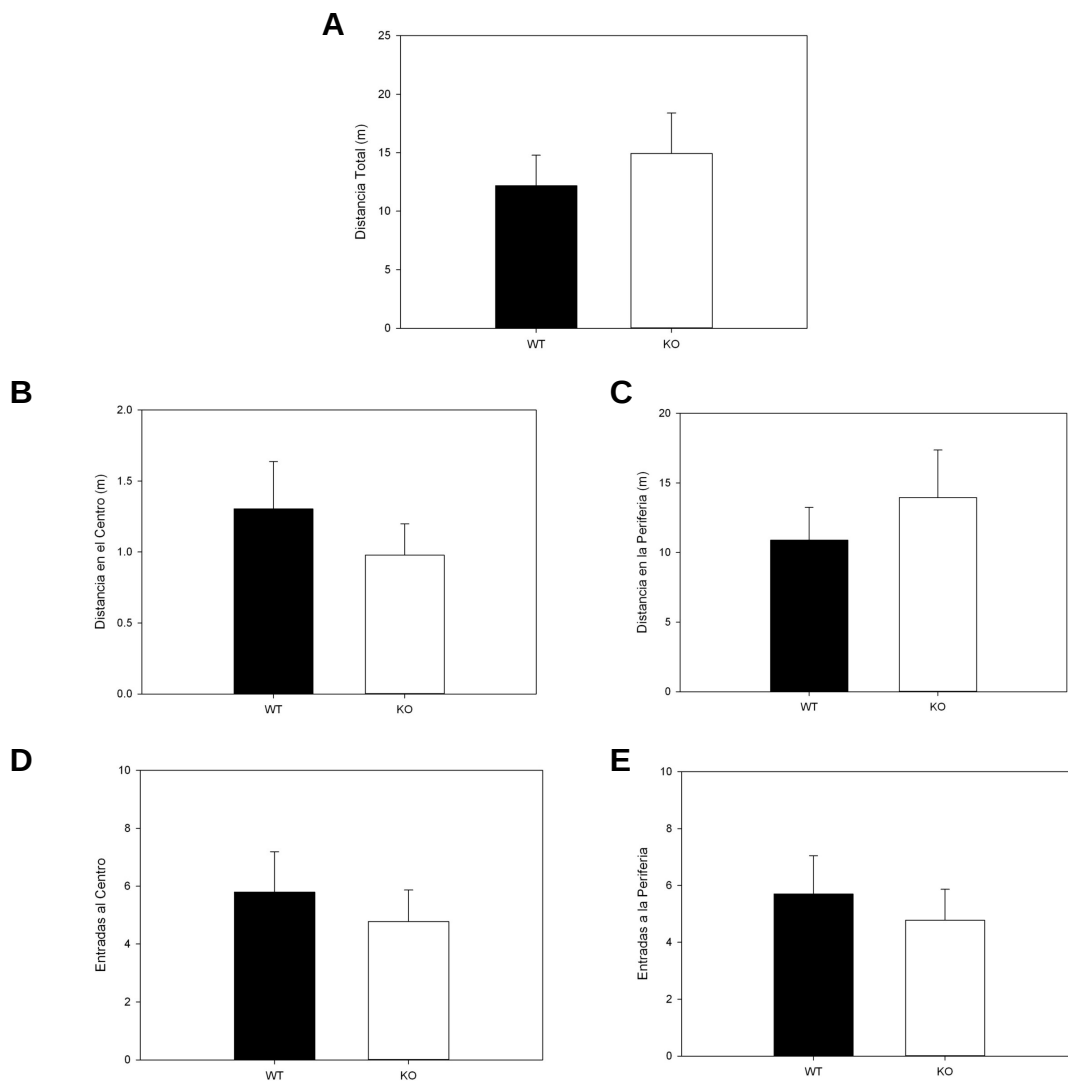


Figura 21. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad antes del protocolo experimental. A. Distancia total recorrida. B. Distancia recorrida en el centro. C. Distancia recorrida en la periferia. D. Número de entradas al centro. E. Número de entradas a la periferia. Los datos están expresados en barras negras y blancas (promedio \pm error estándar) para los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente.

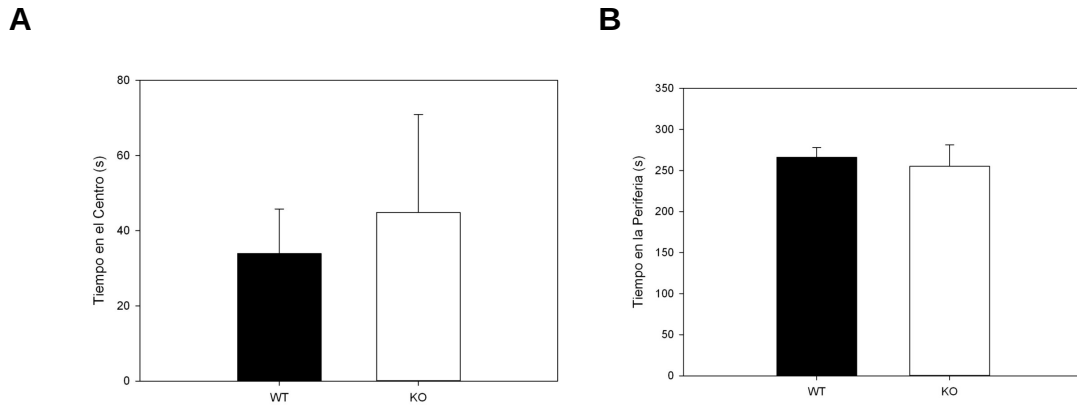


Figura 22. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad antes del protocolo experimental. A. Tiempo de permanencia en el centro. B. Tiempo de permanencia en la periferia. Los datos están expresados en barras negras y blancas (promedio \pm error estándar) para los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente.

