



MEMORIA DE TESIS DOCTORAL



Efectos de la ablación coclear unilateral en el desarrollo postnatal de las conexiones aferentes a la corteza cerebral auditiva en la rata.

DOLORES SEGUÍ PLANELLES

2005

Memoria presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas Dolores Seguí Planelles para aspirar al grado de Doctor.

DIRECTORES:

Dr. Jorge Juan Prieto Cueto

Profesor Titular del Departamento de
Histología y Anatomía,
Universidad Miguel Hernández,
Alicante

Dr. Carmen de Felipe Fernández

Profesora Titular del Departamento
de Histología y Anatomía,
Investigadora del Instituto de Neurociencias,
Alicante

Alicante, Mayo 2005

A mis padres y a Natalia



En primer lugar me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Profesor Jorge Juan Prieto Cueto, por la dedicación, el trabajo y el esfuerzo dedicado para que esta tesis saliese adelante. Por su confianza y su afecto. Del mismo modo quiero agradecer a la Dra. Carmen de Felipe la ayuda ofrecida.

También quisiera agradecer a la Dr. Maria Elena Samar de la Universidad de Córdoba en Argentina, la oportunidad que me ofreció de conocer la forma de trabajar en otros países, sin la infraestructura y los medios de los que aquí disponemos. Por el apoyo y afecto ofrecido durante mi estancia en Argentina.

Dar las gracias tanto al Departamento de Histología y Anatomía como al Instituto de Neurociencias el haber puesto a mi disposición toda la infraestructura necesaria y el asesoramiento facilitado para la realización de mi trabajo, así como el haber contribuido a mi formación científica. También a las instituciones (Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica (proyecto PM98-0103), a la “National Alliance for Autism Research” (Beca predoctoral) y a los “National Institutes of Health de los Estados Unidos” (Beca predoctoral ofrecida por el Dr. Jeffery A. Winer de la Universidad de Berkeley, California), a la Agencia Española de Cooperación Internacional (Beca de estancia en el extranjero), las subvenciones otorgadas, sin las cuales este trabajo no habría podido realizarse.

Agradecer a mis compañeras de laboratorio, Edith, Mercedes y Rocio el haber compartido conmigo tantos momentos decisivos en mi vida, por su paciencia, apoyo y consejos. Por la ayuda ofrecida a lo largo de estos años, sin la cual no hubiera podido realizar este trabajo. Y sobre todo su amistad.

A mis compañeros de cafés, Javier y Mercedes, quisiera agradecerles las conversaciones compartidas y los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A mis amigos tengo que agradecerles, el haber podido compartir con ellos grandes momentos, viajes e ilusiones, que han permitido que continuara con mi trabajo. A Steffen quisiera agradecerle el haber estado presente en mi vida en estos últimos años.

Por último quisiera agradecer a mi familia su apoyo, su ayuda, los ánimos y la confianza depositada en mí,

gracias

ÍNDICE

□ INTRODUCCIÓN	1
▪ Sistema auditivo periférico	1
-Oído externo y medio	1
-Oído interno cóclea	
-Descripción morfológica del órgano de Corti.	2
-Desarrollo del órgano de Corti y su inervación aferente.	3
▪ Vía Auditiva Ascendente	4
▪ La corteza cerebral en el sistema auditivo	6
-Áreas que componen la corteza auditiva	6
-Citoarquitectura	7
-Conexiones de las distintas áreas corticales	8
▪ Organización funcional de la corteza auditiva	9
▪ Segregación de aferencias en la corteza auditiva	10
▪ Desarrollo del sistema de conexiones corticales auditivas.....	11
▪ Efectos de la privación sensorial periférica en la vía auditiva.....	12
▪ Abreviaturas	14
▪ Figuras	15
□ HIPÓTESIS.....	21
□ OBJETIVOS	24
□ MATERIAL Y METODOS	25
▪ Sujetos de estudio	25
▪ Diseño experimental I.....	25
-Producción de lesiones	25
▪ Técnicas de control de los efectos de la lesión.....	25
-Control de la técnica quirúrgica	26
-Técnicas enzimáticas	26
-Inmunocitoquímica.....	26
▪ Diseño experimental II.....	28
-Inyección de trazadores	28
-Perfusión.....	30
-Corte del tejido	30
-Revelado de los trazadores	31
-Inyección de doble trazado.....	31
▪ Análisis de los resultados	33
-Dibujo e ilustración	33
-Composición de figuras.....	34
-Fotografía	34
-Análisis estadístico.....	34
□ RESULTADOS.....	40
▪ Control de los efectos de la lesión sobre la vía auditiva central.....	40
-Determinación del periodo crítico	40
-Alteraciones en el tamaño. Técnica de Nissl.....	40

-Alteraciones en la expresión de las enzimas. Acetilcolinesterasa, citocromo-oxidasa, NADPH-diaforasa	42
-Alteraciones en la expresión de proteínas ligadoras de calcio. Calbindina, calretinina, parvoalbúmina.	45
-Alteraciones en la expresión de c-fos.	48
▪ Conexiones tálamo-corticales y conexiones córtico-corticales interhemisféricas.....	50
-Conexiones tálamo-corticales.....	50
-Conexiones córtico-corticales	51
▪ Inyecciones de BDA	52
▪ Inyecciones de doble trazado. Topografía y grado de solapamiento entre ambos sistemas de conexiones. ...	52
□ DISCUSIÓN	55
▪ Control de los efectos de la lesión sobre la vía auditiva central.....	55
-Consideraciones metodológicas	55
-Determinación del periodo crítico	57
-Alteraciones en el tamaño, la expresión de las enzimas y proteínas ligadoras de calcio y c-fos en los diferentes núcleos de la vía auditiva.	57
▪ Organización topográfica de las proyecciones tálamo-corticales y callosas auditivas.	69
-Consideraciones metodológicas	69
-Conexiones tálamo-corticales.....	69
-Conexiones córtico-corticales interhemisféricas	74
-Solapamiento entre las aferencias tálamo-corticales y córtico-corticales en la corteza cerebral auditiva primaria	79
-Reciprocidad aferente y eferente	80
▪ Figuras	82
□ CONCLUSIONES	200
□ BIBLIOGRAFÍA	202

INTRODUCCIÓN

El sistema auditivo se encarga de la detección, análisis e interpretación de los estímulos acústicos. Para los animales, el sistema auditivo es un modo de relacionarse con el medio en el que viven y su desarrollo les ha permitido establecer mecanismos de comunicación entre individuos de una misma especie.

En los animales terrestres el sonido se recibe en el oído externo y posteriormente se dirige al oído medio en forma de energía mecánica. Esta energía es transformada en información bioeléctrica en el oído interno, siendo transmitida a través del nervio coclear hasta el cerebro. En el cerebro, la información es procesada a lo largo de la vía que transcurre desde el núcleo coclear hasta la corteza, denominada vía auditiva ascendente. Existe otro componente de la vía auditiva que se denomina vía auditiva descendente. Esta última transmite información desde la corteza cerebral hasta el receptor auditivo y transcurre paralela a la ascendente. Ambos sistemas están estrechamente relacionados. Además, la vía auditiva está conectada con otros sistemas sensoriales y con circuitos de función refleja o motora.

Sistema Auditivo Periférico

El sistema auditivo periférico se puede dividir en cuatro zonas: **el oído externo, el oído medio, el oído interno y el nervio auditivo.**

Oído externo y medio

El oído externo está formado por el pabellón auricular y el conducto auditivo externo limitando con la cara externa de la membrana del tímpano. La función del oído externo es la de recoger las vibraciones del aire que constituyen las ondas sonoras y transmitir las hasta la membrana timpánica (Fig.1).

El oído medio o cavidad timpánica es un espacio irregular situado dentro del hueso temporal. Contiene una cadena de huesecillos móviles (martillo, yunque y estribo) que comunican entre sí las zonas externa e interna y transmiten las vibraciones de la cadena timpánica, a través de la cavidad hasta el oído interno. Este sistema de huesecillos multiplica la vibración de la membrana timpánica,

superando la inercia de la perilinfa y produciendo unas ondas de presión que se conducen de forma casi instantánea a la membrana basilar. El área de la ventana oval es aproximadamente de 1/25 del área del tímpano. La energía sonora captada por aquél y transmitida por los huesecillos a la ventana oval se concentra en una pequeña superficie y, por tanto, la fuerza por unidad de área (presión) aplicada a la ventana oval es mayor que la presión desarrollada en el tímpano. Este aumento de presión es importante, ya que la inercia del fluido coclear al otro lado de la ventana oval es mayor que la del aire que se halla en contacto con el tímpano, y se requiere un incremento de fuerza para transferir eficientemente las vibraciones sonoras al fluido coclear.

Oído interno-cóclea

El oído interno se sitúa topográficamente en el espesor del peñasco del temporal, por dentro de la caja del tímpano (Fig.1). Es un sistema multicavitario de espacios muy irregulares, por lo que recibe el nombre de laberinto. Como sobre las cavidades óseas existe un recubrimiento celular, se distingue un laberinto óseo y otro membranoso. Este último encierra en sí un conjunto de líquidos que conocemos genéricamente como linfa.

La porción anterior de este laberinto es la **cóclea**, en cuyo interior se encuentra el receptor auditivo. La cóclea consiste en una estructura tubular enrollada alrededor de un eje central denominado **modiolo** (Valsalva, 1707). Dependiendo de la especie, la longitud de la cóclea varía, formando un número diferente de espiras. En la rata se pueden distinguir tres espiras: basal, media y apical. Por otro lado, y en relación al modiolo, hablamos de una zona medial de la cóclea, que es la más próxima al mismo y de una zona lateral que es la más externa (Fig. 2).

Esta demostrada la **organización tonotópica** de la cóclea. Cuando la onda sonora alcanza la cóclea, su altura (amplitud) crece hasta un máximo y luego desciende rápidamente. La distancia desde el estribo hasta el punto máximo de amplitud varía con las frecuencias de las vibraciones que inician la onda: los sonidos agudos

generan ondas que alcanzan su máximo cerca de la base de la cóclea, en cambio, los sonidos graves generan ondas con el máximo cerca del ápex.

En un corte paramodiolar (Fig. 2) se observa que la estructura tubular de la cóclea está a su vez dividida en tres compartimentos: **rampa o conducto vestibular, rampa coclear y rampa timpánica**. La rampa vestibular y la timpánica están comunicadas en la parte más apical a través de una apertura denominada **helicotrema**. La escala vestibular tiene una apertura membranosa, denominada ventana oval, donde se transmiten las vibraciones del estribo. La liberación de la presión dentro de la cóclea se realiza a través de la ventana redonda, situada en la escala timpánica.

El conducto coclear posee una base formada por la **membrana basilar** (que lo separa de la rampa timpánica), la parte interna la constituye la **lámina espiral ósea** y la parte externa el **ligamiento espiral**. El límite superior lo constituye la **membrana de Reissner**, que lo separa de la rampa vestibular. La membrana basilar es flexible, y fácilmente deprimida hacia la escala timpánica por los máximos de las ondas sonoras de la escala vestibular. Es decir, los sonidos producen distorsión en la membrana basilar, y el sitio donde la distorsión es máxima está determinado por la frecuencia de la onda sonora.

Descripción morfológica del órgano de Cortí

Localizado sobre la membrana basilar y en parte sobre la lámina espiral ósea se encuentra el receptor auditivo, el **órgano de Cortí** (Corti, 1851) (Fig. 3). Es un epitelio en el que podemos distinguir tres tipos de células: células sensoriales, de soporte y de revestimiento. Existen dos tipos de células sensoriales; las **células ciliadas internas** (CCI) y las **células ciliadas externas** (CCE), que describiremos más adelante. Las células de soporte comprenden las células de los **pilares internos y externos** y las **células falángicas internas y externas**. Las células de revestimiento se encargan de tapizar el resto de la escala media a nivel del órgano de Cortí.

Las células de los pilares se encuentran limitando un canal que se extiende a lo largo de toda la longitud del

órgano de Cortí, el **túnel interno o de Cortí**. Los cuerpos de las células de los pilares están separados por hendiduras, a través de las cuales el túnel se comunica con otras cavidades del órgano de Cortí, los **espacios de Nuel**.

Los dos tipos de células sensoriales se diferencian por su localización, morfología, inervación y función. Así, las CCI, se encuentran en la cara interna del túnel de Cortí y se disponen en una hilera a lo largo de la cóclea. Las CCE, se disponen en tres hileras y están situadas en la cara externa del túnel de Cortí.

Las CCI son relativamente cortas, su superficie está provista de estereocilios que se hallan dispuestos en la superficie celular en forma de U abierta. Por el contrario, las CCE son más largas, se sostienen sobre los vértices de las células falángicas externas y sus estereocilios forman una W y, además, poseen más hileras de estereocilios que las CCI.

La superficie superior de las células sensoriales y de soporte se encuentran unidas formando la **lámina reticular**, que mantiene rígida la parte superior de las células ciliadas.

Situada sobre el órgano de Cortí existe una matriz extracelular denominada **membrana tectoria**. La relación entre los estereocilios de las células ciliadas y la membrana tectoria es una cuestión que suscita controversias. Mientras que existe un acuerdo general sobre la relación, bien establecida, entre los estereocilios de las células ciliadas externas y la membrana tectoria (Engström y Engström, 1978), no ocurre lo mismo con las células ciliadas internas, que no están en contacto, al menos estructuralmente, con la membrana tectoria en reposo, aunque sí lo pueden estar durante los movimientos ondulatorios de la membrana basilar (Davis, 1958; Furness y Hackney, 1985). Durante el desarrollo sí están en contacto, pero a partir del día 14 postnatal se produce la separación (Rueda et al., 1996). Cuando la membrana basilar sufre un desplazamiento hacia arriba, el movimiento de la membrana tectoria en relación a la lámina reticular dobla los cilios alejándolos de la cara modiolar, debido a la acción de los puentes interciliares apicales, se abren los canales iónicos en la membrana del receptor, permitiendo un flujo de

corriente (iones K^+) hacia el interior de la célula. Por el contrario, un desplazamiento hacia abajo de la membrana basilar causa la flexión de los estereocilios en dirección opuesta, mitigando, en parte, la tensión de la membrana del receptor y reduciendo la corriente del mismo (Hudspeth y Jacobs, 1979). Los potenciales receptores modulan la entrada de Ca^{++} a través de canales de calcio dependientes de voltaje localizados en el extremo basal de la célula ciliada y, por consiguiente, la liberación del neurotransmisor.

El líquido que contiene el laberinto membranoso (linfa), puede ser de dos tipos: por un lado la escala timpánica y la vestibular contienen **perilinf**a (Breschet, 1836), la cual tiene una baja concentración de potasio y alta concentración sodio, similar al fluido extracelular. Este líquido baña también la superficie de las células ciliadas y de soporte, por debajo de la lámina reticular. La escala media está ocupada por **endolinf**a, la cual contiene altas concentraciones de potasio y bajas concentraciones de sodio, de modo similar a un fluido intracelular. Así, existe una diferencia de potencial entre las superficies superior e inferior de la lámina reticular. Esto es de gran importancia para el proceso de transducción en las células ciliadas. En reposo, existe una diferencia de potencial mantenida de 80 mV entre la endolinf a y la perilinf a, denominado **potencial endococlear**.

Desarrollo del órgano de Corti y su inervación aferente

La cóclea se desarrolla a partir del primordio ótico como un engrosamiento del ectodermo (**placoda ótica**), a ambos lados del romboencéfalo (Pearson et al., 1973; Van de Water y Ruben 1976; Van de Water, 1983; Anson et al., 1991). Cada placoda se invagina y forma una **vesícula ótica u otocisto**. De la porción ventral de dicho otocisto se origina el conducto coclear. El órgano de Corti se desarrolla a partir de unas células epiteliales engrosadas del conducto coclear (Kölliker, 1963). Este área engrosada está formada por dos montículos de células columnares: la **cresta epitelial mayor** y la **cresta epitelial menor** (Held, 1926; Retzius, 1984). De la primera agrupación celular se originan las CCI y de la segunda agrupación las CCE (Eggston y Wolff, 1947; Lim y Anniko, 1985).