4.3.2 Laberinto en cruz elevada

Se realizó este paradigma el día siguiente de finalizado el protocolo experimental, de manera de evaluar si los distractores auditivos tuvieron un efecto ansiogénico en los ratones WT y KO. La distancia total recorrida en el laberinto en cruz elevada es un índice útil para medir actividad locomotora (Dawson et al., 1995). Los ratones WT recorrieron una mayor distancia en los cinco minutos de duración del laberinto en cruz elevada (WT = 5,753m \pm 2,939; KO = 3,390m \pm 2,248) la cual se explica principalmente por la distancia recorrida en los brazos cerrados (WT = 4,417m \pm 2,141; KO = 2,298m \pm 1,642) que es significativamente mayor a los ratones KO ($T_{(17)} = 2,398$; $p < 0,05$). También se constató una distancia mayor recorrida en los brazos abiertos (WT

= 0,161 m \pm 0,160; KO = 0,116m \pm 0,127). Por lo tanto, los ratones KO tuvieron una menor actividad locomotora una vez finalizado el protocolo experimental.

El número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos es un índice de ansiedad, si estos son mayores en los brazos cerrados es considerado un comportamiento ansioso (Pellow et al, 1985). Los ratones WT registraron un mayor número de entradas a los brazos cerrados (WT = 11,900 \pm 6,045; KO = 9,556 \pm 5,199) lo que se relacionó con un mayor tiempo de permanencia en esta zona (WT = 211,150s \pm 64,299; KO = 157,511s \pm 82,110). Por su parte, los ratones KO registraron un mayor número de entradas a los brazos abiertos (WT = 4,000 \pm 4,346; KO = 6,111 \pm 6,642), lo que se relacionó con un mayor tiempo de permanencia en esta zona (WT = 10,010s \pm 7,231; KO = 18,011s \pm 18,561). Estas diferencias, si bien marcan una tendencia, no fueron significativas por lo que los distractores auditivos no produjeron un cambio en la ansiedad evaluada al día siguiente del fin del protocolo, sin embargo hubo una tendencia de los ratones KO por un mayor tiempo de permanencia y entrada en el brazo abierto.

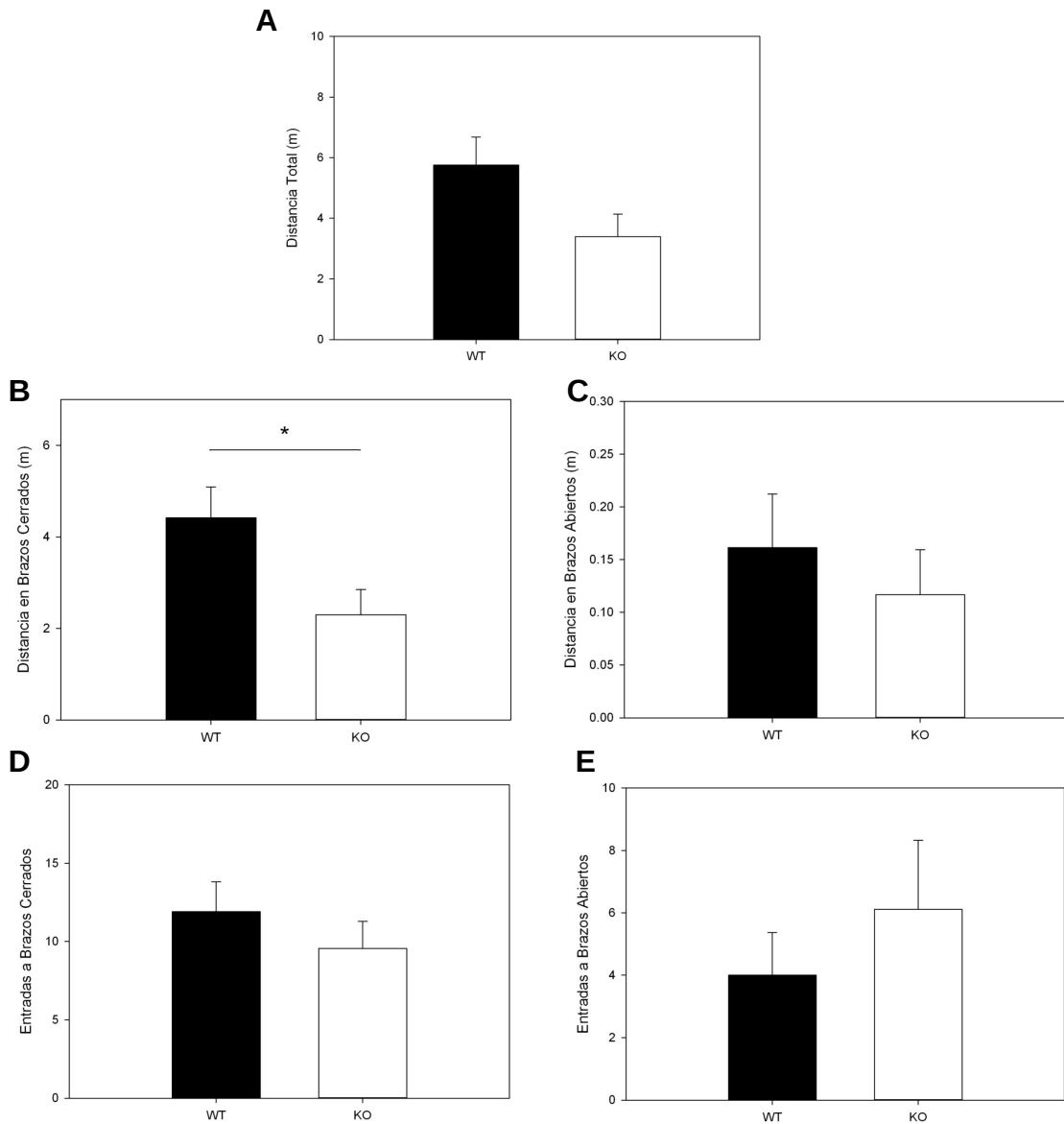


Figura 23. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad posterior al rotocolo experimental. A. Distancia total recorrida. B. Distancia recorrida en los brazos cerrados. C. Distancia recorrida en los brazos abiertos. D. Número de entradas a los brazos cerrados. E. Número de entradas a los brazos abiertos. Los datos están expresados en barras negras y blancas (promedio \pm error estándar) para los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente. T-test de dos colas (* $p < 0,05$).

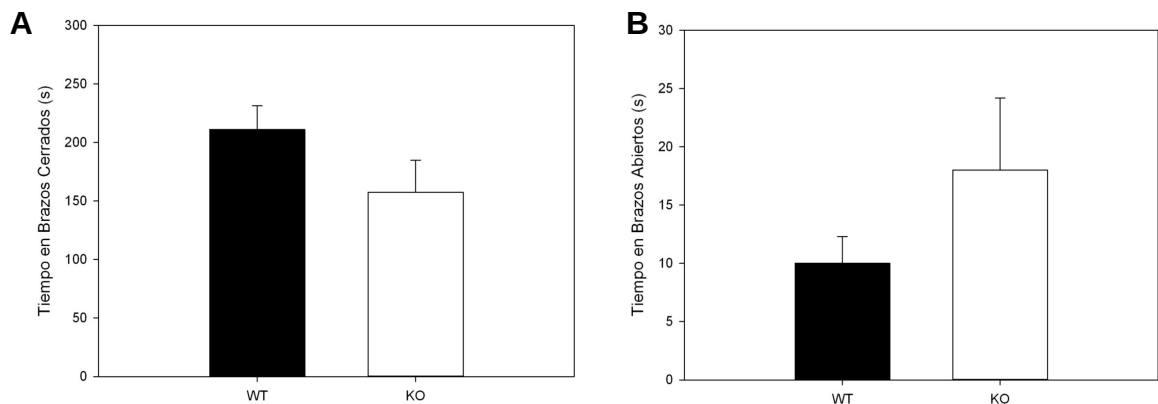


Figura 24. Evaluación de la actividad locomotora y ansiedad posterior al protocolo experimental. La evaluación de estas variables conductuales fue realizada utilizando el laberinto en cruz elevado. A. Tiempo de permanencia en los brazos cerrados. B. Tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Los datos están expresados en barras negras y blancas (promedio \pm error estándar) para los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente. T-test de dos colas .

Para explicar si la diferencia en la distancia recorrida en el laberinto en cruz elevado entre los ratones WT y KO pudiera ser atribuido a una conducta de miedo (Montgomery., 1955) se midió el número de episodios de congelamiento y su latencia, es decir cuántas veces permanecieron inmóviles por un periodo mínimo de un segundo (Anagnostaras et al., 2010) y cuánto tiempo duró. Esta conducta es un tipo de patrón de comportamiento espontáneo en respuesta a una amenaza (Steimer, 2011), una mayor cantidad de episodios de congelamiento y latencia se relaciona con un aumento del condicionamiento al miedo (Maren, 2001.).

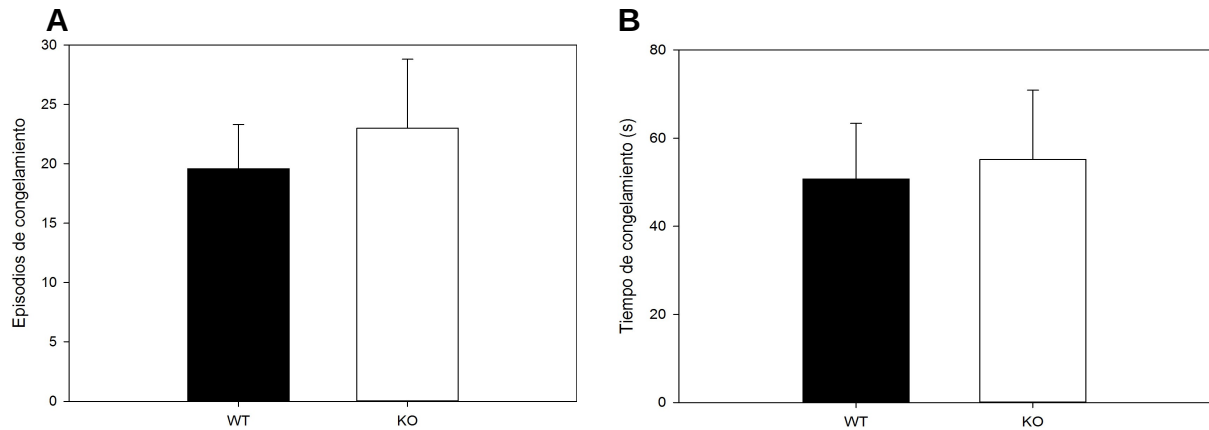


Figura 25. Diferencias en los episodios y latencia de congelamiento. A. Episodios de congelamiento y B. Tiempo de congelamiento durante los cinco minutos de duración del laberinto en cruz elevado. Los datos están expresados en barras negras y blancas (promedio \pm error estándar) para los ratones WT (n=10) y KO (n=9) respectivamente. T-test de dos colas (*p<0,05).

No hubo diferencias significativas a pesar que los ratones KO tuvieron una mayor cantidad de episodios de congelamiento (WT = 19,600 \pm 11,721; KO = 23,000 \pm 17,479) y tiempo de congelamiento (WT = 50,740s \pm 39,896; KO = 55,144s \pm 47,209), lo que podría explicar en parte la menor distancia recorrida en el laberinto en cruz elevado. Por lo tanto, no hubo diferencias en el condicionamiento del miedo.

4.4 Electrofisiología

Para evaluar si los resultados obtenidos en el protocolo experimental pueden ser explicados por la variabilidad individual en la fuerza del reflejo olivococlear en ratones WT y KO, se midió la amplitud de la supresión de la onda I de los

potenciales evocados de tronco a través de una estimulación por ruido contralateral. El reflejo del tronco es un método ampliamente usado para evaluar la actividad olivococlear sobre la respuesta del nervio auditivo (onda I del ABR) (Lichtenham et al., 2015). Además se realizaron mediciones de los umbrales auditivos, utilizando la onda V del ABR. La siguiente figura muestra las ondas de ABR obtenidas en un ratón WT y KO.