El desarrollo del órgano de Corti se produce de una forma heterogénea tanto espacial como temporal. Así, está generalmente aceptado que la maduración del órgano de Corti empieza en la base de la cóclea y continúa hacia la porción apical (Bast y Anson, 1949; Weilbel, 1957; Retzius, 1981; Lim y Anniko, 1985; Lim y Rueda, 1992). Además, no todas las estructuras maduran al mismo tiempo: algunas están totalmente maduras para cuando comienza la función auditiva (hacia el día 10-12 después del nacimiento) y otras continúan la maduración hasta algunos días después (Roth y Bruns, 1992). En este sentido existe también una gran variabilidad interespecífica.

La diferenciación del epitelio coclear empieza hacia el día 12.5 de gestación en ratón (Lim y Anniko, 1985). Para el día 16 embrionario de ratón, el primordio del órgano de Corti está formado por un grupo de células denominado órgano de Kölliker. En este estadio se pueden distinguir en la porción más basal de la cóclea tres hileras de CCE y una de CCI. En el momento del nacimiento, el órgano de Corti es todavía inmaduro. Hacia el día 4 después del nacimiento, el receptor auditivo sigue siendo inmaduro, aunque se pueden distinguir los diferentes tipos celulares. La membrana tectoria está todavía unida a la superficie del epitelio. Hasta el día 8 postnatal se producen pocos cambios morfológicos. Los cambios más notables se producen entre los días postnatales 8 y 12. Para esta fecha están completamente abiertos todos los espacios extracelulares, la membrana tectoria está despegada del epitelio sensorial y se observa una incorporación de filamentos dentro de la membrana basilar. A partir de aquí hasta el día postnatal 24 los cambios que continúan produciéndose son: aumento de la altura y del área del órgano de Corti, incremento de la longitud y anchura de la membrana basilar e incremento también del área de la membrana tectoria (Lim y Rueda, 1992; Roth y Bruns, 1992).

La mayor parte de la neurogénesis del ganglio espiral tiene lugar entre los días 12 y 14 embrionarios (Ruben, 1967), aunque datos recientes en ratón muestran que para el día 14 embrionario ya se pueden ver algunas fibras contactando con las CCI y que en el

día 18.5 embrionario algunas fibras han alcanzado las CCE, excepto en la parte más apical (Bruce et al., 1997). El final de la maduración de este sistema acontece postnatalmente. Echteler (1992) en un estudio *in vitro* marcando con HRP las neuronas aferentes, observó que, en el nacimiento, la mayoría de las neuronas del ganglio muestran ramificaciones que inervan tanto las CCI como las CCE. Durante los siguientes seis días los contactos que realizan estas neuronas quedan confinados bien a las CCI o a las CCE. Esta segregación neuronal tiene lugar mediante la eliminación de conexiones inapropiadas. Idénticos resultados obtuvo Simmons (1994) en hámster, utilizando igualmente técnicas de marcaje retrógrado *in vitro*. La primera cuantificación que se realizó de las neuronas del ganglio espiral fue en pollo (Ard y Morest, 1984), y se encontró una pérdida de un 25% de las neuronas durante el desarrollo, entre los días embrionarios 8 y 14. Posteriormente se realizó un estudio similar en rata (Rueda et al., 1987), en el cual se demostró una pérdida del 22% de las neuronas en el día 6 postnatal. Esta muerte neural coincide con la llegada de las fibras eferentes que van a inervar las CCE, sugiriendo una pérdida de fibras aferentes por competición con las eferentes.

VÍA AUDITIVA ASCENDENTE

La vía auditiva de los mamíferos consta de seis eslabones fundamentales. Estas interrupciones de la vía a distintos niveles no sólo sirven como estaciones de relevo de la información auditiva, sino que cada una de ellas parece tener una función concreta en la transmisión e integración de la información auditiva, así como en la interacción de ésta con información de otros sistemas. Una de las características de esta vía es que cada uno de estos eslabones ejerce su influencia sobre el inmediatamente inferior.

Los elementos que componen esta vía son los siguientes, ordenados en dirección ascendente, desde los núcleos cocleares a la corteza cerebral (ver Fig. 4):

Núcleos cocleares

El complejo coclear está formado

por los núcleos dorsal y ventral. Las fibras del nervio coclear llegan a la división ventral de este núcleo y la dividen en dos porciones (Ryugo, 1992), una anterior (anteroventral) y otra posterior (posteroventral). Cada una de las tres divisiones es inervada por todas las fibras del nervio coclear, que se disponen siguiendo un orden cocleotópico (Rose et al., 1959). Esta disposición representa la base para la ordenación tonotópica de este sistema (Lorente de No, 1933; Osen, 1988; Rhode y Greenberg, 1992). Las fibras que provienen de la parte basal del órgano de Corti (altas frecuencias) se disponen dorsalmente, mientras que las que provienen de la parte apical (bajas frecuencias) se disponen ventralmente (Rose et al., 1959). Los núcleos cocleares constituyen la entrada de la información auditiva a la vía auditiva central, además de establecer los patrones básicos de actividad, como el temporal (Cant, 1992).

Complejo olivar superior

Se encuentra localizado en el cuerpo trapezoide. Se divide en tres núcleos principales: el núcleo lateral de la oliva superior, el medial, el núcleo medial del cuerpo trapezoide y varias regiones periolivares (Moore y Moore, 1971). En la rata existe un cuarto núcleo, el núcleo paraolivar superior, situado en la parte dorsomedial del complejo (Harrison y Feldman, 1970; Osen et al., 1984; Paxinos y Watson 1998; Kulesza y Berrebi, 2000; Saldaña y Berrebi, 2000). El complejo olivar superior es el primer lugar de la vía auditiva donde confluye la información auditiva de los dos oídos. En estos núcleos se produce la integración de la información monoaural que proviene de los núcleos cocleares y la convierte en señales binaurales (Schwartz, 1992). Estos núcleos contribuyen a codificar señales importantes para la localización espacial del sonido. Esto lo realizan mediante la diferencia interaural de tiempo, codificada en la oliva superior medial (Yin y Chan, 1990) y la diferencia interaural de intensidad cuyo código se genera en la oliva superior lateral (Schwartz, 1992).

Núcleos del lemnisco lateral

Se puede dividir en dos núcleos: uno

dorsal y otro ventral (Berman, 1968). El núcleo ventral recibe información monoaural del núcleo coclear ventral contralateral. Las propiedades fisiológicas de este núcleo sugieren que sus células podrían estar implicadas en la detección con precisión del comienzo y final de los sonidos. El núcleo dorsal recibe aferencias de prácticamente todos los núcleos auditivos inferiores. Sus neuronas tienen sensibilidad binaural. El lemnisco lateral no es una estación de relevo obligatoria. Se ha comprobado que muchas proyecciones de los núcleos cocleares o del complejo olivar superior van directamente al colículo inferior sin pasar por los núcleos del lemnisco lateral (Glendenning y Masterton, 1983; Oliver, 1984).

Colículo inferior

Está compuesto por un núcleo central rodeado por regiones mal definidas denominadas cortezas. El núcleo central es el lugar de convergencia obligada para toda la información auditiva procedente de las vías ascendente y descendente (Moore y Goldberg, 1963 y 1966; Goldberg y Moore, 1967; Casseday et al., 1976; Aitkin y Phillips, 1984). Posee una estructura laminar característica y se ha propuesto que las láminas constituyen la base de la organización tonotópica del núcleo central: las situadas dorsolateralmente procesan sonidos de frecuencias bajas, mientras que las ventrolaterales sonidos de frecuencias altas (Aitkin, 1986). Las cortezas reciben información auditiva del núcleo central e integran información auditiva con la de otras modalidades sensoriales, tales como la táctil y la visual. En estos núcleos se producen los procesos de integración multisensorial.

Cuerpo geniculado medial

Se pueden distinguir tres subdivisiones: ventral, dorsal y medial (Morest, 1964). La división ventral posee una estructura laminar que mantiene la organización tonotópica del colículo inferior (Imig y Morel, 1984). Sus proyecciones eferentes inervan la región primaria de la corteza cerebral auditiva (Winer 1992). Las divisiones dorsal y medial carecen de estructura tonotópica y se consideran regiones de convergencia polimodal. Sus

proyecciones eferentes llegan de forma difusa a las áreas de asociación unimodal y polimodal. En la vía desde el colículo inferior hasta el cuerpo geniculado medial se produce una segregación de la vía auditiva. Existe un eje central que parte del núcleo central del colículo y llega a la división ventral del geniculado medial (Calford y Aitkin, 1983) y transmite información puramente auditiva. Por otro lado hay un eje periférico o difuso que va desde las cortezas del colículo hasta las divisiones dorsal y medial del geniculado medial (Calford y Aitkin, 1983). Esta última vía estaría relacionada con la integración de información de distintas modalidades sensoriales con la auditiva. Las proyecciones del tálamo no son sólo hacia la corteza (siguiente paso de la vía) (Niimi y Matsuoka, 1979; Winer y Morest, 1983; Bowman y Olson, 1988a y b) sino que, además, proyecta a otras estructuras subcorticales tales como el caudado (Macchi et al., 1984; Takada et al., 1985) o la amígdala (Ottersen y Ben-Ari, 1979; Yasui et al., 1987).

Corteza cerebral auditiva

Representa la última estación de la vía auditiva ascendente y es donde se produce el más alto nivel de integración de la información auditiva.

Este procesamiento de la información auditiva en virtud del cual la información auditiva fluye secuencialmente a través de los núcleos cocleares, complejo olivar superior, núcleos del lemnisco lateral, colículo inferior, cuerpo geniculado medial y corteza cerebral auditiva, se conoce con el nombre de procesamiento secuencial o jerárquico. Además, el sistema auditivo también realiza un procesamiento paralelo de aspectos diferentes de la información auditiva. Existen circuitos que separan la información sobre señales de diferencia interaural de tiempo y de intensidad, necesarias para la localización del sonido. Esta información asciende en paralelo hacia la corteza auditiva, donde se procesan parámetros tales como el tiempo, la intensidad y la frecuencia del sonido. La diversidad de áreas corticales auditivas refleja la complejidad de la percepción de sonidos complejos.

LA CORTEZA CEREBRAL EN EL SISTEMA AUDITIVO

La corteza cerebral auditiva es una estructura cuya organización neuronal y su alto grado de ordenación local está muy conservada desde los insectívoros hasta los primates, a pesar de las grandes diferencias que separan a estas especies en la escala evolutiva (Winer, 1992). Al igual que en otras modalidades sensoriales, dentro del sistema auditivo, la corteza representa el nivel más alto de integración de la información acústica que asciende desde núcleos inferiores. A su vez, la corteza envía importantes proyecciones descendentes que modulan el funcionamiento de distintas estructuras subcorticales (Diamond, 1983).

Áreas que componen la corteza auditiva

Los primeros estudios de parcelación de la corteza cerebral fueron realizados por Brodmann en 1909. Desde entonces se ha estado trabajando para determinar el número, la localización y las funciones de las distintas áreas. Una comprensión más completa de la subdivisión funcional de la corteza cerebral evolucionó a partir de la mejora de las técnicas electrofisiológicas y de trazado de conexiones nerviosas. En la actualidad se siguen identificando nuevos territorios corticales.

En la rata se han propuesto varios mapas de parcelación cortical (Krieg, 1946 a, b; 1947; Paterson, 1976; Ryugo, 1976; Cipollini y Peter, 1979; Zilles y Wree, 1985). No obstante, los diferentes datos aportados son difícilmente comparables debido a la escasez de marcas anatómicas existentes en la superficie de la corteza cerebral de la rata.

Recientemente, se ha introducido un nuevo mapa de parcelación cortical, propuesto por Zilles y colaboradores (Zilles et al., 1980; Zilles y Wree, 1985). Y seguido por Schober (1986), Roger y Arnault (1989), Arnault y Roger (1990), Herbert et al (1991), Romanski y LeDoux (1993a, b). Según estos autores, la región temporal del isocórtex de rata se subdivide en tres áreas: un área auditiva primaria (Te1) y dos secundarias (Te2 y Te3), homólogas a las áreas 41, 36 y 20 de Krieg (1946), respectivamente.

La delimitación de las mismas se ha realizado sobre la base de criterios morfológicos y electrofisiológicos.

Los criterios morfológicos se han basado en estudios cito- y mieloarquitectónicos (Krieg, 1946; Zilles, 1985; Zilles y Wree, 1985; Roger y Arnault, 1989), y en estudios de conectividad (Herbert et al., 1991).

Según el modelo de Zilles y Wree (1985), Te1 se encuentra bordeada en su polo caudal por la parte lateral del área visual secundaria y en su polo rostral por el área somatosensorial parietal primaria (Oc2 y Par1, respectivamente; Paxinos y Watson, 1986). Te1 se encuentra delimitada ventrocaudalmente por Te2 y rostroventralmente por Te3. Te1 se considera el área auditiva primaria (Zilles y Wree, 1985) y otros autores han propuesto una clasificación funcional de Te1, la cual se correspondería con partes de las áreas corticales 41 y 39 de Krieg. Te1 puede subdividirse basándose en sus conexiones córtico-coliculares (Herbert et al., 1991), en una zona anterior, una media y una posterior. Estudios electrofisiológicos recientes sugieren que el área auditiva primaria Te1, se encuentra dividida en tres regiones, A1, una región anterior (A) y una posterior (P). La organización de frecuencias en la corteza temporal de la rata revelan que tanto A1 como la región posterior se encuentran organizadas tonotópicamente (Doron et al., 2002).

Basándose en criterios electrofisiológicos, Sally y Kelly (1988) describen un área auditiva primaria organizada tonotópicamente, que se corresponde con Te1. Las altas frecuencias se localizan rostralmente y las bajas caudalmente. Las bandas de isofrecuencia se alinean siguiendo un eje dorsoventral. Dorsal y ventralmente al área auditiva primaria se localizarían unas zonas con periodos de latencia más largos y peor sintonizadas a frecuencias precisas.

Te2 y Te3 constituyen la corteza auditiva secundaria (Arnault y Roger, 1990). Te2 se corresponde con partes de las áreas 36 y 20 de Krieg, y Te3 con partes de las áreas 20 y 14. Sin embargo, en un estudio reciente basado en las proyecciones entre dichas áreas, se cuestiona si Te2 es actualmente parte del sistema auditivo o si se encuentra relacionado con la vía visual (Shi y Cassel, 1997).

En el atlas estereotáxico de Swanson (1992), Paxinos y Watson (1998), y Paxinos y colaboradores (1999b), la corteza auditiva se divide en la corteza auditiva primaria (Te1), y en un cinturón que la rodea dorsal, caudal y ventralmente. Esta región se corresponde con las áreas auditivas secundarias que se denominan corteza auditiva secundaria ventral y corteza auditiva secundaria dorsal.

Aunque este modelo difiere significativamente del modelo propuesto por Zilles y colaboradores, en el presente estudio nos hemos basado en el modelo de parcelación de la corteza cerebral auditiva propuesto por Zilles y Wree (1985), por ser el más ampliamente aceptado y utilizado por otros autores.

Citoarquitectura

Games y Winer (1988), usando la técnica de tinción de Nissl y los métodos de Golgi, han analizado la arquitectura del área Te1 y han descrito seis capas en la corteza auditiva de la rata con sus principales tipos neuronales.

La capa I se extiende unas 110 μm bajo la superficie pial, representa un 10% del espesor total de la corteza (aprox. 1100 μm), y contiene neuronas de Cajal-Retzius dispersas.

La capa II tiene un espesor de unas 132 μm , lo que representa un 12% del espesor cortical total. Contiene pequeñas neuronas polimórficas densamente

empaquetadas. El límite entre las capas II-III es difícil de establecer, aunque en él se observan neuronas de mayor tamaño y una ligera disminución del empaquetamiento celular.

La capa III tiene un espesor de 143 μm , lo que representa un 13% del espesor cortical total. Se caracteriza por la heterogeneidad de la forma de sus células, así como en la orientación y formas de sus árboles axónicos y dendríticos. Contiene neuronas piramidales y de axón local, como las neuronas en cesto y las de candelabro.

La capa IV tiene un espesor de 110 μm , lo que representa un 10% del espesor cortical total. Fundamentalmente, contiene neuronas estrelladas espinosas de pequeño tamaño, distinguiéndose de las neuronas de capa III y V, las cuales son mucho mayores. También contiene neuronas de axón local como las neuronas bipolares y las de doble penacho.

La capa V tiene un espesor de unas 275 μm , lo que representa un 25% del espesor cortical total. Se diferencia de la capa IV por un sensible aumento del tamaño de las células y una disminución de la densidad neuronal. Las grandes neuronas piramidales de esta capa son más numerosas en la subcapa más profunda. Las neuronas de axón local típicas de esta capa, como en capa III, son las neuronas en cesto y las de candelabro.