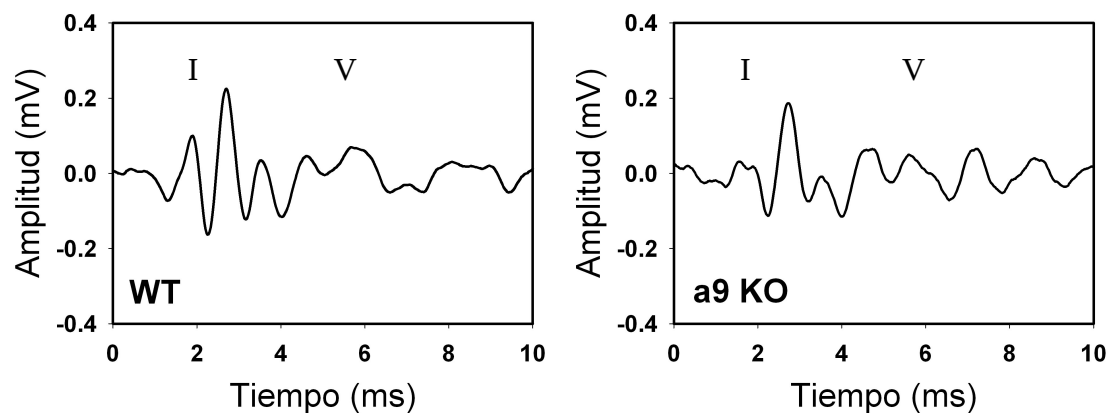


Figura 26. Ejemplo de una onda de ABR en ratones WT y KO. La onda de ABR cuando es evocada con un estímulo de 80 dB. La amplitud de la onda I es mayor en el ratón WT comparada con la del KO y similar en la magnitud de la onda V

No hubo diferencias entre los umbrales auditivos en los ratones WT ($37,50 \pm 2,63$ dB SPL) comparados con los KO ($36,87 \pm 3,72$ dB SPL), mientras que sí hubo diferencias significativas (t-test no pareado, $T(16) = 10,595$, $p < 0,005$) en la magnitud de la supresión de la onda I por ruido contralateral (WT: $2,735 \pm 0,385$ dB atenuación efectiva, KO: $0,794 \pm 0,388$ dB atenuación efectiva). Además, se correlacionaron las variables conductuales desempeñadas durante el día 5 del protocolo experimental, que es el día donde

hubo mayor diferencias en la eficiencia de respuestas ($p = 0,06$), con la supresión de la onda I por ruido contralateral. No hubo una correlación significativa en los ratones WT mientras que en los ratones KO se encontró una correlación negativa significativa (Spearman, $\rho = -0,862$, $p < 0,005$) entre la fuerza individual de la supresión de la onda I con el número de omitidas.

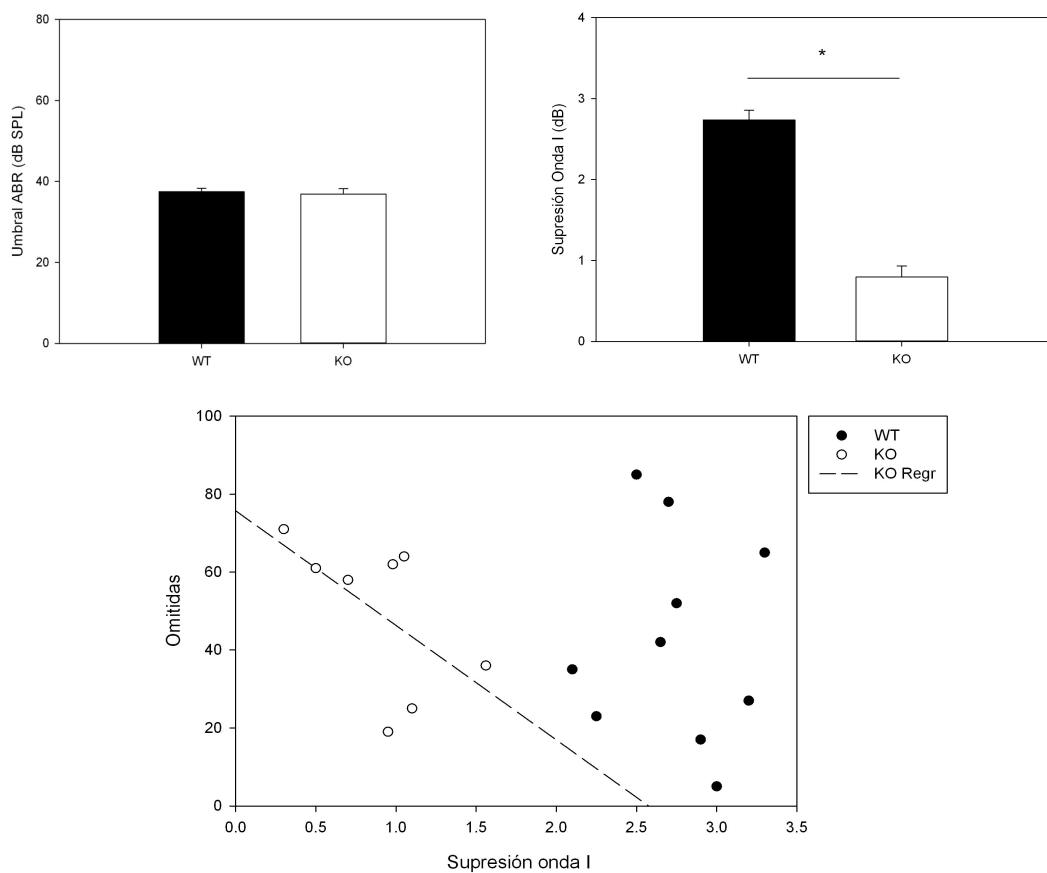


Figura 27. Umbrales de ABR y supresión de la onda I por ruido contralateral. A. No hubo diferencias significativas en los umbrales de ABR entre los ratones WT ($n=10$) y KO ($n=9$). B. La supresión de la onda I por ruido contralateral fue significativamente mayor en los ratones WT comparado con los KO. C. Hubo una correlación negativa significativa entre las respuestas omitidas en el día 5 del protocolo experimental y la supresión de la onda I. (Spearman, $* p < 0.05$).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró que los ratones KO $\alpha 9$ -nAChR, que carecen del receptor colinérgico responsable de la sinapsis entre las fibras OCM y CCE, tienen una tendencia a un peor desempeño en una prueba de atención selectiva a estímulos visuales cuando se presentan conjuntamente con distractores auditivos. Esta tendencia se asocia a una menor actividad locomotora cuando es medida finalizado el protocolo experimental.

Diferencias entre los periodos del protocolo experimental por genotipo

El análisis de la eficiencia de respuestas por genotipo mostró un aumento significativo entre el periodo pre y post distractor en los ratones WT y KO, lo que evidencia un efecto de los días sobre la curva de aprendizaje en el ensayo de atención visual (Figura 11A). Además, al presentar el distractor auditivo C+T hubo un aumento significativo respecto al periodo pre distractor solo en los ratones WT, en el caso de los ratones KO, hubo un aumento significativo entre el periodo pre distractor y el distractor RB (figura 12A), por lo que la curva de aprendizaje es más rápida en los primeros. Es decir, existe un aumento de la eficiencia de respuestas en ambos genotipos, sin embargo, el aprendizaje muestra una progresión más rápida para los ratones WT, lo que podría ser explicado por la capacidad de evadir el distractor auditivo C+T, consecuencia de

la presencia del receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$. Esta curva de aprendizaje también se observó al comparar las respuestas incorrectas por genotipo. Hubo una disminución significativa entre el periodo pre distractor con el periodo de distractor auditivo C+T, RB y post distractor en los ratones WT y una disminución significativa solo entre el periodo pre distractor y el periodo post distractor en los ratones KO (figura 12C).

El menor número de errores estuvo en el periodo post distractor para ambos genotipos, sin embargo, el mayor número de errores estuvo en el periodo de distractor auditivo C+T y RB para los ratones WT y KO respectivamente, esto quiere decir que los distractores auditivos tuvieron diferente efecto en este tipo de respuesta lo que refleja un comportamiento perseverante (Robbins, 2002).

Diferencias entre los ratones WT y KO durante los distractores clics y tonos

Los ratones KO tuvieron una tendencia de eficiencia de respuestas menor durante todos los días del protocolo experimental en el cual estuvo presente el distractor auditivo C+T, especialmente el segundo día ($p=0,06$). Estos resultados pueden ser explicado por la imposibilidad de los ratones KO de evadir el distractor auditivo. Trabajos previos de nuestro laboratorio en chinchillas, se utilizó un paradigma conductual similar para evaluar la atención selectiva a estímulos visuales con distractores clics y tonos (Delano et al.,

2007). En este estudio se encontró una reducción de la amplitud del PAC (nervio auditivo) concomitante a un incremento de las MC durante las respuestas correctas, mientras que no hubo diferencias en las respuestas omitidas. Estos resultados en chinchillas sugieren que las fibras OCM son activadas durante las respuestas correctas, lo cual permitiría evadir el efecto distractor del C+T. Esto se confirma con el presente trabajo ya que los ratones KO $\alpha 9$ -nAChR, que carecen de la actividad colinérgica de las fibras OCM (Vetter et al., 1999), tienen una peor eficiencia de respuestas, medida que depende de la cantidad de respuestas correctas e incorrectas, durante el segundo día del distractor auditivo C+T.

Ausencia de diferencias entre los ratones KO y WT durante el distractor ruido blanco

Aunque los ratones KO tuvieron una menor eficiencia de respuestas comparado con los ratones WT durante la atención selectiva a estímulos visuales en presencia del distractores C+T, esta no se mantuvo cuando se utilizó el distractor RB. Como en el protocolo experimental el RB fue presentado en los días siguientes del periodo de distractor C+T, la ausencia de diferencias conductuales entre los ratones WT y KO se puede explicar por el hecho que el entrenamiento mejoró la eficiencia conductual de los animales en ambos genotipos a niveles en donde el distractor auditivo utilizado no tiene efecto. Por

lo tanto las diferencias observadas entre los ratones WT y KO durante el periodo de distractores C+T pudieron ser compensadas por mecanismos centrales producidos por el entrenamiento conductual a lo largo de los días del protocolo experimental. Otra posibilidad es que durante el periodo de RB se haya activado el reflejo del oído medio (Borg y Counter, 1989) ya que evidencia obtenida en ratones con ruido contralateral de ~80 dB SPL muestra que hay activación del reflejo del oído medio (Valero et al., 2015). Como en este trabajo los niveles sonoros del ruido blanco fueron ~90 dB SPL es probable que se haya activado el reflejo del oído medio. Sin embargo, como la presión sonora del distractor C+T fue ~65 dB SPL, es improbable un efecto del reflejo del oído medio.

Supresión de la onda I por ruido contralateral en ratones WT y KO

De acuerdo con los umbrales auditivos obtenidos en los ratones KO α 9-nAChR y WT (Prosen et al., 2000) y con las mediciones previas a 8 y 16 kHz (Lauer y May, 2011), los umbrales de ABR obtenidos por tonos de 15 kHz en este estudio fueron similares para ambos genotipos, por lo que las diferencias en el comportamiento frente a los distractores auditivos no se pueden atribuir a las diferencias en la percepción auditiva entre los ratones WT y KO.

En estos experimentos desarrollados en animales anestesiados se encontró que los ratones WT tienen una mayor supresión de la onda I por ruido

contralateral comparado con los ratones KO. Estos resultados indican que los ratones KO tienen un reflejo olivococlear de menor magnitud o ausente, posiblemente por carecer de la sinapsis colinérgica entre las CCE y las fibras OCM. Aunque nuestros resultados concuerdan en la dirección de los cambios obtenidos a través de la técnica de supresión por ruido contralateral de DPOAEs (producto de distorsión de emisiones otoacústicas) en ratones WT y KO despiertos, son mayores que los reportados con DPOAEs en ratones anestesiados (Chambers et al., 2012). Como ha sido reportado previamente la anestesia reduce los efectos del ruido contralateral en la respuesta coclear y del nervio auditivo (Chambers et al., 2012; Aedo et al., 2015), las diferencias entre el efecto obtenido en la condición anestesiada en Chambers et al. (2012) y en este trabajo se puede atribuir al hecho que el efecto olivococlear es mayor cuando se evalúa con respuesta neural que con DPOAEs (Puria et al., 1996; Lichtenham et al., 2015). En consecuencia, la medición de la supresión de la onda I a través de potenciales de tronco en presencia de ruido contralateral en los ratones anestesiados puede ser propuesto como una técnica más fácil para probar el reflejo olivococlear en animales anestesiados que la medición de DPOAEs en condiciones despiertas.