La capa VI tiene un espesor de unas 330 μm , lo que representa un 30% del espesor cortical total. Contiene neuronas muy empaquetadas de contorno aplanado. Se observan tanto neuronas piramidales como no piramidales. Las neuronas no piramidales de axón local más características de esta capa son las neuronas de Martinotti de axón ascendente.

En función de su citoarquitectura, Te1 se caracteriza por una diferenciación relativamente específica entre las capas. En ella, la capa IV presenta una alta densidad celular y es más ancha que en Te2 y Te3, mientras que la capa V posee células piramidales dispersas. En Te2, los límites entre las capas son muy poco nítidos. Te3 exhibe el menor espesor cortical y las capas se identifican mejor que en Te2 (Roger y Arnault, 1989).

Conexiones de las distintas áreas corticales

Todas las áreas corticales auditivas reciben y envían conexiones neuronales desde y hacia otras regiones del sistema nervioso central (Paula-Barbosa et al., 1975; Winer et al., 1977; Reinoso-Suarez, 1985; Morel e Imig, 1987). Sin embargo, el conocimiento de las conexiones de la corteza auditiva es muy limitado, en especial si lo comparamos con otras modalidades sensoriales como la visual o la somatosensorial.

Las conexiones mejor conocidas de la corteza cerebral auditiva son las que ésta establece con otras partes del sistema auditivo propiamente dicho.

Conexiones con el tálamo

El tálamo es una estructura cerebral clave, ya que vehicula la información sensorial a las áreas sensoriales primarias de la corteza. Además, provee de información sobre el desarrollo del movimiento a las áreas corticales motoras.

El cuerpo geniculado medial es una estación de relevo de la información auditiva que proviene de los núcleos del troncoencéfalo y el colículo inferior y que se dirige hacia la corteza cerebral (Diamond, 1983). Representa el principal centro auditivo del tálamo y es la última estación de relevo que procesa la información auditiva antes de que llegue a la corteza cerebral auditiva. Está compuesto por un conjunto de núcleos que se diferencian tanto en estructura como en conexiones. Estos pueden ser agrupados en tres subdivisiones: ventral, dorsal y medial (LeDoux et al., 1985, 1987; Winer y Larue, 1987; Glerici y Coleman, 1990; Glerici et al., 1990).

La distribución de las conexiones córtico-talámicas varía en las distintas subdivisiones del cuerpo geniculado medial. La corteza auditiva presenta una conexión recíproca con el tálamo auditivo, aunque en el caso de la rata la reciprocidad no es absoluta (Winer y Laure, 1987).

La división ventral del cuerpo geniculado medial (NMGv), presenta tres subdivisiones con diferentes patrones laminares, el núcleo ventral, el núcleo ovoide y la zona marginal (Clerici et al., 1990; Winer et al., 1999b). El NMGv esta

recíprocamente conectado con área auditiva primaria Te1, a la cual envía aferencias organizadas tonotópicamente (Scheel, 1988; Roger y Arnault, 1989). Las zonas más dorsales de Te1 reciben aferencias de las zonas más rostrales de NGMv, mientras que las más ventrales lo hacen de las más caudales. Esta organización topográfica pone de manifiesto la organización tonotópica ya que se identifican tonos de alta y baja frecuencia con una representación rostrocaudal en Te1 (Sally y Kelly, 1988). El CGMv también envía proyecciones al área de asociación (Te3), en un estudio detallado Arnault y Roger, 1990 concluyen que la zona más caudal del CGMv proyecta a Te3. Las aferencias talámicas que provienen del núcleo ventral del cuerpo geniculado medial terminan principalmente sobre las neuronas de las capas corticales IIIb- IV (Vaughan, 1983; Scheel, 1988).

La división dorsal del cuerpo geniculado medial (NGMd), presenta un mosaico de cinco regiones o subnúcleos: El dorsal superficial, el dorsal, el dorsal profundo, el supragenículado y el ventrolateral (LeDoux et al., 1987; Clerici y Coleman, 1990; Clerici et al., 1990; Winer et al., 1999b). El NGMd proyecta a las áreas auditivas secundarias (Te2 y Te3) (Arnault y Roger, 1990; Clerici y Coleman, 1990; Winer et al., 1999c). Sin embargo, la información que se tiene acerca de estas conexiones es todavía muy limitada. La terminación laminar de las proyecciones tálamo-corticales desde el núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial no ha sido determinada todavía en rata (Kimura et al., 2003).

La división medial del cuerpo geniculado medial (NGMm), proyecta a todas las áreas de la corteza cerebral auditiva, pero principalmente a Te2 y Te3 y a otras regiones no auditivas (Winer, 1985; Roger y Arnault, 1989; Clerici et al., 1990; Clerici y Coleman, 1990; Arnault y Roger, 1990; Winer et al., 1999c). La proyección tálamo-cortical termina preferentemente en las capas corticales I y VI (Ryugo y Killackey, 1974; Patterson, 1976; Vaughan, 1983).

Basándose en sus características citoarquitectónicas y conectivas se ha especulado con la idea de que el NGMv estaría implicado en la función auditiva

pura, el NGMd estaría relacionado con la atención acústica, mientras que el NGMm sería un integrador multisensorial (Winer, 1985).

Conexiones córtico-corticales:

ipsilaterales y contralaterales

Los primeros datos relacionados con las conexiones córtico-corticales se obtuvieron mediante métodos de degeneración de fibras, pero en el caso de la rata la identificación de las conexiones córtico-corticales sólo fue posible a partir de la utilización de técnicas más sensibles de trazado retrógrado y anterógrado. Estas técnicas permitieron un estudio más específico, sin embargo todavía no se conoce una descripción detallada de las conexiones inter- o intrahemisféricas en la corteza cerebral auditiva de la rata.

El patrón de conexiones córtico-corticales varía de una especie a otra, aunque la organización de las conexiones córtico-corticales en el adulto presenta una serie de características comunes. En primer lugar, cada área recibe y proyecta a una región específica y restringida de otras áreas. Estas conexiones difieren en su densidad.

En segundo lugar, las conexiones son "punto a punto": pequeñas zonas dentro de dos áreas se encuentran conectadas de forma selectiva y ordenada. En tercer lugar, dentro de un área, algunas capas dan origen a axones córtico-corticales y otras capas proyectan a áreas distintas (Keller y Innocenti., 1981; Segraves y Rosenquist., 1982). Por último, dentro de una capa existen neuronas que proyectan a áreas distintas, y otras neuronas que envían axones a más de un área (Graziosi et al., 1982; Schwartz y Goldman-Rakic, 1982; Segraves e Innocenti, 1982).

Conexiones córtico-corticales contralaterales. Las fibras callosas constituyen un sistema de fibras importante, el cual interconecta áreas homotípicas y heterotípicas de las cortezas auditivas derecha e izquierda (Rüttgers et al., 1990). Las conexiones son principalmente homotípicas, es decir, se originan en la misma área del hemisferio opuesto (Wise y Jones, 1976; Miller y Vogt, 1984).

Las conexiones entre el área auditiva

primaria (Te1) y su corteza homotípica contralateral son recíprocas. Las neuronas comisurales de las áreas Te1 y Te2 ocupan la totalidad de la corteza auditiva contralateral y su distribución es homogénea (Rüttgers et al., 1990).

Las conexiones interhemisféricas se originan en las capas III y V de la corteza contralateral y terminan preferentemente en las capas I a III, V y VI (Cipolloni y Peters, 1983).

Los terminales de las neuronas de proyección comisural en la corteza cerebral auditiva de la rata se concentran en parches. Los parches callosos forman una serie de bandas con orientación dorsoventral.

Las conexiones callosas se establecen fundamentalmente entre regiones que poseen la misma representación de frecuencias (Imig et al., 1982; Rouiller et al., 1991), este circuito se origina y termina, principalmente, en regiones en que las neuronas muestran efectos de sumación a la estimulación binaural, o bandas EE (Imig y Brugge, 1978).

Conexiones córtico-corticales ipsilaterales. En la corteza auditiva de la rata se han descrito conexiones ipsilaterales entre las áreas auditivas Te1, Te2 y Te3. En concreto, Te1 proyecta a otras porciones de Te1 y Te3 tanto ipsi- como contralateralmente. Las proyecciones de Te1 en Te3 terminan en todas las capas incluidas la capa IV, mientras que las conexiones recíprocas fueron mayores en capa I y no aparecieron en capa IV (Coogan y Burkhalter, 1990, 1993). Estos resultados sugieren que Te1 y Te3 están ordenados jerárquicamente. La relación entre las áreas es idéntica a la encontrada en otros sistemas sensoriales (Van Essen y Maunsell, 1983; Coogan y Burkhalter, 1990, 1993).

Te1 y Te3 también proyectan a la parte rostródorsal de Te2. Algunos autores han encontrado conexiones recíprocas entre Te2 y la corteza auditiva Te1 y Te3 (Arnault y Roger, 1990; Romanski y Le Doux, 1993b).

ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LA CORTEZA AUDITIVA

En la corteza cerebral auditiva las neuronas se encuentran sintonizadas para

determinadas propiedades de los estímulos sonoros, y en ella existe una ordenación espacial de las frecuencias características y de la anchura de banda excitatoria de los campos receptores auditivos. Así, se ha demostrado que existe una representación cocleotópica estricta a lo largo del eje rostrocaudal de la superficie cortical, en más de un campo auditivo en cada hemisferio, en rata (Sally y Kelly, 1988) y gato (Reale e Imig, 1980). En el eje de la superficie cortical ortogonal al del gradiente de frecuencias no se observan cambios en las frecuencias características, es decir, neuronas que responden a frecuencias sonoras muy similares se encuentran ordenadas a lo largo de “contornos de isofrecuencia” en la corteza auditiva que, en la rata, corren en dirección dorsoventral. Sin embargo, hay otros parámetros de respuesta que sí varían a lo largo de este segundo eje, entre los que se encuentran el tamaño de los campos receptores, que aumentan en paralelo a la disminución de la densidad de neuronas GABAérgicas (Prieto et al., 1994a, b), o la preferencia de las neuronas a la estimulación de uno u otro oído. Se ha demostrado, de hecho, que cada banda de isofrecuencia en la corteza auditiva primaria consiste en grupos alternos de neuronas con interacciones aurales distintas, excitatorias e inhibitorias (ver la revisión de Schreiner, 1995).

Desde el punto de vista electrofisiológico se han registrado tres tipos de unidades en la corteza cerebral auditiva: (i) aquellas que responden a la estimulación del oído contralateral, pero son inhibidas por la estimulación del ipsilateral (EI: excitación/inhibición) y que son las más numerosas; (ii) las que son excitadas por la estimulación de uno u otro oído, presentando fenómenos de sumación cuando dicha estimulación es bilateral (EE: excitación/excitación) y, por último, (iii) neuronas que responden a la estimulación de solo un oído, pero la estimulación del contralateral no produce la inhibición de las mismas (MO: monoaurales), que son muy poco frecuentes (Imig y Adrian, 1977; Kelly y Sally, 1988). Estos hallazgos han planteado la posibilidad de que la corteza auditiva primaria pudiera contener una representación sistemática, o mapa, del espacio sonoro, hipótesis que se ha visto

apoyada por los resultados de experimentos de lesiones corticales que han demostrado la importancia de la corteza auditiva primaria para la localización espacial de la fuente del sonido (Jenkins y Merzenich, 1984). Sin embargo, existen evidencias de que, a lo largo de un contorno de isofrecuencia, no existe un mapa único y sistemático del acimut de la fuente sonora. Esto es debido a que los dos tipos principales de respuestas binaurales (EI y EE) se encuentran agrupadas formando bandas alternas (Middlebrooks et al., 1980). Debido a ello, lo que existe en cada banda de isofrecuencia es una representación fragmentada del espacio acimutal contralateral, con gradientes locales ocasionales, y discontinuidades entre grupos de neuronas con preferencias acimutales similares (Middlebrooks et al., 1980; Schreiner, 1995).

SEGREGACIÓN DE AFERENCIAS EN LA CORTEZA AUDITIVA

Experimentos de trazado de conexiones nerviosas han probado que las bandas EI y EE poseen aferencias notablemente distintas. En concreto, en las primeras terminan, preferentemente, los axones tálamo-corticales (McMullen y de Venecia, 1993), mientras que en las segundas lo hacen los axones procedentes de la corteza auditiva del hemisferio cerebral contralateral, que viajan a través del cuerpo caloso (Imig y Brugge, 1978). La proyección tálamo-cortical se origina en el cuerpo geniculado medial, vehicula información procedente en su mayor parte del oído contralateral, y termina en las capas corticales IIIb y IV (Vaughan, 1983; Scheel, 1988). Por el contrario, las conexiones interhemisféricas se originan en las capas III y V de la corteza contralateral, llevan información del oído ipsilateral a la corteza registrada, y terminan preferentemente en las capas I a III, V y VI (Cipolloni y Peters, 1983). De hecho, el sistema de conexiones callosas que relaciona a la corteza auditiva de cada hemisferio cortical con su homóloga contralateral es particularmente robusto. En este aspecto, la corteza auditiva se diferencia claramente de otras cortezas sensoriales, ya que en el caso de la visual, las conexiones

callosas se originan y terminan en una pequeña región, cercana al límite entre las áreas 17 y 18, que corresponde exclusivamente a la representación del meridiano vertical retiniano. Una situación semejante se da en la corteza somatosensorial, en que las fibras callosas ponen en relación sólo aquellas regiones de cada hemisferio en que se encuentran representadas las zonas más cercanas a la línea media corporal (ver la revisión de Innocenti, 1986).

Estudios previos sobre las proyecciones callosas de la corteza auditiva han demostrado que, tanto los campos axónicos terminales, como las neuronas de origen de los mismos, se encuentran agregados formando grupos separados entre sí por zonas de marcaje mucho menos intenso, que se encuentran ocupadas por axones tálamo-corticales (Zaborszky y Wolff, 1982; Vaughan, 1983). En cortes histológicos paralelos a la superficie cortical, los “parches” de intenso marcaje forman bandas alargadas rostrocaudalmente, perpendiculares a las bandas de isofrecuencia y, tal como se apuntaba anteriormente, existen evidencias experimentales de que las bandas callosas corresponden a las bandas EE de interacción binaural definidas mediante métodos electrofisiológicos. Así, las conexiones callosas de la corteza auditiva seguirían dos principios básicos: en primer lugar, que las conexiones callosas se establecen fundamentalmente entre regiones que poseen la misma representación de frecuencias (Imig et al., 1982; Rouiller et al., 1991); en segundo, y especialmente interesante desde el punto de vista funcional, es el hecho de que este circuito se origina y termina, fundamentalmente, en regiones en que las neuronas muestran efectos de sumación a la estimulación binaural, o bandas EE (Imig y Brugge, 1978). Estas conexiones constituirían, por tanto, la última decusación, y la de mayor nivel jerárquico desde el punto de vista del procesamiento de la información, de todas las que existen en el sistema auditivo ascendente, y sería fundamental en la localización del sonido (Poirier et al., 1993, 1995). Esta segregación de aferencias y propiedades funcionales convierte a la corteza cerebral auditiva en un modelo idóneo para estudiar

en el desarrollo las interacciones entre axones distintos en procedencia y función, y el modo en que estas interacciones contribuyen a la formación del mapa cortical.