Respecto a la relación entre la fuerza del reflejo olivococlear medial y el paradigma conductual, nuestros resultados muestran una correlación negativa entre la fuerza del reflejo olivococlear y el número de respuestas omitidas para los ratones KO durante el día 5 del protocolo experimental (figura 27C), es

decir, el segundo día del distractor auditivo C+T. Esto puede sugerir que cuando la actividad de las fibras OCM es mayor durante la presentación del distractor auditivo C+T, estos estímulos auditivos pueden ser ignorados y por consecuencia los ratones realizan menos respuestas omitidas. En los ratones WT existe una tendencia en esta misma dirección para estos cambios, sin embargo, esta tendencia no resultó ser estadísticamente significativa. Esto se puede deber a que como presentan una mayor supresión de la onda I pueden evadir con mayor facilidad los distractores y por lo tanto pierde la linealidad con las respuestas omitidas.

Correlaciones entre parámetros conductuales

Como la conducta emocional tiene efecto sobre las respuestas cognitivas (Bushnell y Strupp, 2001) se analizaron los datos a través de correlaciones entre diferentes parámetros conductuales, de manera de determinar si existió relación entre estos distintos tipos de respuestas. Hubo una correlación negativa significativa entre la eficiencia de respuesta y las respuestas anticipadas en ambos genotipos, tanto en presencia como ausencia de distractores auditivos (figura 18). Hubo una disminución de la eficiencia de respuesta, que es una medida de atención visuoespacial al aumentar las respuestas anticipadas, que es una medida de control inhibitorio (Robbins, 2002). Que en ambos genotipos hubiera una correlación significativa implica

que es independiente del receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$,

Como la eficiencia de respuestas es una medida que depende de las respuestas incorrectas, se realizó una correlación entre esta respuesta (eficiencia de respuesta) y las respuestas anticipadas. Hubo una correlación positiva significativa para los cuatro periodos para los ratones WT y en ningún periodo para los ratones KO (figura 19), por lo que la correlación pudiera ser dependiente de la presencia de receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$. Es decir, la relación entre la menor eficiencia de respuestas a mayor cantidad respuestas anticipadas observada en ambos genotipos se explica por la correlación positiva de la última con las respuestas incorrectas en los ratones WT, no así en los ratones KO.

Ansiedad y actividad locomotora en ratones WT y KO

Nuestros resultados demuestran que no existieron diferencias en la distancia total recorrida durante los 5 minutos de la prueba de campo abierto entre los ratones WT y KO, ni tampoco en la distancia recorrida en el centro y en la periferia (figura 21A,B,C). Esto indica que los ratones iniciaron el protocolo conductual sin diferencias basales en su actividad locomotora, por lo tanto las diferencias encontradas en la cantidad de presiones de palancas, omisiones y latencia de respuestas no son atribuibles a diferencias en la actividad locomotora. Además, tampoco hubo diferencias en el tiempo de permanencia y

entradas al centro y a la periferia (figura 21D,E, y figura 22A,B), por lo que el entrenamiento no produjo diferencias en el comportamiento ansioso y los ratones WT y KO iniciaron el protocolo experimental sin diferencias basales.

Para estudiar el efecto de los distractores auditivos sobre la ansiedad en los ratones WT y KO, se realizó la prueba del laberinto en cruz elevado al día siguiente de finalizado el protocolo experimental. Los ratones KO recorrieron una distancia significativamente menor en los brazos cerrados (figura 13B), por lo tanto, presentaron una menor actividad locomotora, la que pudo ser explicada en parte por la mayor cantidad de episodios y latencia de congelamiento (figura 24), sin embargo estas no implican un aumento del condicionamiento al miedo. No hubo diferencias en la ansiedad ya que el tiempo de permanencia y las entradas a los brazos abiertos no fue significativamente diferente entre ambos genotipos, sin embargo, se observó que esta fue mayor para los ratones KO.

Es probable que los cambios en los comportamientos de los brazos cerrados sean más sensibles a los cambios de la actividad locomotora porque el tiempo de permanencia siempre fue mayor en los brazos cerrados que en los abiertos. Como ha sido reportado, una menor actividad locomotora se relaciona con un mayor ansiedad tanto en *Danio rerio* (Tran et al., 2015) como en *Mus musculus* (McKinney et al., 2007). En el trabajo realizado en ratones por Dawson (1995) se observó que con el ansiolítico *d-amphetamine sulphate* utilizados a 1,5 mg/kg producían un aumento de las entradas a los brazos abiertos (disminución de la ansiedad) y un aumento de la distancia recorrida en

los brazos cerrados (aumento de la actividad locomotora), sin embargo, a 0,375 mg/kg no hubo cambios en las entradas a los brazos abiertos pero hubo un aumento en la distancia recorrida en los brazos cerrados. Por lo tanto, la disminución de la distancia recorrida en los brazos cerrados por los ratones KO pudiera ser un efecto de una ansiedad leve, provocada por la imposibilidad de evadir estímulos utilizando recursos periféricos, sin embargo, esta no se ve reflejada en las entradas a los brazos.

6. CONCLUSIONES

Este trabajo demostró que los ratones KO tienen una fuerza del reflejo olivococlear disminuida y un peor desempeño en el paradigma de atención selectiva a estímulos visuales en presencia de distractores auditivos. Por lo tanto, el desempeño conductual durante esta prueba es dependiente del receptor nicotínico $\alpha 9/\alpha 10$. La eficiencia de respuesta se relaciona con una conducta emocional ya que disminuye al aumentar las respuestas anticipadas. Además, los distractores auditivos provocan una disminución de la actividad locomotora en los ratones KO comparada con los ratones WT.