DESARROLLO DEL SISTEMA DE CONEXIONES CORTICALES AUDITIVAS

El desarrollo de las conexiones de la corteza cerebral es un proceso complejo, modulado por numerosos factores, entre los cuales juega un papel predominante el de la actividad neural aferente. En el caso de la rata, las neuronas de proyección callosa de la corteza parietal se distribuyen de modo distinto a lo largo del desarrollo: estas células se encuentran distribuidas homogéneamente entre los días postnatales 0 y 6, a partir del cual el número de neuronas que participan en estas conexiones va disminuyendo en zonas discretas, de tal modo que alrededor del día postnatal 15 forman columnas separadas por zonas sin células de proyección contralateral (Ivy y Killackey, 1981). En el caso de la corteza auditiva del gato recién nacido también se ha observado que las neuronas de proyección callosa se encuentran, inicialmente, dispersas de modo muy homogéneo previamente al patrón segregado adulto (Feng y Brugge, 1983). Este proceso parece ser el resultado de la eliminación de colaterales axónicas, más que de un proceso de muerte neuronal (O’Leary et al., 1981; Feng y Brugge, 1983). No se conoce con precisión cuál es el curso temporal del establecimiento de las propiedades funcionales adultas de la corteza auditiva, en cuanto a su capacidad de procesamiento binaural, sin embargo, sí se sabe que los campos corticales auditivos tienen conexiones callosas de mayor extensión en el gato recién nacido que en el adulto, encontrándose incluso proyecciones a la corteza visual primaria (Innocenti y Clarke, 1984a). El patrón adulto de conexiones callosas aparece, precisamente, tras la eliminación de los axones callosos transitorios. El solapamiento de los cursos temporales del establecimiento de las conexiones callosas con otras aferencias corticales apunta a que los axones callosos

transitorios pueden interactuar críticamente con las mismas para el establecimiento del patrón adulto. En este sentido, existen datos que apuntan a que las aferencias tálamo-corticales juegan un papel modulador en el desarrollo postnatal de al menos algunos aspectos de la distribución de las proyecciones córtico-corticales interhemisféricas (Innocenti y Clarke, 1984b), aunque otros factores, por ejemplo hormonales, son también decisivos para el establecimiento del patrón de conexiones adulto (Berbel et al., 1993; Lucio et al., 1997). Esta hipótesis es congruente con el patrón interdigitado que las conexiones tálamo-corticales y comisurales presentan en la corteza auditiva de la rata adulta.

EFFECTOS DE LA DEPRIVACIÓN SENSORIAL PERIFÉRICA EN LA VÍA AUDITIVA

Se sabe que las distintas áreas que componen la neocorteza sensorial exhiben profundos cambios organizativos (plasticidad), como resultado de la privación del "input" sensorial en estadios tempranos. Por ejemplo, la enucleación unilateral produce cambios en las columnas de dominancia ocular y otras propiedades del córtex visual (Wiesel y Hubel, 1963, 1974) y la eliminación de las vibrisas en la rata produce cambios en la representación cortical de las mismas (Waite y Taylor, 1978). Asimismo, el daño periférico restringido es capaz de causar una profunda reorganización del cortex somatosensorial (Kaas et al., 1983; Merzenich et al., 1983), tanto en animales maduros como en desarrollo. El sistema auditivo de los mamíferos también es sensible a alteraciones en los "inputs" aferentes durante el desarrollo (Reale et al., 1987; Popelar et al., 1994). En seres humanos, los estudios magnetoencefalográficos y con RMN de pacientes adultos que habían sufrido pérdidas sensorineurales auditivas unilaterales en la infancia temprana han revelado que las respuestas corticales a la estimulación auditiva son mayores en el hemisferio ipsilateral a la lesión (Scheffler et al., 1997), así como claramente inmaduras, y semejantes a las observadas en niños, lo cual ha sido relacionado con una posible

disminución de la actividad de las conexiones callosas procedentes del hemisferio contralateral, deaferentizado (Vasama y Mäkelä, 1997).

Existen razones para suponer que la privación sensorial periférica ha de traducirse en efectos notables sobre las conexiones tálamo-corticales y callosas de la corteza cerebral auditiva. En primer lugar, se sabe que ese es el caso en otros sistemas sensoriales, como el visual, en el que se observa un mayor número de neuronas de proyección contralateral en condiciones de privación unilateral (Innocenti et al., 1985), un proceso que depende de la edad en la que se produce la lesión (Olavarria et al., 1987), y que se supone es debido a la desaparición de la sincronía de la actividad interhemisférica (Olavarria y Li, 1995). Esto se ha interpretado como la consecuencia de una alteración de las conexiones tálamo-corticales, lo cual permitiría la penetración de axones callosos en áreas corticales que no los reciben normalmente, estabilizando así las neuronas callosas inmaduras. Además, se ha demostrado un crecimiento de las arborizaciones axónicas tálamo-corticales, invadiendo el territorio de las callosas, en ratas adultas a las que se había seccionado el cuerpo calloso tres meses antes (Vaughan y Foundas, 1982; Vaughan y Peters, 1985).

Estudios más recientes realizados por Gabriele y colaboradores (2000b) en ratas prenatales y postnatales indican que la formación de los parches y de las bandas aferentes tiene lugar antes de que el animal comience a oír (día postnatal 12/13) (Jewett y Romano, 1972; Puel y Uziel, 1987), sugiriendo que la actividad neural aferente no se requiere para la organización inicial de los patrones de proyección en la vía auditiva ascendente. Sin embargo, esto no implica que algún tipo de actividad no sea fundamental en la construcción de circuitos neuronales antes de la maduración del sistema auditivo.

De hecho, Hübener y Bonhoeffer (1999) demuestran que la actividad espontánea y los gradientes moleculares contribuyen a la formación del patrón inicial que ocurre en ausencia de experiencia visual, por ejemplo, en el caso de la formación de columnas de dominancia ocular. Puede ser que estos mismos

mecanismos de desarrollo influyan en la formación de patrones de proyecciones en el sistema auditivo, antes de comenzar a oír. Evidencias cada vez mayores, sugieren que una descarga rítmica espontánea similar a la que fue descrita en la retina (Galli y Maffei, 1988; Meister et al., 1991; Wong et al., 1993; Feller et al., 1996, 1997) está presente en varios niveles del sistema auditivo antes del comienzo de la audición (Romand y Ehret, 1990; Rübsamen y Schäfer, 1990; Gummer y Mark, 1994; Lippe, 1994, Kotak y Sanes, 1995; Lippe, 1995; Kros et al., 1998; Jones y Jones, 2000). Resultados obtenidos en el embrión de pollo (Lippe, 1994, 1995) sugieren que el disparo sincrónico y rítmico observado en el nervio auditivo y en el tronco del encéfalo es generado periféricamente porque este es

Abreviaturas

abolido después de producir una cocleotomía unilateral o tras una inyección de tetradotoxina en la perilinfa (Koerber et al., 1966; Born y Rubel, 1988; Born et al., 1991; Lippe, 1994).

En este sentido, sería importante intentar dilucidar cómo la actividad neural aferente puede influir en el establecimiento y maduración de las conexiones aferentes a la corteza cerebral auditiva, así como cuál es el peso relativo de cada sistema de conexiones en dicha organización. Nosotros proponemos en el siguiente trabajo el estudio de las conexiones córtico-corticales y tálamo-corticales en la corteza auditiva de la rata en condiciones de deaferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano.

A	anterior	MO	monoaurales
a	apical	NA	nervio auditivo
A1	área auditiva primaria	NC	núcleo coclear
AI	área auditiva primaria del gato	NCCI	núcleo central del colículo inferior
AII	área auditiva secundaria del gato	NCD	núcleo coclear dorsal
b	basal	NCT	núcleo del cuerpo trapezoide
BDA	biotinylated dextrane amine, dextrano biotinilado.	NCV	núcleo coclear ventral
BF	biotin fluoresceína		
NADPH	dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato		
Cb	calbindina		
CCE	células ciliadas externas		
CCI	células ciliadas internas		
CDCI	corteza caudal del colículo inferior		
CECI	corteza externa del colículo inferior		
CGM	cuerpo geniculado medial		
CGMd	núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial		
CGMm	núcleo medial del cuerpo geniculado medial		
CGMv	núcleo ventral del cuerpo geniculado medial		
Cr	calretinina		
CT	cuerpo trapezoide		
DAB	diaminobencidina		
DB	dextrano Biotinilado		
DF	dextrano Fluoresceína		
DG	desoxiglucosa		
DTR	dextrano Tetrametilrodamina		
EAD	estria acústica dorsal		
EE	excitación/excitación		
EI	excitación/inhibición		
Ep	circunvolución ectosilviana posterior		
FS	franja suprasilviana		
GABA	ácido γ -aminobutírico		
Ins	corteza insular		

NDLL	núcleo dorsal del lemnisco lateral
NLOS	núcleo lateral de la oliva superior
NMCT	núcleo medial del cuerpo trapezoide
NMOS	núcleo medial de la oliva superior
NPOS	núcleo paraolivar superior
NVCT	núcleo ventral del cuerpo trapezoide
NVLL	núcleo ventral del lemnisco lateral
Oc2	área visual secundaria
P	posterior
Par	área somatosensorial primaria
Pv	parvoalbúmina
RMN	resonancia magnética nuclear
SII	área somatosensorial secundaria
SB	sustancia blanca
SNC	sistema nervioso central
núcleo del	cuerpo trapezoide
Te	corteza temporal
Te1	área 1 de la corteza temporal de la rata
Te2	área 2 de la corteza temporal de la rata
Te3	área 3 de de la corteza temporal de la rata
TMB	tetrametilbencidina
WGA-HRP	wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase (aglutinina de germen de trigo conjugado a peroxidasa de rábano).

EJES:

C	caudal
D	dorsal
L	lateral
M	medial
R	rostral
V	ventral

CAPAS:

I	capa 1 de la corteza cerebral auditiva
II	capa 2 de la corteza cerebral auditiva
III	capa 3 de la corteza cerebral auditiva
IV	capa 4 de la corteza cerebral auditiva
V	capa 5 de la corteza cerebral auditiva
VI	capa 6 de la corteza cerebral auditiva



HIPÓTESIS GENERAL

El establecimiento y maduración de las conexiones aferentes de la corteza cerebral auditiva, que son la base de las propiedades funcionales del procesamiento binaural de la misma, deben ser el resultado de un proceso de competición entre los axones tálamo-corticales y los callosos, dependiente de la actividad neural aferente. Por tanto, la deaferentización unilateral en animales jóvenes producirá una alteración del desarrollo del sistema, reflejada en la organización y pesos relativos de los dos sistemas de conexiones.

Si producimos una deaferentización periférica unilateral en el oído izquierdo se

producirá una alteración de la transmisión de la información sensorial que llega al tálamo contralateral a la cóclea lesionada y las proyecciones que llegan a dicho tálamo estarán alteradas tanto desde el punto de vista cuantitativo como funcional. Como consecuencia de ambas alteraciones, se producirá una organización incorrecta de la corteza cerebral, esta desorganización se reflejará tanto en el número como en la localización de células eferentes y axones aferentes del sistema de conexiones callosas en la corteza contralateral al oído lesionado (Fig.5).



OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el modo en el que, en el desarrollo, las interacciones entre axones distintos en procedencia y función contribuyen a la formación de un mapa cortical complejo, utilizando como modelo el desarrollo postnatal de las conexiones de la corteza auditiva en condiciones de deaferentización periférica parcial, conseguida mediante la ablación unilateral del receptor auditivo en el periodo postnatal temprano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Objetivo 1:** Analizar los posibles cambios plásticos y alteraciones de circuitos neuronales específicos producidos a lo largo de la vía auditiva como consecuencia de la deaferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano, mediante técnicas citoarquitectónicas, histoquímicas e inmunocitoquímicas.
- **Objetivo 2:** Al mismo tiempo que se cubre el objetivo antedicho, determinar cuál es el periodo crítico en el que la corteza cerebral presenta una mayor sensibilidad a la lesión del receptor auditivo.
- **Objetivo 3:** Analizar los efectos de la ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano en la organización topográfica de las proyecciones tálamo-cortical y callosa auditivas.

La consecución de los objetivos propuestos tiene un interés notable, tanto desde el punto de vista científico, como en su posible aplicación a medio-largo plazo. En primer lugar, permitirán profundizar en la comprensión de los mecanismos de formación de los circuitos neurales que vehiculan la información sensorial a la corteza cerebral (y que, por tanto, determinan la organización funcional de la misma) y, además, conocer cuáles son los cambios plásticos que pueden sufrir como consecuencia de lesiones periféricas.

Por otra parte, la consecución de estos objetivos permitirá determinar con exactitud la extensión y gravedad de la degeneración cortical auditiva en lesiones unilaterales del receptor durante el desarrollo, así como la dependencia que estos cambios tuviesen de la edad en que se produce la lesión, lo cual es esencial de cara a la rehabilitación. En concreto, es de especial importancia conocer el estado en que se encuentran las neuronas de porciones centrales de la vía auditiva tras la lesión del receptor porque la supervivencia y correcto funcionamiento de aquellas van a condicionar el éxito de las herramientas terapéuticas, como es el caso de los implantes cocleares. El conocimiento de cual es el momento idóneo para abordar la acción terapéutica es, por lo tanto, imprescindible desde el punto de vista pronóstico en este tipo de tratamiento, hoy en día quizá el más prometedor para la recuperación, siquiera parcial, de la audición.

MATERIAL Y MÉTODOS

SUJETOS DE ESTUDIO

Para la realización del presente proyecto se utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar pentadáctilas, de ambos sexos, criadas en el estabulario de la Universidad Miguel Hernández. Las cocleotomías unilaterales se realizaron en distintas edades del desarrollo postnatal, entre el día del nacimiento y el día 20, en que la maduración coclear es completa, tanto morfológica como funcionalmente. Tras, al menos, treinta días, los animales se utilizaron en los experimentos detallados más abajo.

Se eligió la rata albina de la cepa Wistar como animal de experimentación para este trabajo porque presenta un alto índice de reproducción, un bajo costo y una elevada resistencia a los procesos infecciosos. Además, en la literatura existe abundante información sobre la vía auditiva de las ratas albinas, por lo que es un animal muy utilizado en estudios previos sobre el trazado de conexiones de la vía auditiva. Asimismo, la rata ha sido el modelo utilizado por Paxinos y Watson en el atlas estereotáxico de rata (1986) en el cual nos basamos para obtener las coordenadas estereotáxicas para la inyección de trazadores.

El manejo de los animales, estabulación, anestesia, procedimientos experimentales y quirúrgicos, y eutanasia, se llevaron a cabo siguiendo los preceptos del Real Decreto 223/1988 y la Orden Ministerial de 13 de Octubre de 1989 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Estos procesos también se realizaron de acuerdo con la guía de experimentación animal "Principles of Laboratory Animal Care" (publicación de los NIH No. 8623, revisión de 1985).

DISEÑO EXPERIMENTAL I

Producción de las lesiones:

Las crías fueron intervenidas quirúrgicamente en los días postnatales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15 y 20. La cirugía se realizó bajo anestesia por éter dietílico (por inhalación), en edades inferiores al día 15.

En edades superiores, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Rompún y Ketamina (1:1, intraperitoneal), a dosis suficiente para mantener un estadio III, plano 2, de anestesia durante toda la intervención. La ablación se realizó en todos los casos en el lado izquierdo. La sección de la piel por debajo de la oreja del animal exponía la bulla, porción ósea del temporal que encierra el oído medio. Se practicó una abertura en la misma, de tal modo que la cóclea, fácilmente identificable, se hacía accesible. Entonces, con unas pinzas se rompió la membrana timpánica, se extrajeron los huesecillos del oído medio, y se destruyó mecánicamente la cóclea. A continuación se cerró la herida quirúrgica suturando la piel, y se dejó que el animal se recuperase. El examen macro y microscópico ulterior demostró que la destrucción coclear era completa. Los animales no presentaron alteraciones comportamentales, ni un empeoramiento en su calidad de vida.

TÉCNICAS DE CONTROL DE LOS EFECTOS DE LA LESIÓN

Para la consecución de los dos primeros objetivos propuestos, es decir el análisis de los posibles cambios plásticos y alteraciones de los circuitos específicos a lo largo de la vía auditiva en condiciones de privación y, asimismo, la determinación del periodo crítico en nuestro modelo experimental, se utilizaron diversas técnicas tendientes a determinar la existencia de cambios morfológicos y/o neuroquímicos estables en la vía auditiva tras la cocleotomía unilateral, antes de proceder a la serie de experimentos de trazado de conexiones. Entre ellas, aparte del estudio citoarquitectónico con el método de Nissl, se realizó un análisis de la expresión de diversas enzimas, proteínas ligadoras de calcio y marcadores neuronales.

Control de la técnica quirúrgica

Como medida de control del daño de la lesión se comprobó la total desaparición de la cóclea lesionada, mediante tinción con hematoxilina-eosina de cortes histológicos del hueso temporal izquierdo descalcificado.

Además, se utilizó como medida del

grado de éxito en la deaferentización auditiva el grado de reducción en el tamaño de los diferentes núcleos de relevo de la vía auditiva, así como sus posibles alteraciones morfológicas y citoarquitectónicas, para lo cual se llevó a cabo una tinción con la técnica de Nissl.

Técnicas enzimáticas

Como medidas de control que nos permitieran determinar si la cocleotomía producía, en efecto, alteraciones a lo largo de la vía auditiva ascendente supuestamente afectada, se utilizaron técnicas histoquímicas para la demostración de distintas enzimas neuronales, en distintos momentos del desarrollo postnatal temprano del sistema auditivo de la rata albina. Como primera aproximación, analizamos los cambios en la actividad de la **acetilcolinesterasa**, **citocromo-oxidasa** y **NADPH-diaforasa** en todos los niveles de la vía auditiva, desde los núcleos cocleares hasta la corteza auditiva.

Las tres técnicas enzimáticas han sido utilizadas ampliamente en estudios previos de características similares al nuestro, en múltiples estructuras del SNC.

En primer lugar procedimos a la fijación del tejido mediante perfusión intracardíaca (ver apartado Perfusión). Concretamente, en el caso de la **acetilcolinesterasa**, la perfusión fue igual que en los experimentos de WGA-HRP, en el caso de la **citocromo-oxidasa** y la **NADPH-diaforasa**, los animales fueron perfundidos igual que en los experimentos de BDA.

En las tres técnicas se realizaron cortes en congelación utilizando un microtomo de deslizamiento (Microm mod. HM 440 E, Microm Laborgeräte GMBH, Walldorf, Alemania). El grosor de los cortes fue de 60 μm . Los cortes se recogieron de forma seriada y fueron sumergidos en tampón fosfato 0,1 M, a 4 °C. Posteriormente se procedió a su revelado: en el caso de la **acetilcolinesterasa** fueron sumergidos en tampón fosfato salino 0,1 M, a 4 °C; transcurridos siete días los cortes se incubaron en una solución de acetil-tiocolina (Sigma, St. Louis, MO) a temperatura ambiente, durante 45 minutos. Tras varios lavados con agua destilada se reveló con sulfuro de sodio (Sigma, St. Louis, MO) y, por último, los cortes se incubaron en nitrato de plata al 1% (Sigma, St. Louis, MO). Los

cortes se montaron en portas gelatinizados, se deshidrataron y se cubrieron con Eukitt (Tago et al., 1986).

En el caso de la **citocromo-oxidasa** las secciones se incubaron a 37 °C en la oscuridad, durante 15-16 horas aproximadamente, en un medio de incubación de tampón fosfato 0,1 M conteniendo 55,5% de DAB (Sigma, St. Louis, MO), 20% de citocromo C (Sigma, St. Louis, MO) y 4,2% de sacarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) tras varios lavados con tampón fosfato 0,1 M se deshidrataron las secciones y se cubrieron con Eukitt (Gonzalez-Lima y Cada, 1994).

Por último, en el caso de la **NADPH-diaforasa**, las secciones en flotación en el tampón fosfato 0,1 M, se incubaron durante 4-5 horas, a 37 °C, en una solución de tampón fosfato salino 0,1 M, conteniendo 0,1% de β -NADPH (Sigma, St. Louis, MO) 0,3% de tritón X-100 (Sigma, St. Louis, MO) y 0,02% de nitroazul de tetrazolio (Sigma, St. Louis, MO). Posteriormente, se lavaron los cortes con tampón fosfato salino 0,1 M, se deshidrataron y se cubrieron con Eukitt, como en los casos anteriores (Reuss, 1998).

Inmunocitoquímica

Inmunocitoquímica para

proteínas ligadoras de calcio:

Calbindina, parvalbúmina,

calretinina

Con el fin antedicho de comprobar la afectación de la vía auditiva tras la deaferentización unilateral se realizaron experimentos de inmunocitoquímica para proteínas ligadoras de calcio (calbindina, parvalbúmina, calretinina), caracterizando así subpoblaciones neuronales en el desarrollo normal del sistema nervioso y analizando las posibles alteraciones de circuitos neuronales específicos.

Las proteínas ligadoras de calcio, **calbindina**, **calretinina** y **parvalbúmina**, han sido escogidas por su función en la homeostasis del calcio.

Dichos ensayos se llevaron a cabo en cortes obtenidos en congelación, mediante un microtomo de deslizamiento.

El grosor de los cortes fue de 60 μm . La fijación del tejido para inmunocitoquímica se realizó mediante perfusión intracardíaca. En primer lugar se pasaron 300 cc de una solución de lavado de cloruro de sodio (Sigma, St. Louis, MO) al 0,9% durante 5 minutos, seguido de una solución fijadora de paraformaldehído al 4% (Sigma, St. Louis, MO) en tampón fosfato 0,1 M.

El proceso inmunocitoquímico ha sido descrito en detalle por Petralia y Wenthold (1992). Las secciones se preincubaron mediante flotación en suero de cabra o de caballo (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluido al 10% en tampón fosfato 0,1 M que contenía tritón X-100 (0,25%), durante dos horas, a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron durante 24 horas, a 4 °C, en una solución con el anticuerpo policlonal (conejo) o monoclonal (ratón) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los anticuerpos primarios utilizados fueron obtenidos comercialmente de Swant (Bellinzona, Suiza) y fueron los siguientes:

- **Calbindina:** Se utilizó como anticuerpo primario anti-calbindina, monoclonal, producido en ratón, diluido a una concentración de 1:2000 y como anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado hecho en caballo diluido a 1:200.
- **Calretinina:** Como anticuerpo primario anti-calretinina, policlonal, producido en conejo, diluido a una concentración de 1:2000, y el anticuerpo secundario fue anti-conejo, producido en cabra, diluido a 1:200.
- **Parvoalbúmina:** Anticuerpo monoclonal, producido en ratón, diluido a 1:2000, y el secundario anti-ratón biotinilado, hecho en caballo, diluido a 1:200.

Una vez finalizada la incubación las secciones se lavaron varias veces en tampón fosfato 0,1 M. Seguidamente se procedió a la incubación de las secciones en el anticuerpo secundario antedicho y, tras varios lavados, los cortes se revelaron con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa mediante el "Kit" ABC Elite de Vector (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Transcurrido el tiempo de incubación del complejo, se reveló mediante la utilización de DAB como cromógeno e intensificando la reacción con metales pesados (níquel-

cobalto). Una vez finalizada la reacción se procedió al montaje y a la deshidratación de los cortes mediante alcoholes de 70°, 96°, 100° y Xilol, y finalmente se cubrieron con Eukitt.

Inmunocitoquímica para c-fos

Como otra medida de control de la afectación de la lesión unilateral en la vía auditiva se procedió a realizar técnicas inmunocitoquímicas utilizando anticuerpos contra c-fos, en animales controles y cocleotomizados en el periodo postnatal temprano, expuestos a un estímulo sonoro. El gen *c-fos* produce una proteína denominada **c-fos**, la cual actúa como factor de transcripción controlando el paso del ADN a ARNm. Generalmente, la expresión de c-fos es muy baja en las células y se activa por un estímulo, por ejemplo, un estímulo acústico. La expresión del c-fos ha sido ampliamente utilizada como marcador bioquímico de la actividad neuronal, de modo que una disminución se entiende como debida a una disminución de las aferencias sobre la población neuronal estudiada.

Los animales se mantuvieron durante 4 horas en una habitación de doble pared con aislamiento acústico, posteriormente fueron sometidos a una estimulación continua de ruido blanco durante una hora antes de ser perfundidos. Para diferenciar esta actividad neuronal basal de otra debida a la estimulación sensorial específica.

Dichos experimentos se llevaron a cabo en material procesado como en el resto de técnicas inmunocitoquímicas. Las secciones se lavaron varias veces en tampón fosfato 0,1 M con cloruro sódico al 0,9 %, que además contenía gelatina (0,2%) (Merck, Darmstadt, Alemania) tritón X-100 (0,25%) y azida sódica (0,1%) (Sigma, St. Louis, MO). Seguidamente las secciones se introdujeron en PBS con tritón (0,25%) y agua oxigenada al 0,3% (Sigma, St. Louis, MO), durante 30 minutos, en oscuridad y agitación. Una vez finalizado este paso las secciones se lavaron varias veces en PBS, con gelatina, tritón y azida sódica, posteriormente se preincubaron durante una hora en la misma solución que los lavados con lisina al 10% (Sigma, St. Louis, MO). Una vez finalizada la preincubación las

secciones se incubaron durante toda la noche a 4 °C en el anticuerpo primario policlonal anti c-fos (Ab-5) (Oncogene Research Products, Alemania) a una dilución de 1:500, con agitación suave. Tras la incubación, las secciones se lavaron varias veces en tampón fosfato 0,1 M salino, que contenía tritón y gelatina. A continuación se procedió a la incubación de las secciones en un anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado hecho en cabra (Vector, Burlingame, CA), diluido 1:200, en tampón fosfato 0,1 M salino con tritón y gelatina, durante una hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados, las secciones se revelaron con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa mediante el "Kit" (ABC) Elite de Vector. Transcurrido el tiempo de incubación del complejo, se reveló mediante la utilización de DAB como cromógeno. Una vez finalizada la reacción se procedió al montaje y a la deshidratación de los cortes mediante alcoholes de 70°, 96°, 100°, y xilol, finalmente se cubrieron con Eukitt.

DISEÑO EXPERIMENTAL II

Inyección de trazadores:

Al menos un mes después de la ablación coclear, se procedió a la inyección de los trazadores. La técnica quirúrgica precisó de la fijación de la cabeza de la rata en una base estereotáxica (Kopf, mod. 902, David Kopf Instruments, Tujunga, CA). La fijación de la cabeza al soporte permitía conseguir su perfecta inmovilización y poder registrar las coordenadas estereotáxicas de las zonas de inyección cortical y talámica, así como para medir la profundidad de las mismas, parámetro crucial, puesto que es necesario evitar inyectar la sustancia blanca. La intervención se realizó bajo anestesia con Rompún/Ketamina, que se indujo administrándola por vía intraperitoneal, y que se mantuvo suplementando más anestésico a lo largo de la misma, según fuera necesario. Antes de comenzar la cirugía, se le aplicaba al animal pomada oftálmica (Cloranfenicol, Parke-Davis, Warner-Lambert Co., Morris Plains, NJ) para evitar que se le deshidratase y ulcerase la córnea.

A continuación se realizó una

incisión en la línea media de la piel de la cabeza y se fue desinsertando y retirando cuidadosamente el músculo temporal para dejar al descubierto la superficie del cráneo. Seguidamente se localizó la zona donde se quería inyectar y se realizó la craneotomía mediante el fresado del hueso con una fresa dental. Para evitar la deshidratación del cerebro, en esta región se colocó aceite de silicona estéril (Dow Corning).

Para la identificación del área auditiva primaria (Te1) y del cuerpo geniculado medial se tomaron las coordenadas estereotáxicas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986).

Para el estudio de la localización de las neuronas marcadas retrógradamente en la corteza cerebral auditiva tanto en animales controles como en animales deaferentizados se realizaron inyecciones de WGA-HRP (Fig. 6).

Inyección de WGA-HRP

El trazador empleado fue la WGA-HRP (wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase). Una primera razón para la elección de la WGA-HRP como trazador de conexiones neurales en este estudio es que ha sido utilizada en numerosas especies animales y una gran variedad de sistemas. La HRP es una enzima que, depositada en el espacio extracelular, es captada por las neuronas tanto a nivel de los axones como del soma y dendritas, mediante micropinocitosis. La unión de una molécula de la lectina Wheat germ agglutinin a la peroxidasa aumenta en un 500% la afinidad de las membranas neuronales por la HRP, lo cual resulta en un marcaje mucho más intenso tanto de los terminales axónicos como de los somas neuronales (M-M. Mesulam en "Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase", A.D. Smith, ed. Wiley & Sons, New York, pp. 1-152, 1982). Una ventaja adicional de este trazador es que, debido a que la WGA se une a los terminales sacáridos de ácido siálico, que son prácticamente ubicuos en las membranas celulares, la difusión del trazador es mucho menor que el de la HRP sola. Esta última propiedad permite inyectar la casi totalidad de un área cortical mediante varias inyecciones individuales restringidas, mientras que la HRP por sí sola, por su mayor capacidad de difusión, puede con mayor facilidad extenderse a áreas corticales

vecinas, produciendo de este modo resultados de difícil, o imposible interpretación. Una vez en el interior de la célula, la WGA-HRP queda envuelta por membrana, formando vesículas, y pudiendo ser transportada de esta manera a lo largo de toda la célula y de su axón, tanto anterógrada como retrógradamente. El transporte retrógrado del trazador es aquel que se dirige desde los terminales axónicos localizados en la zona de inyección hasta el soma neuronal, mientras que el anterógrado lleva el trazador captado en el soma y las dendritas hacia los terminales axónicos. De este modo, el origen de las aferencias y la terminación de las eferencias de un área determinada pueden ser observados con una única inyección de trazador, lo que hace de este método una técnica de gran sencillez y eficacia. Las inyecciones, extracelulares, se realizaron por presión a través de micropipetas de vidrio, con puntas de un diámetro entre 30 y 60 μm , utilizando WGA-HRP (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 5% en agua destilada estéril. Para ello se usó un inyector hidráulico controlado electrónicamente (Nanoliter Injector, World Precision Instruments, Sarasota, FL). El inyector se mantuvo fijo al soporte estereotáxico. En un grupo de animales experimentales se inyectó la corteza (área 41, o Te1) ipsilateral a la lesión con el fin de analizar el lado contralateral a la lesión que sería el lado alterado, mientras que en otro grupo la inyección se colocó contralateral al oído lesionado, para analizar el lado ipsilateral a la lesión que sería el normal. En estos casos, la inyección se realizó a una profundidad de 500 μm .

En todos los casos la inyección constaba de un único paso de 73,6 nl. Al final de la inyección se esperaban 5 minutos. Transcurrido este tiempo se sacaba la micropipeta muy despacio para evitar arrastrar parte del trazador y se comprobaba que siguiera siendo permeable.

Inyección de BDA

Además de las inyecciones de WGA-HRP, se realizaron inyecciones de un trazador únicamente anterógrado, el BDA (Biotinylated dextran amine) mediante el cual se confirmaron los resultados de marcaje obtenidos con el resto de marcadores utilizados y, además, permitió examinar con detalle características

morfológicas de las porciones terminales de los axones marcados, tales como su número, tamaño, forma y distribución, ya que el BDA rellena la totalidad del axoplasma. El BDA (Peso molecular 3K; Molecular Probes, Eugene, OR;) es inyectado en el espacio extracelular y captado por las neuronas gracias al daño tisular producido, bien por la corriente, bien mecánicamente por la punta de la pipeta y la presión ejercida por la inyección. El trazador atraviesa la membrana de las células difundiéndose en teoría en ambas direcciones, retrógrada y anterógrada, aunque se ha demostrado que es mucho mejor trazador anterógrado. El transporte anterógrado revela los axones marcados con un gran detalle, semejante a una impregnación con el método de Golgi, permitiendo así el análisis posterior, mediante microscopía óptica, de la morfología de los terminales axónicos en las distintas divisiones del cuerpo geniculado medial.

Bajo anestesia profunda, el BDA se inyectó estereotáxicamente a través de una craneotomía dorsal, bien mediante iontoforesis (disuelto en suero salino al 10%) utilizando un generador de corriente alterna positiva de 5 μA durante 10-15 min.), o bien mediante presión (disuelto al 10% en agua destilada) utilizando el inyector de nanolitros. En ambos casos se utilizaron micropipetas de vidrio con un diámetro que varió entre 30 y 60 μm . En un grupo de animales experimentales se inyectó la corteza (Te1, área 41 de Brodmann) ipsilateral a la lesión, para analizar las conexiones córtico-corticales en la corteza contralateral a la cóclea lesionada, que sería la alterada y en otro grupo la inyección se realizó en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial del tálamo derecho, para analizar las conexiones tálamo-corticales a la corteza cerebral auditiva que recibe información de la cóclea lesionada.

En ambos casos los dispositivos de la inyección se mantuvieron fijos al soporte estereotáxico mediante un micro-manipulador, con la inclinación adecuada a cada caso.

Tras la inyección de uno u otro trazador se suturó el músculo temporal con catgut cromado (3/0) y la piel de la cabeza con hilo monofilamento de nylon (3/0), cubriendo la cicatriz con una pomada

antibiótica.