7. REFERENCIAS

1. Aedo, C. Tapia, E. Pavez, E. Elgueda, D. Delano, PH. Robles, L. Stronger efferent suppression of cochlear neural potentials by contralateral acoustic stimulation in awake than in anesthetized chinchilla. *Front Syst Neurosci.* 2015, 2;9:21.
2. Anagnostaras, SG. Wood, SC. Shuman, T. Cai, DJ. Leduc, AD. Zurn, KR. Zurn, JB. Sage, JR. Herrera, GM. Automated assessment of pavlovian conditioned freezing and shock reactivity in mice using the video freeze system. *Front Behav Neurosci.* 2010, 30;4:158.
3. Borg, E. Counter, SA. The middle-ear muscles. *Sci Am-* 1989, 261:74-80.
4. Brown, MC. Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol.* 1987, 260:605–618.
5. Bushnell, PJ. Strupp, BJ. Assessing Attention in Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 7.
6. Chambers, AR. Hancock, KE. Maison, SF. Liberman, MC. Polley, DB. Sound-evoked olivocochlear activation in unanesthetized mice. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2012, 13(2):209-17.
7. Coomes, DL. Schofield, RM. Schofield, BR. Unilateral and bilateral projections from cortical cells to the inferior colliculus in guinea pigs. *Brain Res.* 2005, 1042:62–72.

8. Dawson, GR. Crawford, SP. Collinson, N. Iversen, SD. Tricklebank, MD. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995, 118(3):316-23.
9. Delano, PH. Elgueda, D. Hamame, CM. Robles L. Selective attention to visual stimuli reduces cochlear sensitivity in chinchillas. *J Neurosci*. 2007, 11;27(15):4146-53.
10. Delano, PH. Central Auditory System. In *Atlas of Otologic Surgery and Magic Otology, Volume 1*. Jaypee Brothers. Ed. MV Goycoolea, 2012, (pp371–381).
11. Elgoyhen, AB. Johnson, DS. Boulter, J. Vetter, DE. Heinemann, S. $\alpha 9$: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*. 1994, 79:705–715.
12. Elgoyhen, AB. Vetter, D. Katz, E. Rothlin, C. Heinemann, S. Boulter, J. $\alpha 10$: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98:3501–3506.
13. Elgoyhen, AB. Katz, E. Fuchs, PA. The nicotinic receptor of cochlear hair cells: a possible pharmacotherapeutic target?. *Biochem Pharmacol*. 2009, 1;78(7):712-9.
14. Elgoyhen, AB. Katz, E. The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J Physiol Paris*. 2012, 106(1-2):47-56.

15. Elgueda, D. Delano, PH. Robles, L. Effects of electrical stimulation of olivocochlear fibers in cochlear potentials in the chinchilla. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2011, 3:317-27 .
16. Evans, GW. Johnson, D. Stress and open-office noise. *J Appl Psychol.* 2000, 85(5):779- 83.
17. Eybalin, M. Neurotransmitters and Neuromodulators of the Mammalian Cochlea. *Physiol. Rev.* 1993, 73, 309–373.
18. Galambos, R. Suppression of auditory activity by stimulation of efferent fibers to the cochlea. *J Neurophysiol.* 1956, 19:424-37.
19. Hamame, CM. Delano, PH. Robles, L. Relevance of a neutral cue in a two-choice detection task in the rat. *Biol Res.* 2006, 39(2):259-67.
20. Hamame, CM. Delano, PH. Robles, L. A neutral cue facilitates detection of a visual target by modulating attention. *Biol Res.* 2008, 41(4):473-9.
21. He, DZ. Cheatham, MA. Pearce, M. Vetter, DE. Mouse outer hair cells lacking the alpha9 ACh receptor are motile. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004, 148:19–25.
22. Helms, C. Reeves, JM. Mitchell, SH. Impact of strain and D-amphetamine on impulsivity (delay discounting) in inbred mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2006, 188(2):144-51.
23. Hernández-Peón, R. Scherrer, H. Jouvét, M. Modification of electric activity in cochlear nucleus during attention in unanesthetized cats. *Science.* 1956, 123:331-332.

24. Hindmarch, I. Cognition and anxiety: the cognitive effects of anti-anxiety medication. *Acta Psychiat. Scand.* 1998, 98:89–94.
25. Jewett, DL. Romano, MN. Williston, JS. Human auditory evoked potentials: possible brain stem components detected on the scalp. *Science.* 1970, 167(3924):1517-8.
26. Kawase, T. Liberman, MC. Antimasking effects of the olivocochlear reflex. I. Enhancement of compound action potentials to masked tones. *J Neurophysiol*, 1993, 70:2519 – 2532.
27. Lauer, AM. May, BJ. The medial olivocochlear system attenuates the developmental impact of early noise exposure. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2011, 12(3):329-43.
28. LeDoux, J. Muller, J. Emotional memory and psychopathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1997, 352(1362):1719–1726.
29. LeDoux, J. *The emotional brain.* Phoenix (an Imprint of The Orion Publishing Group), London. 1999.
30. Liberman, MC. Guinan, JJ Jr. Feedback control of the auditory periphery: Anti-masking effects of middle ear muscles vs. olivocochlear efferents. *J Commun Disord.* 1998, 31(6):471- 82.
31. Lichtenhan, JT. Wilson, US. Hancock, KE. Guinan, JJ. Medial olivocochlear efferent reflex inhibition of human cochlear nerve responses. *Hear Res.* 2015, S0378-5955(15)30136-2.
32. Loos, M. Staal, J. Schoffemeer, A. Smit, A. Spijker, S. Pattij, T. Inhibitory

control and response latency differences between C57BL/6J and DBA/2J mice in a Go/No-Go and 5- choice serial reaction time task and strain-specific responsivity to amphetamine. *Behav Brain Res.* 2010, 25;214(2):216-24.

33. Maison, SF. Liberman, MC. Predicting vulnerability to acoustic injury with a noninvasive assay of olivocochlear reflex strength. *Neurosci.* 2000, 20(12):4701 – 4707.

34. Marcotti, W. Johnson, SL. Kros, CJ. A transiently expressed SK current sustains and modulates action potential activity in immature mouse inner hair cells. *J Physiol.* 2004, 560:691–708.

35. Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.* 2001, 24:897-931.