Perfusión

WGA-HRP

La perfusión se realizó tras un periodo de supervivencia de 48 a 72 horas, que se considera un periodo que permite que se transporte un máximo de trazador, sin que haya comenzado todavía la degradación enzimática del mismo en el interior de las neuronas. Transcurridos los días precisos, los animales fueron reanestesiados y perfundidos intracardíacamente con soluciones fijadoras. En primer lugar se pasó una solución de lavado (300 cc) de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) al cual se le añadió cloruro de calcio al 1% (Sigma, St. Louis, MO) posteriormente se pasaron 300 cc del primer fijador, que contenía una mezcla de glutaraldehído al 0,5% (Sigma, St. Louis, MO) y paraformaldehído al 0,5% en PB 0,1 M, durante 10 minutos, a 4 °C, seguidos de 300 cc de una mezcla de paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1,5% en tampón fosfato 0,1 M durante 20 minutos, a 4 °C. Por último, se perfundió con una solución de sacarosa al 10% en tampón fosfato 0,1 M, durante 15 minutos a 4 °C.

BDA

En los experimentos de BDA, el tiempo de supervivencia tras la inyección del trazador es de 7 a 10 días, para permitir el transporte del mismo hasta las terminaciones axónicas más distantes. Los animales fueron reanestesiados y perfundidos intracardíacamente, iniciándose con 200 cc de una solución de lavado (tampón fosfato 0,1 M a la que se añade cloruro de sodio al 0,9% (Sigma, St. Louis, MO) y, seguidamente, se utilizó como único fijador una solución de 500 cc de paraformaldehído al 4% con cloruro cálcico al 1% (Sigma, St. Louis, MO). El resto de la perfusión fue igual que en los experimentos de WGA-HRP. El tiempo empleado para obtener marcaje con BDA es mayor que con WGA-HRP debido a que, mientras que ésta utiliza mecanismos activos de transporte celular, el BDA se transporta por mera difusión, lo que hace más lento el proceso.

En ambos casos, tras la perfusión las ratas fueron decapitadas y se expuso

ampliamente el cerebro mediante craneotomía. La cabeza se fijó a la base estereotáxica y se procedió a realizar cortes coronales utilizando una hoja de bisturí fijada a un manipulador estereotáxico. La razón de hacerlo así es dividir el encéfalo en varios bloques cuyas superficies sean idénticas entre experimentos. Ello permite que la forma e inclinación de los cortes en los tres ejes del espacio sea perfectamente reproducible entre experimentos. Merced un corte de este tipo, se dividió el cerebro en dos bloques, que fueron cortados por separado: uno conteniendo los lóbulos frontales y otro la protuberancia.

Seguidamente, se introdujeron en una solución de crioprotección que contenía sacarosa al 20% en tampón fosfato 0,1 M, a 4 °C. Transcurridas 4-6 horas, fue sustituida por una solución más concentrada, con un 30% de sacarosa en tampón fosfato 0,1 M también a 4 °C, hasta que las piezas se encontraban completamente sumergidas.

Corte del tejido

Se realizaron cortes en congelación de los dos bloques de tejido obtenidos, utilizando un microtomo de deslizamiento. El grosor de los cortes fue de 60 µm en los casos de WGA-HRP y de 50 µm para los de BDA. Los cortes se recogieron en orden seriado y fueron sumergidos en tampón fosfato 0,1 M, a 4 °C. En el caso de la inyección de WGA-HRP los cortes se dividieron en tres series y en el caso de las inyecciones de BDA los cortes se dividen en dos series.

Cada serie estaba formada por cortes alternos separados entre sí 120 µm en el caso de los experimentos en los que se inyectó WGA-HRP y 100 µm en los que se utilizó BDA como trazador.

Revelado de los trazadores

Revelado de la WGA-HRP

Se utilizaron dos técnicas distintas para el revelado del trazador: para la demostración del marcaje se utilizó el método de la tetrametilbencidina (TMB) de Mesulam (1978), mientras que para realizar el control de la inyección se aplicó el cromógeno diaminobencidina (DAB) (ver figura 6).

Estudios comparativos previos han demostrado que la TMB es más liposoluble

que otros cromógenos, lo que le proporciona una mayor accesibilidad al interior de las vesículas donde se localiza el trazador. El revelado de la WGA-HRP con TMB se produce gracias a la aparición de un precipitado granular de color negro o azul oscuro en los lugares donde la enzima muestra actividad. Dicho color oscuro y el gran volumen de los gránulos del producto de la reacción permiten una localización fácil y rápida del marcaje, tanto anterógrado como retrógrado, mediante microscopía de campo oscuro y polarización.

La razón de utilizar DAB para el control de la zona de la inyección es que es un cromógeno que, al ser menos sensible y producir comparativamente, mucho menos marcaje anterógrado que la TMB, permite una delimitación más exacta de la profundidad y extensión la zona de inyección. De este modo, se logra evitar la confusión resultante de la aparición de nubes de marcaje anterógrado adyacentes al lugar de la inyección producido por la captación del trazador por parte de los axones de proyección local córtico-cortical, como aparece en el revelado con TMB. Al contrario que lo que ocurre con la TMB, la DAB no precipita en forma de cristales, por lo que el producto de reacción se analiza mediante microscopía de campo claro.

Para el revelado y la tinción de contraste en el caso de los experimentos con WGA-HRP se realizaron tres series distintas: una que fue teñida con el método de Nissl para control de la citoarquitectura, una en que el trazador fue revelado con DAB para el control de la extensión de la inyección y posteriormente contrateñida con violeta de cresilo, y una tercera serie en que la WGA-HRP fue revelada con TMB para el análisis del transporte anterógrado y retrógrado; esta última serie fue teñida con rojo neutro.

Revelado del BDA

Este trazador fue revelado utilizando el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa, mediante el "Kit" ABC Elite de Vector. Transcurrido el tiempo de incubación con el complejo, éste se reveló mediante la utilización de DAB como cromógeno e intensificando la reacción con metales pesados (níquel-cobalto) (Adams, 1981). Una vez finalizada la reacción, los cortes se

montaron en portas gelatinizados y dos cortes de cada seis se tiñeron con el método de Nissl para la determinación de la citoarquitectura del sistema nervioso central.

Inyección de doble trazado

Con el fin de establecer el patrón de distribución de las conexiones tálamo-corticales y córtico-corticales procedimos a la realización de dos series de inyecciones.

En primer lugar para obtener las conexiones tálamo-corticales procedimos a la inyección en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial del tálamo con una mezcla al 10% de Dextrano Biotinilado (Biotinylated dextran amine, BDA) (Molecular Probes, Eugene, OR) y al 10% de Dextrano Fluoresceína (Molecular Probes, Eugene, OR).

En segundo lugar, con el fin de determinar las conexiones córtico-corticales, colocamos una inyección de Dextrano Tetrametilrodamina (Molecular Probes, Eugene, OR) (10%) en el área auditiva primaria (41, o Te1) de la corteza cerebral auditiva.

Además, para analizar la interacción e interdigitación de las aferencias tálamo-corticales con las aferencias córtico-corticales interhemisféricas en la corteza cerebral auditiva, se realizaron inyecciones de doble trazado. Se realizaron dos inyecciones, una inyección en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial del tálamo con una mezcla al 10% de Dextrano Biotinilado (DB) y al 10% de Dextrano Fluoresceína (DF) y otra inyección de Dextrano Tetrametilrodamina (DTR) (10%) en el área auditiva primaria (41, o Te1) de la corteza cerebral auditiva.

Bajo anestesia profunda, las inyecciones extracelulares se realizaron estereotáxicamente a través de una craneotomía dorsal. Los dispositivos de la inyección se mantuvieron fijos al soporte estereotáxico mediante un micromanipulador, con la inclinación adecuada a cada caso.

En estos experimentos el trazador se inyectó por presión mediante el inyector de nanolitros, para lo cual el trazador se diluyó al 10% en agua destilada. En ambos casos se utilizaron micropipetas de vidrio con un diámetro que varió entre 30 y 60 μm . En los animales experimentales la inyección de DB+DF se colocó en el núcleo ventral del

cuerpo geniculado medial del tálamo derecho (contralateral a la cóclea lesionada) y en el caso de las inyecciones de DTR se colocaron en el área auditiva primaria (41, o Te1) de la rata (ipsilateral a la cóclea lesionada) (ver figura 7). Las inyecciones en la corteza cerebral auditiva se realizaron a una profundidad de 500 μm , y las inyecciones en el cuerpo geniculado medial se realizaron a 6000 μm .

Cada inyección constaba de un único pulso de 46 nl. Al final de cada inyección se esperaban 5 minutos. Transcurrido este tiempo se sacaba la micropipeta muy despacio para evitar arrastrar parte del trazador y se comprobaba que seguía siendo permeable.

Tras la inyección de uno u otro trazador se suturó el músculo temporal con catgut cromado (3/0) y la piel de la cabeza con hilo monofilamento de nylon (3/0), cubriendo la cicatriz con una pomada antibiótica.

Perfusión

La perfusión se realizó tras un periodo de supervivencia de 7 a 10 días. Transcurridos los días precisos para que los trazadores se transporten adecuadamente, los animales fueron reanestesiados y perfundidos intracardíacamente con soluciones fijadoras. En primer lugar se pasó una solución de lavado (200 cc) de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) al que se añadía cloruro de sodio al 0,9%. Seguidamente, se utilizó como único fijador una solución de 500 cc de paraformaldehído al 4% con cloruro de calcio al 1%. El resto de la perfusión fue igual que en los casos anteriores.

Una vez finalizada la perfusión, las ratas fueron decapitadas y se expuso ampliamente el cerebro mediante craneotomía. El cerebro se cortó a través de la sustancia blanca subcortical entre la corteza y el tálamo utilizando una hoja de bisturí, se dividió en tres bloques, que fueron cortados por separado: uno conteniendo el hemisferio derecho, otro conteniendo el hemisferio izquierdo y un tercero el diencéfalo. Seguidamente, se introdujeron en una solución de fijación (la misma que la utilizada en la perfusión) durante 24 horas, seguidamente los fragmentos se sumergieron en una solución de crioprotección que

contenía un 20% de sacarosa en tampón fosfato 0,1 M, a 4 °C. Transcurridas 4-6 horas, fue sustituida por una solución más concentrada, con un 30% de sacarosa en tampón fosfato 0,1 M también a 4 °C, hasta que las piezas se encontraban completamente sumergidas.

Corte del tejido

El material inyectado con inyecciones simples fue cortado coronalmente, el grosor de los cortes fue de 60 μm . En el caso de las inyecciones dobles se realizaron tres bloques de tejido, los dos hemisferios que fueron cortados tangencialmente y el diencéfalo coronalmente. En el caso de los dos bloques de los hemisferios derecho e izquierdo se recogieron todos los cortes hasta que apareció la sustancia blanca. Y en el caso del diencéfalo cada serie estaba formada por cortes alternos separados entre sí 120 μm .

En ambos casos para el corte del tejido utilizamos un microtomo de deslizamiento. Los cortes se recogieron y fueron sumergidos en tampón fosfato 0,1 M, a 4 °C.

Revelado de los trazadores

Antes de proceder a su revelado comprobamos mediante un microscopio de fluorescencia (Zeiss mod. HBO 100 W/2, Axiophot, West Germany) la localización de la inyección y la extensión del marcaje, en el caso de error esto nos evitaría los procesos sucesivos.

En primer lugar se procedió al revelado del DB+DF. Este trazador fue revelado utilizando el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa, mediante el "Kit" ABC Elite de Vector (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Transcurrido el tiempo de incubación con el complejo, éste se reveló mediante la utilización de DAB como cromógeno e intensificando la reacción con metales pesados (níquel-cobalto). Una vez finalizada la reacción, se llevaron a cabo técnicas inmunocitoquímicas para el revelado del DTR y se procedió a la incubación de las secciones en el anticuerpo primario policlonal (hecho en conejo) anti-tetrametil-rodamina (Molecular Probes, Eugene, OR) a una concentración de (1:12.000) durante la noche, a 4 °C. Tras finalizar la incubación las secciones se lavaron varias veces en tampón TBS-Tx a pH.7,6 conteniendo Tris 0,05M, ClNa 9%, y tritón X-100 al 0,5% en agua destilada. Seguidamente se procedió a la incubación de las secciones en el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado hecho en cabra (Vector, Burlingame, CA) diluido 1:200 en tampón TBS-Tx, durante la noche, a 4 °C y, tras varios lavados, las secciones se revelaron con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa mediante el "Kit" ABC Elite de Vector. Transcurrido el tiempo de incubación del complejo, se reveló mediante la utilización de DAB como cromógeno. Una vez finalizada la reacción se procedió al montaje y a la deshidratación de los cortes mediante alcoholes de 70°, 96°, 100°, y Xilol, finalmente se cubrieron con Eukitt.

Análisis de los resultados

Dibujo e ilustración

En el presente trabajo se ilustran los resultados de treinta y dos animales que han sido tratados con diferentes técnicas: técnica de Nissl, las técnicas enzimáticas para acetilcolinesterasa, citocromo-oxidasa, y NADPH-diaforasa, las técnicas inmunocitoquímicas para las proteínas ligadoras de calcio: calbindina, calretinina y parvalbúmina, y la técnica inmunocitoquímica para c-fos. Concretamente, se han ilustrado dos animales por técnica, cada animal perteneciente a un grupo experimental distinto, es decir un animal

control y un animal cocleotomizado en el periodo postnatal temprano, del cual se ilustra tanto su lado ipsi- como contralateral al oído lesionado.

En el presente trabajo se han analizado los resultados obtenidos en doce de los animales utilizados en los experimentos de trazado con WGA-HRP. Estos datos se han empleado para el conteo de las neuronas marcadas retrógradamente en el hemisferio contralateral a la inyección de WGA-HRP, y se pueden observar en las gráficas realizadas a tal efecto y en los dibujos correspondientes a dos animales, un animal control y un animal cocleotomizado del cual se ilustra tanto su lado ipsi- como su lado contralateral a la lesión.

Los casos de inyecciones simples con BDA se utilizaron para confirmar los resultados de las inyecciones de WGA-HRP y de las inyecciones dobles, y no se ilustran en este trabajo.

En el caso de las inyecciones dobles se ilustran los resultados de ocho casos de los treinta y un animales utilizados en las inyecciones de trazadores dobles. Concretamente ilustramos cuatro casos coronales de los diecisiete animales inyectados con trazadores dobles que han sido cortados de forma coronal, los restantes sirvieron para confirmar los datos aquí presentados sin que aportaran nuevos hallazgos.

De los catorce casos cortados tangencialmente, en el presente estudio se ilustran cuatro, los diez restantes sirvieron para confirmar los datos aquí presentados.

En todos los experimentos en los cuales hubo inyección de trazadores se llevó a cabo un control de la zona de inyección, con el fin de comprobar que la difusión del trazador en la zona de inyección no sobrepasara los límites del área cortical o talámica elegida, ni invadiera la sustancia blanca subcortical. También en todos los casos, tanto en los que se inyectó WGA-HRP como aquellos en los que se realizaron inyecciones de BDA o inyecciones de doble trazado, las inyecciones fueron restringidas y nunca penetraron hasta la sustancia blanca subcortical, si bien todas las inyecciones comprendían las seis capas corticales. Esto se pudo comprobar mediante la reconstrucción de la zona de la inyección a partir de los dibujos de los cortes coronales,

en los que aparece el halo de difusión del trazador revelado con la DAB (ver figura 6). En el caso de las inyecciones de doble trazado la localización de la inyección y la extensión del marcaje, fue comprobada mediante la utilización de un microscopio de fluorescencia.

Dado que el cuerpo geniculado medial establece conexiones diferentes, cualitativa y cuantitativamente, con las distintas áreas corticales auditivas, la observación del marcaje retrógrado que presentaban las divisiones dorsal, ventral y medial de aquel tras inyectar el trazador WGA-HRP, permitió verificar que las inyecciones implicaban únicamente al área deseada. Todos los resultados a este respecto se compararon con los conocimientos actuales sobre las conexiones tálamo-corticales y corroboraron que, en cada experimento, el trazador no difundió más allá de los límites del área elegida. En el caso de los experimentos con BDA, las inyecciones fueron mucho menores, con lo que no se corría el riesgo de que incluyeran más de un área cortical.

El trazador WGA-HRP precipita en forma de cristales tras ser revelado mediante la reacción histoquímica antes descrita, por ello, tanto el marcaje retrógrado como anterógrado pudieron ser mejor identificados mediante microscopía de campo oscuro y luz polarizada. Sin embargo, el análisis del transporte del BDA se realizó utilizando microscopía de campo oscuro, de campo claro y de contraste de interferencia diferencial de Nomarski, no siendo útil en este caso la utilización de luz polarizada. De igual modo, en el caso de las inyecciones de doble trazado, el marcaje retrógrado y anterógrado se analizó utilizando microscopía de campo oscuro, campo claro y de contraste de interferencia diferencial de Nomarski.

Los dibujos en los que aparece representada la zona de inyección se realizaron con un microscopio óptico en campo claro, con la ayuda de una cámara lúcida y utilizando un objetivo Leica PL Fluotar de 1,6x, A.N. 0,05. Por otro lado, los dibujos que reflejan la distribución del marcaje en la corteza fueron realizados utilizando un objetivo PL Fluotar de 10x, A.N. 0,30, bajo luz polarizada, eligiendo los cortes más representativos para su

ilustración. El nivel anteroposterior de los cortes seleccionados, fue determinado mediante la comparación anatómica con los niveles ilustrados en el atlas estereotáxico del cerebro de la rata de Paxinos (1986).

Composición de figuras

Todos los dibujos realizados fueron escaneados (Agfa Scanner) y posteriormente tratados digitalmente para realizar las composiciones finales mediante el programas de tratamiento de imagen Adobe Photoshop 7.0.

Fotografía

Las fotografías fueron realizadas mediante una cámara fotográfica digital (Nikon DXM1200) acoplada a un microscopio estereoscópico Leica MZ APO, o bien a un microscopio óptico Leica DMRB y en microscopía de campo claro.

Las imágenes fueron editadas gráficamente mediante el programa informático Adobe Photoshop 7.0. Las planchas fotográficas finales se compusieron con Adobe Photoshop 7.0. Las impresiones finales se realizaron en una impresora a color por sublimación (Fargo Pictura 310e). Los datos originales no han sido alterados ni en forma ni en contenido mediante ninguno de estos procedimientos.

Análisis estadístico

Con el fin de analizar las diferencias de tamaño entre los diferentes núcleos de la vía auditiva, se procedió a la medición de sus áreas con el programa Analisis (Soft Imaging System GmbH, Münster, Alemania). Las medidas fueron expresadas en $\mu\text{m}^2 \times 10^3$. En el caso de la corteza cerebral auditiva, se procedió a la medición de su grosor total y al grosor de las diferentes capas corticales individualmente, también mediante el programa Analisis. Las medidas fueron expresadas en μm . Los datos para cada caso fueron representados por el valor medio \pm la desviación estándar de la media. Al tratarse de muestras pequeñas e independientes utilizamos la prueba estadística *t* de Student, para valorar la significancia de las diferencias encontradas entre los diferentes grupos de animales. Para llevar a cabo el análisis estadístico, seleccionamos tres medidas de cada caso. Las mediciones se han realizado en diferentes niveles rostrocaudales, seleccionando los mismos niveles en cada

caso. Para corregir las posibles diferencias que introducen ciertas variables extrañas y que pudieran estar afectando nuestros resultados, hemos utilizado un modelo de análisis de regresión lineal simple como es el análisis de covarianza (ANCOVA). Este análisis estadístico nos permite estimar en qué medida las diferentes variables de confusión, bien solas o en combinación de dos o más de ellas, puedan estar influyendo en la naturaleza de los resultados (Kim y Kohout, 1975).

Para analizar las alteraciones en la expresión de c-fos, se procedió al conteo del número de neuronas positivas para c-fos a lo largo de la vía auditiva. Los datos fueron expresados en número de neuronas por mm^2 y, en el caso de algunos núcleos concretamente en los núcleos más caudales de la vía, se procedió al conteo del número de neuronas totales debido a la drástica reducción del tamaño de los mismos. Los datos para cada caso fueron representados por el valor medio \pm la desviación estándar de la media. Para llevar a cabo el análisis estadístico utilizamos la prueba estadística *t* de Student. El conteo se realizó en diferentes niveles rostrocaudales, seleccionando los mismos niveles en cada caso. Como en los casos anteriores, para controlar las posibles diferencias que introducen las variables extrañas y que pudieran afectar a nuestros resultados, hemos utilizado el análisis de covarianza (ANCOVA).

Con el fin de analizar la distribución laminar de las neuronas retrógradas en el hemisferio contralateral a la inyección, se procedió al conteo del número de neuronas marcadas retrógradamente en las distintas capas de la corteza cerebral auditiva. Los datos fueron expresados en número de neuronas totales. Los datos para cada caso fueron representados por el valor medio \pm la desviación estándar de la media. Del mismo modo que en los casos anteriores utilizamos la prueba estadística *t* de Student para comprobar si las diferencias encontradas entre los diferentes grupos eran significativas. En este análisis hemos seleccionado 4 medidas de cada caso. El conteo se ha realizado eligiendo los mismos niveles rostrocaudales, en los diferentes casos. Como en los casos anteriores y con el mismo objetivo, utilizamos el análisis de covarianza (ANCOVA).

Para analizar el grado de solapamiento entre las aferencias callosas y las tálamo-corticales se procedió a la medición de las áreas solapadas entre ambos sistemas de conexiones con el programa Analisis. Las medidas fueron expresadas en $\mu\text{m}^2 \times 10^3$. Los datos para cada caso fueron representados por el valor medio \pm la desviación estándar de la media. Para el análisis estadístico también utilizamos la prueba estadística *t* de Student, de este modo podemos justificar la significancia de las diferencias encontradas entre los diferentes grupos experimentales. Seleccionamos 3 medidas de cada caso. Las mediciones se han realizado en diferentes niveles rostrocaudales, siempre eligiendo los mismos niveles en los diferentes casos. Como en el resto de los casos analizados utilizamos el análisis de covarianza (ANCOVA).

RESULTADOS

CONTROL DE LOS EFECTOS DE LA LESIÓN SOBRE LA VÍA AUDITIVA CENTRAL

Determinación del periodo crítico

A diferencia de la sordera bilateral, la cocleotomía unilateral produce un desequilibrio de las vías auditivas ipsi- y contralaterales, que afecta de forma diferente a los distintos núcleos de relevo a lo largo de la vía auditiva central. La deaferentización unilateral en el periodo postnatal temprano produjo una reducción en el tamaño de los núcleos auditivos que procesan información procedente de la cóclea lesionada. Es de especial relevancia que estos cambios patológicos, así como los explicados más adelante, sólo fueron evidentes si la cocleotomía se llevaba a cabo entre los días P0 y P6, sin diferencias apreciables entre estos días. Por el contrario, las cocleotomías realizadas entre P7 y P20 no produjeron efectos destacables en ninguno de los parámetros estudiados a lo largo de la vía auditiva.

Alteraciones en el tamaño. Técnica de Nissl (Figs. 8-12; gráfica fig.13; tabla fig.14)

Las alteraciones globales en la vía auditiva fueron el resultado de una disminución en el tamaño y, especialmente, en la densidad neuronal. La disminución más notable se observó en los núcleos más caudales en la vía, es decir, aquellos que se encuentran más próximos al receptor auditivo, especialmente los núcleos cocleares. Por ello, se utilizó como medida del grado de éxito en la deaferentización auditiva el grado de reducción en el tamaño de los núcleos cocleares. Únicamente se consideraron como válidos para nuestro estudio los animales experimentales que presentaban una reducción en el volumen de los núcleos cocleares superior a un 20%.

Núcleos cocleares

El núcleo coclear está formado por dos núcleos: el núcleo coclear dorsal y el núcleo coclear ventral, este último está dividido en dos porciones una anterior

(anteroventral) y otra posterior (posteroventral). El núcleo coclear dorsal presenta una apariencia laminar y se pueden discernir tres capas y un núcleo central. En su parte más dorsal se encuentra la capa I, capa molecular o superficial, con una baja densidad celular, seguida en dirección ventral de la capa II, capa intermedia o de células fusiformes, la cual presenta una alta densidad neuronal, con neuronas de todos los tamaños, la región más ventral la ocupa la capa profunda o polimórfica cuya densidad de empaquetamiento celular es menor que en la capa II, pero la prevalencia de neuronas grandes y pequeñas es mayor. El núcleo coclear ventral está rodeado por una capa de células pequeñas y está formado por una colección heterogénea de células de distinto tamaño con una variada densidad de empaquetamiento.

En el estudio de las secciones teñidas con la técnica de Nissl en animales cocleotomizados en el periodo postnatal temprano, se realizaron medidas cuantitativas, y se observó que la cocleotomía unilateral producía una drástica reducción en el tamaño de los núcleos cocleares, tanto dorsal como ventral, ipsilaterales al oído lesionado (Fig. 8), mientras que los contralaterales eran normales, con una morfología similar a la de los animales controles, descrita con anterioridad.

En concreto, los núcleos cocleares ipsilaterales a la lesión presentaron una reducción media de su tamaño del 59% [53-65%] (Fig. 13A), aproximadamente, con respecto a los animales controles. Las reducciones en el volumen fueron más evidentes en el núcleo coclear anteroventral ipsilateral a la cóclea lesionada.

Complejo olivar superior

En el complejo olivar superior de la rata podemos discernir cuatro núcleos principales, el núcleo lateral de la oliva superior, el núcleo medial de la oliva superior, el núcleo medial del cuerpo trapezoide y el núcleo paraolivar superior. Estos núcleos están rodeados de un área celular difusa que se conocen como región periolivar. El núcleo lateral de la oliva superior se diferencia fácilmente con la técnica de Nissl, ya que presenta forma de

“S” orientada horizontalmente y se localiza en el borde lateral del complejo olivar superior. El núcleo medial de la oliva superior está situado entre el núcleo lateral de la oliva superior y el núcleo medial del cuerpo trapezoide. El núcleo medial del cuerpo trapezoide ocupa la parte más medial del complejo olivar superior, está situado entre fascículos de fibras en el cuerpo trapezoide. El núcleo paraolivar superior es un núcleo fácilmente visible en las preparaciones de Nissl, ya que presenta forma triangular y se localiza en la parte medial del complejo olivar superior.

En los animales experimentales observamos que la deaferentización unilateral produjo una alteración en el tamaño y en la morfología del núcleo lateral olivar superior ipsilateral al oído lesionado (Fig. 9). El núcleo lateral de la oliva superior ipsilateral a la lesión se redujo de media un 33% [20-50%] (Fig. 13B), aproximadamente, con respecto a los animales controles. El resto de núcleos del complejo olivar superior tanto ipsi-como contralaterales a la lesión no presentaron cambios significativos con respecto a los animales controles.

Colículo inferior

El colículo inferior está formado por un núcleo central, una corteza externa y una corteza dorsal. El núcleo central del colículo inferior presenta una organización laminar. La lámina está compuesta por el soma y dendritas de las células principales, las neuronas en forma de disco. La lámina también está formada por otro tipo celular, las neuronas en forma de estrella. La corteza externa del colículo inferior rodea al núcleo central del colículo inferior, lateral, ventral y rostralmente, en su parte lateral se definen tres capas, la capa I que es una continuación de la cápsula fibrodentrítica de la corteza dorsal del colículo inferior, la capa II que está formada por neuronas de tamaño pequeño o mediano, y la capa III que es la capa de mayor tamaño y está formada por neuronas de tamaño medio, y por células multipolares grandes que se localizan especialmente ventromedial y rostralmente. La corteza dorsal del colículo inferior bordea la parte dorsomedial y caudal del núcleo central del colículo inferior, presenta tres capas, la capa más superficial, capa I, es

la cápsula fibrocelular que se continua con la corteza externa del colículo inferior, está formada por neuronas pequeñas que se encuentran dispersas por toda la capa, la capa más profunda es la capa II, es la de mayor grosor y está formada por neuronas de tamaño medio y pequeño, sobre todo neuronas multipolares, estas dos capas juntas constituyen un tercio del grosor de la corteza dorsal del colículo inferior. La capa III, también contiene neuronas de tamaño medio y pequeño.

La deaferentización periférica unilateral produjo una disminución en el tamaño del núcleo central del colículo inferior (Fig. 10) contralateral a la lesión. La reducción del tamaño fue aproximadamente de un 34% [27-40%] (Fig. 13C), con respecto a los animales controles. Por el contrario el núcleo central del colículo inferior ipsilateral a la lesión era normal y su morfología era muy similar a la de los animales controles.

Cuerpo geniculado medial

El cuerpo geniculado medial se divide en tres núcleos: El núcleo ventral, el dorsal y el medial. La división ventral, es la región más prominente, constituye el 70% del cuerpo geniculado medial, las secciones de Nissl muestran una forma ovoide compuesta por células de gran tamaño, marcadas intensamente para la reacción y con una alta densidad celular. La división dorsal presenta una baja densidad celular y las células se marcan débilmente. La división medial es la más pequeña de las tres regiones, presenta una densidad celular ligeramente superior al núcleo dorsal y contiene una población neuronal diversa en la cual se mezclan células más pequeñas y con menor intensidad de la tinción.

A nivel talámico, el cuerpo geniculado medial (Fig. 11) contralateral al oído lesionado presentaba una reducción en su tamaño, menos drástica que en los núcleos más caudales de la vía auditiva pero considerable, la reducción consistía en un 18% [13-21%] (Fig 13D), con respecto a los animales controles. El cuerpo geniculado medial ipsilateral a la lesión no mostró diferencias con respecto a los animales controles.

El resto de núcleos de la vía

auditiva, tanto ipsi- como contralaterales a la cóclea lesionada no mostraron cambios significativos.

Corteza cerebral auditiva

La corteza cerebral auditiva se divide en tres áreas: El área auditiva primaria (Te1), y dos áreas secundarias (Te2 y Te3). El estudio de nuestros resultados se ha basado en el área auditiva primaria (Te1), la cual según las secciones teñidas con el método de Nissl nos revela que esta formada por seis capas.

La capa I se extiende unas 113 μm aproximadamente bajo la superficie pial, y contiene muy pocas neuronas.

La capa II tiene un espesor de unas 101 μm . Contiene pequeñas neuronas polimórficas densamente empaquetadas. El límite entre las capas II-III es difícil de establecer, aunque en él se observan neuronas de mayor tamaño y una ligera disminución del empaquetamiento celular.

La capa III tiene un espesor de 374 μm . Se caracteriza por la heterogeneidad de la forma de sus células, así como en la orientación y formas de sus árboles axónicos y dentríticos. Contiene neuronas piramidales y de axón local, como las neuronas en cesto y las de candelabro.

La capa IV tiene un espesor de 111 μm . Fundamentalmente, contiene neuronas estrelladas espinosas de pequeño tamaño, distinguiéndose de las neuronas de capa III y V, las cuales son mucho mayores. También contienen neuronas de axón local como las neuronas bipolares y las de doble penacho.

La capa V tiene un espesor de unas 304 μm . Se diferencia de la capa IV por un sensible aumento del tamaño de las células y una disminución de la densidad neuronal. Las grandes neuronas piramidales de esta capa son más numerosas en la subcapa más profunda. Las neuronas de axón local típicas de esta capa, como en capa III, son las neuronas en cesto y las de candelabro.

La capa VI tiene un espesor de unas 384 μm . Contiene neuronas muy empaquetadas de contorno aplanado. Observamos tanto neuronas piramidales como no piramidales. Las neuronas no piramidales de axón local más características de esta capa son las neuronas

de Martinotti de axón descendente.

Tras producirse la deaferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano, se pudo apreciar que la cocleotomía unilateral producía alteraciones fácilmente evidenciables en la corteza contralateral al oído lesionado (Fig. 12), mientras que la corteza ipsilateral era enteramente normal. De hecho, en cortes teñidos con el método de Nissl se apreció una reducción en el grosor de la corteza auditiva contralateral a la lesión del 7% aproximadamente [4-8%] (Fig. 13E), así como una desestructuración de la laminación cortical, por lo que las capas que la componen aparecían con límites menos claros, especialmente la capa IV, que presentaba una escasa diferenciación. En cuanto al grosor de las capas corticales, las capas III y IV (Fig. 13F) presentaban un menor espesor que las de los animales controles, mientras que las ipsilaterales a la lesión no mostraban cambios significativos.