36. May, BJ. Prosen, CA. Weiss, D. Vetter, D. Behavioral investigation of some possible effects of the central olivocochlear pathways in transgenic mice. *Hear Res.* 2002, 171(1- 2):142-157.

37. McKenna, L. Handscomb, L. Hoare, DJ. Hall, DA. A scientific cognitive-behavioral model of tinnitus: novel conceptualizations of tinnitus distress. *Front Neurol.* 2014, 6;5:196.

38. McKinney, BC. Schneider, JS. Schafer, GL. Lowing, JL. Mohan, S. Zhao, MX. Heng, MY. Albin, RL. Seasholtz, AF. Akil, H. Murphy, GG. Decreased locomotor activity in mice expressing tTA under control of the CaMKII alpha promoter. *Genes Brain Behav.* 2007, 7(2):203-13.

39. McNaughton, N. Cognitive dysfunction resulting from hippocampal hyperactivity – a possible cause of anxiety disorder? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997, 56, 603–611.
40. Melki, SJ. Li, Y. Semaan, MT. Zheng, QY. Megerian, CA. Alagramam KN. A mouse model validates the utility of electrocochleography in verifying endolymphatic hydrops. *J Assoc Res.* 2014, 15:413-21.
41. Montgomery, KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 1955, 48:254–260.
42. Mulders, W. H. and Robertson, D. Evidence for direct cortical innervation of medial olivocochlear neurones in rats. *Hear Res.* 2000, 144, 65–72.
43. Oatman, LC. Role of visual attention on auditory evoked potentials in unanesthetized cats. *Exp Neurol.* 1971, 32:341–356.
44. Ohl, F. Roedel, A. Binder, E. Holsboer, F. Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Eur J Neurosci.* 2003, 17(1):128-36.
45. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985, (3):149-67.
46. Plazas, P. Katz, E. Gomez-Casati, M. Bouzat, C. Elgoyhen, B. Stoichiometry of the $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Cholinergic Receptor. *The Journal of Neuroscience.* 2005, 25(47):10905-10912.
47. Prosen CA, Bath KG, Vetter DE, May DJ. Behavioral assessments of

- auditory sensitivity in transgenic mice. *J Neurosci Methods*. 2000, 97: 59-67.
48. Prut, L. Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003, 28;463(1-3):3-33.
49. Puria, S. Guinan, JJ Jr. Liberman, MC. Olivocochlear reflex assays: effects of contralateral sound on compound action potentials versus ear-canal distortion products. *J Acoust Soc Am*. 1996, 518 99:500-7.
50. Raphael, Y. Altschuler, R. A. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res*. 2003,60, 397–422.
51. Robbins, TW. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*. 2002, 163:362-380.
52. Robinson, O. Vytal, K. Cornwell, B. Grillon, C. The impact of anxiety upon cognition: perspectives from human threat of shock studies. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013, 7: 203.
53. Robles, L. Delano, PH. Efferent System, in "The Senses: a Comprehensive Reference", Chapter 13, Volume: Audition, Editors P. Dallos, and D. Oertel. Elsevier Press, 2008; pages 413-45.
54. Rogers, D. Jones, D. Nelson, P. Jones, C. Quilter, C. Robinson, T. Hagan, J. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked

- differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res.* 1999, 15;105(2):207-17.
55. Seibenhener, ML. Wooten, MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015, (96):e52434.
56. Sgard, F. Charpentier, E. Bertrand, S. Walker, N. Caput, D. Graham, D. Bertrand, D. Besnard, F. A novel human nicotinic receptor subunit, $\alpha 10$, that confers functionality to the $\alpha 9$ - subunit. *Mol Pharmacol.* 2002, 61:150–159.
57. Shulman, A. Strashun, AM. Afriyie, M. Aronson, F. Abel, W. SPECT Imaging of Brain and Tinnitus-Neurotologic/Neurologic Implications. *Int TinnitusJ.* 1995, 1: 13–29. *ExpBrain Res.* 2003, 153: 649–654.
58. Steckler, T. Muir, JL. Measurement of cognitive function: relating rodent performance with human minds. *Cognitive Brain Res.* 1996, 3(3-4):299-308.
59. Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci.* 2011, 13(4):495-506.
60. Taranda, J. Maison, SF. Ballestero, JA. Katz, E. Savino, J. Vetter, DE. Boulter, J. Liberman, MC. Fuchs, PA. Elgoyhen, AB. A point mutation in the hair cell nicotinic cholinergic receptor prolongs cochlear inhibition and enhances noise protection. *PLoS Biol.* 2009, 20;7(1):e18.
61. Tran, S. Nowicki, M. Muraleetharan, A. Chatterjee, D. Gerlai, R.

- Neurochemical factors underlying individual differences in locomotor activity and anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015, 4;65:25-33.
62. Trullas, R. Skolnick, P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993, 111(3):323-31.
63. Valero, MD. Hancock, KE. Liberman, MC. The middle ear muscle reflex in the diagnosis of cochlear neuropathy. *Hear Res*. 2015, 332:29-38.
64. Velluti, R. Pedemonte, M. Garcia-Auste, E. Correlative changes of auditory nerve and microphonic potentials throughout sleep. *Hear Res*. 1989, 39, 203-8.
65. Verbitsky, M. Rothlin, CV. Katz, E. Elgoyhen, AB. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*. 2000, 39(13):2515-24.
66. Vetter, DE. Liberman, MC. Mann, J. Barhanin, J. Boulter, J. Brown, MC. Saffiote-Kolman, J. Heinemann, SF. Elgoyhen AB. Role of alpha9 nicotinic ACh receptor subunits in the development and function of cochlear efferent innervation. *Neuron*. 1999, 23(1):93-103.
67. Walf, AA. Frye, CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007, 2(2):322-8.
68. Wallhausser-Franke, E. Mahlke, C. Oliva, R. Braun, S. Wenz, G. Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *ExpBrain Res*. 2003, 153:

649–654.

69. Warr, WB. Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR (eds) The mammalian auditory pathway: Neuroanatomy. Springer, New York. 1992, pp 410–448.
70. Zheng, Y. Johnson, R. Erway, C. Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear. Res.* 1999, 130, 94:107.