Alteraciones en la expresión de las enzimas. Acetilcolinesterasa, citocromo-oxidasa, NADPH-diaforasa (Figs. 15-29; Tabla fig. 30)

Aparte de las diferencias de tamaño, el análisis de la expresión de las enzimas acetilcolinesterasa, citocromo-oxidasa y NADPH-diaforasa a lo largo de los núcleos de la vía auditiva mostró que la cocleotomía unilateral en el periodo postnatal temprano producía una disminución de la reactividad de varias enzimas en núcleos auditivos específicos.

Núcleos cocleares

El análisis de la expresión de la **acetilcolinesterasa** en los núcleos cocleares de los animales controles manifiesta que la reactividad para dicha enzima es especialmente intensa en el núcleo coclear dorsal. En los animales experimentales, observamos que la cocleotomía unilateral periférica producida en el periodo postnatal temprano mostraba una reducción en la expresión de la acetilcolinesterasa en los núcleos cocleares ipsilaterales a la cóclea lesionada (Fig. 15).

La reactividad para la **citocromo-oxidasa** en los núcleos cocleares de los animales controles se localiza en el núcleo

coclear dorsal y en el núcleo coclear ventral, tanto en su porción anterior como en su porción posterior. La reactividad de la citocromo-oxidasa en los animales experimentales (Fig. 16) no presentaba ninguna variación con respecto a los animales controles.

La reactividad de la **NADPH-diaforasa** se localiza principalmente en el núcleo coclear ventral. La reactividad de la NADPH-diaforasa en los animales experimentales (Fig. 17) no presentaba ninguna variación con respecto a los animales controles.

Complejo olivar superior

El análisis de la expresión de la enzima **acetilcolinesterasa** en el complejo olivar superior de los animales controles revela que el marcaje para la acetilcolinesterasa se localiza principalmente en el núcleo lateral de la oliva superior y en la región periolivar; esta última presenta una menor intensidad en la tinción de la enzima. La cocleotomía unilateral periférica producida en el periodo postnatal temprano mostraba una reducción en la expresión de la acetilcolinesterasa en el núcleo lateral de la oliva superior ipsilateral a la cóclea lesionada (Fig. 18).

En el caso de la **citocromo-oxidasa** observamos que la reactividad de la citocromo-oxidasa se localiza en el núcleo lateral de la oliva superior, en el núcleo paraolivar superior y en el núcleo medial del cuerpo trapezoide, este último es el que contiene sobre todo células marcadas positivamente para la citocromo-oxidasa. Tras producirse la cocleotomía la reactividad para la citocromo-oxidasa se redujo ipsilateralmente en el núcleo lateral de la oliva superior (Fig. 19).

La actividad de la **NADPH-diaforasa** se distribuye fundamentalmente en el núcleo lateral de la oliva superior, en el núcleo paraolivar superior y en el núcleo medial del cuerpo trapezoide. La mayor densidad de células positivas para la NADPH-diaforasa aparece en el núcleo medial del cuerpo trapezoide. En los animales experimentales pudimos observar como la cocleotomía unilateral producía una

reducción de la enzima en el núcleo paraolivar superior y en el núcleo medial del cuerpo trapezoide contralaterales a la cóclea lesionada (Fig. 20).

El resto de núcleos que forman parte del complejo olivar superior, tanto ipsi- como contralaterales a la lesión no mostraron cambios significativos en la expresión de las diferentes enzimas analizadas.

Colículo inferior

El estudio enzimático del colículo inferior indica que la reactividad de la **acetilcolinesterasa** se distribuye fundamentalmente en el núcleo central del colículo inferior. Mientras que las cortezas externa y dorsal del colículo inferior presentan un marcaje menos intenso. Tras analizar los efectos de la deafferentización observamos como la actividad de la enzima se vio reducida principalmente en el núcleo central del colículo inferior contralateral a la lesión (Fig. 21).

En el caso de la **citocromo-oxidasa**, en el núcleo central del colículo inferior aparece una banda de marcaje para la citocromo-oxidasa, la corteza externa presenta una intensidad de la tinción moderada, con una mayor concentración enzimática en la capa II. La corteza dorsal presenta baja reactividad para la citocromo-oxidasa. Al analizar los casos de los animales experimentales observamos que la reducción de la expresión de la enzima fue notable en núcleo central del colículo inferior contralateral a la lesión (Fig. 22).

El análisis de la distribución de la **NADPH-diaforasa** indica que la enzima se encuentra con una elevada densidad en las cortezas dorsal y externa del colículo inferior, mientras que el núcleo central del colículo inferior presenta una intensidad de la tinción ligeramente menor. El análisis de la NADPH-diaforasa tras la cocleotomía periférica unilateral en el periodo postnatal temprano, mostraba una reducción ligera de su actividad en el núcleo central del colículo inferior contralateral a la lesión (Fig. 23).

Cuerpo geniculado medial

A nivel talámico, la **acetilcolinesterasa** se distribuye principalmente en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial. Cuando producimos una ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano encontramos alteraciones en la expresión de la acetilcolinesterasa. Concretamente observamos una leve disminución en la expresión de su reactividad en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial contralateral a la lesión (Fig. 24).

En el caso de la **citocromo-oxidasa** el núcleo que presenta mayor intensidad de la tinción es el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial, los núcleos medial y dorsal también se marcan pero más débilmente, sobre todo el dorsal que presenta la más baja intensidad de actividad para la citocromo-oxidasa de todos los núcleos auditivos. Tras el análisis de la citocromo-oxidasa en animales experimentales observamos cómo su actividad se vio reducida en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial contralateral a la lesión (Fig. 25).

En el caso de la **NADPH-diaforasa** se tiñen principalmente las células de la parte dorsal del núcleo supragenículado y de la parte basal del núcleo medial del cuerpo geniculado medial. La presencia de los somas positivos para la NADPH-diaforasa se limita a su tercio caudal. En los animales experimentales se observaron cambios en la expresión de la NADPH-diaforasa, concretamente se produjo una disminución de la intensidad de la tinción de la NADPH-diaforasa en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial contralateral a la lesión (Fig. 26).

Los otros núcleos de la vía central auditiva, tanto ipsi- como contralaterales a la cóclea lesionada, no mostraron cambios significativos en la expresión de las diferentes enzimas analizadas.

Corteza cerebral auditiva

El estudio de la corteza cerebral auditiva con técnicas enzimáticas muestra

que la cocleotomía unilateral no sólo produce alteraciones citoarquitectónicas en la corteza cerebral auditiva contralateral al oído lesionado, sino que también se observaron cambios neuroquímicos en la corteza.

El análisis neuroquímico de la corteza cerebral auditiva mediante la técnica histoquímica de la **acetilcolinesterasa**, indica que el patrón de expresión de la acetilcolinesterasa consiste en una banda densa en las capas IIIb y IV. Tras producirse una ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano, se observó una disminución de la intensidad del marcaje en la corteza cerebral auditiva contralateral a la cóclea lesionada, específicamente en el neuropilo de las capas III y IV, que constituyen el destino de las proyecciones tálamo-corticales (Fig. 27).

El análisis de la **citocromo-oxidasa** en animales controles indica que la reactividad de la citocromo-oxidasa se distribuye en todas las capas corticales, destacando una banda de mayor intensidad en la capa IV. Tras producirse una lesión en la cóclea se ponía de manifiesto una disminución de la intensidad de la tinción en la corteza contralateral a la lesión, concretamente en las capas IIIb y IV (receptoras talámicas) (Fig. 28).

En el caso de la **NADPH-diaforasa**, las células positivas aparecen dispersas entre las capas II-VI de la corteza auditiva primaria. La capa IV presenta una banda de mayor intensidad. Del mismo modo que en el caso anterior, en el análisis de la NADPH-diaforasa en la corteza cerebral auditiva contralateral a la cóclea lesionada encontramos una reducción en la intensidad del marcaje específicamente en las capas III y IV (Fig. 29).

Alteraciones en la expresión de proteínas ligadoras de Calcio.

Calbindina, Calretinina y Parvoalbúmina (Figs. 31-37; Tabla fig. 38)

El análisis de las proteínas ligadoras de calcio a lo largo de los diferentes núcleos que forman parte de la vía auditiva mostró cambios en la expresión de determinadas

proteínas ligadoras de calcio en algunos núcleos de la vía auditiva.

Núcleos cocleares

El análisis de los casos controles mediante inmunocitoquímica para **calbindina**, manifiesta que la mayor población de células Cb positivas ocupaban principalmente la porción posterior del núcleo coclear ventral. El núcleo coclear dorsal también presenta células marcadas para la calbindina; las neuronas de pequeño tamaño se encuentran en sus capas superficiales y las neuronas de mayor tamaño en sus capas más profundas. El estudio de los casos experimentales manifestó que, tanto los núcleos cocleares que reciben información procedente del oído lesionado, como los que reciben información del oído no alterado, presentaban el mismo número de neuronas positivas, con morfología y localización laminar similares.

En el caso de la **calretinina**, en los animales controles, los somas inmunorreactivos se localizan en el área ventral del núcleo coclear posteroventral. En el núcleo coclear dorsal las neuronas positivas para la Cr se sitúan en las capas más profundas, e incluso algunos somas de menor tamaño se encuentran en la capa II. En el núcleo coclear anteroventral las neuronas Cr positivas son obvias en el área dorsolateral de la raíz del nervio auditivo, mientras que las áreas más rostrales y más dorsales no tienen células marcadas para la Cr. Sin embargo, en la capa superficial (capa celular granular) del núcleo coclear anteroventral se observan pequeños somas Cr positivos. La inmunorreactividad para la calretinina en el neuropilo se encuentra en las capas más profundas del núcleo coclear dorsal (capa III) y es muy intensa en las fibras de la porción anterior del núcleo coclear ventral. Del mismo modo que en el caso anterior, el análisis de la expresión de la calretinina en los animales experimentales no indicó que la actividad de la calretinina no mostraba cambios notables en los núcleos cocleares dorsal y ventral tanto ipsi- como contralaterales a la cóclea lesionada.

Los somas inmunorreactivos para la **parvoalbúmina** se localizan principalmente en la capa I del núcleo coclear dorsal. Un

gran número de somas marcados para la Pv se distribuyen tanto en el área ventral del núcleo coclear posteroventral como en el núcleo coclear anteroventral. El marcaje del neuropilo es muy intenso en el núcleo coclear ventral tanto en su división anteroventral como en la posteroventral. En contraste, el núcleo coclear dorsal se tiñe débilmente. También aparece inmunorreactividad para la parvoalbúmina en el nervio auditivo. El análisis de la expresión de la parvoalbúmina en los animales experimentales manifestó una evidente reducción en la expresión de la enzima en el neuropilo del núcleo coclear ventral ipsilateral a la lesión (Fig. 31).

Complejo olivar superior

El análisis de la expresión de la **calbindina** en los animales controles muestra que la reactividad de la proteína es muy intensa en el neuropilo del núcleo lateral de la oliva superior, y en el núcleo paraolivar superior. Las neuronas inmunopositivas para la Cb aparecen en el núcleo medial del cuerpo trapezoide. En el caso de los animales experimentales, se observó una disminución en la intensidad de la tinción en el neuropilo del núcleo paraolivar superior contralateral a la lesión (Fig. 32). Asimismo se hizo patente una reducción en el número de neuronas positivas para la Cb en el núcleo medial del cuerpo trapezoide contralateral a la lesión.

Los somas positivos para la **calretinina** en los animales controles se distribuyen fundamentalmente en el núcleo medial del cuerpo trapezoide y unos pocos somas se localizan en el área periolivar. El neuropilo del núcleo medial del cuerpo trapezoide se encuentra intensamente marcado para la calretinina, e incluso se pueden observar terminales axónicos. La expresión de la calretinina tras producirse una ablación periférica unilateral en el periodo postnatal temprano no mostraba variaciones en ningún núcleo del complejo olivar superior tanto ipsi- como contralaterales a la lesión.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la reactividad de la **parvoalbúmina** en los animales controles indicaba que todos los núcleos del complejo

olivar superior contenían elevada inmunorreactividad para la parvoalbúmina. La mayor densidad en los somas parvoalbúmina positivos aparecía en núcleo medial del cuerpo trapezoide, el núcleo paraolivar superior, y el núcleo lateral de la oliva superior. También se marcan, aunque con menor intensidad, algunos somas en el núcleo medial de la oliva superior y en las áreas periolivares. El neuropilo se marca muy intensamente en todos los núcleos del complejo olivar superior, aunque los núcleos que presentan mayor intensidad de la tinción son el núcleo lateral de la oliva superior y el núcleo medial de la oliva superior. En el caso de los animales experimentales observamos que la reactividad para la parvoalbúmina se vio reducida en el neuropilo del núcleo lateral de la oliva superior ipsilateral a la lesión (Fig 33).

El resto de núcleos del complejo olivar superior tanto ipsi- como contralaterales a la lesión no mostraron cambios significativos en la expresión de las proteínas ligadoras de calcio analizadas.

Colículo inferior

El análisis de la expresión de la **calbindina** en los animales controles indica que el núcleo central del colículo inferior presenta baja intensidad de la tinción y un escaso número de células calbindina positivas, en contraste con la intensa inmunorreactividad de la proteína en las cortezas dorsal y externa del colículo inferior. El análisis de la calbindina en los animales experimentales nos indicó que la expresión de dicha enzima no presentaba cambios significativos en su expresión en el núcleo central del colículo inferior tanto ipsi- como contralateral a la lesión.

En los animales controles, el marcaje para la **calretinina**, tanto en somas como en el neuropilo, se encuentra exclusivamente en las capas I y II de la corteza dorsal y de la corteza externa del colículo inferior. Sin embargo en el núcleo central del colículo inferior no aparece marcaje para la calretinina. Del mismo modo que en el caso de la calbindina el estudio del colículo inferior en los animales experimentales mostraba que la expresión para la calretinina no se vio alterada en el

núcleo central del colículo inferior, ni ipsi- ni contralateralmente a la cóclea lesionada.

Tras el estudio de la reactividad de la **parvoalbúmina** tanto en el soma como en el neuropilo en los animales controles observamos cómo la actividad para la parvoalbúmina se encuentra principalmente en el núcleo central del colículo inferior y en las capas II-III de la corteza dorsal del colículo inferior, y de la corteza externa del colículo inferior. Así, únicamente la capa I de la corteza dorsal del colículo inferior y de la corteza externa del colículo inferior se encuentra desprovista de elementos inmunorreactivos para la parvoalbúmina. El análisis de la expresión de la parvoalbúmina en el colículo inferior de los animales deaferentizados en el periodo postnatal temprano no mostraba cambios significativos con respecto a los animales controles.

Cuerpo geniculado medial

En los animales controles analizados observamos que todos los núcleos del cuerpo geniculado medial contienen marcaje para la **calbindina**. El núcleo ventral del cuerpo geniculado medial es el núcleo que presenta un marcaje más débil, la inmunorreactividad en este núcleo incluye somas positivos para la calbindina y un marcaje difuso en el neuropilo. El núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial es el núcleo más densamente teñido, la mayor concentración de marcaje aparece en la parte dorsal y con una reducción en la parte ventral. En este núcleo tanto el soma como el neuropilo son inmunorreactivos para la calbindina, y a pesar de la gran cantidad de proteína difusa algunas dentritas son visibles. En el núcleo medial del cuerpo geniculado medial la intensidad de la tinción varía de moderada a fuerte en la mitad medial y es más débil en la mitad lateral, la región posterior presenta un marcaje más tenue. La inmunorreactividad en el núcleo medial del cuerpo geniculado medial incluye tanto somas positivos como intensidad de marcaje en el neuropilo. El estudio de la expresión de la calbindina en los animales experimentales mostraba una disminución en la intensidad de la tinción en todas las divisiones del cuerpo geniculado medial contralateral a la lesión (Fig. 34).

En los animales controles el marcaje para la **calretinina** se localiza principalmente en los núcleos dorsal y medial del cuerpo geniculado medial, mientras que la división ventral se caracteriza por la falta de inmunorreactividad. Tras estudiar la inmunorreactividad en los animales experimentales no se apreciaban diferencias significativas entre el cuerpo geniculado medial ipsi- y contralateral a la lesión.

En el caso de la **parvoalbúmina**, en los animales controles el marcaje es intenso en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial, y de hecho, este núcleo es uno de los núcleos más intensamente marcados para la parvoalbúmina en la vía auditiva. Esta tinción no incluye somas, sólo fibras y axones terminales. En el núcleo dorsal la intensidad del neuropilo es moderada, claramente más baja que en el núcleo ventral. Dentro del núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial hay diferencias, específicamente en la parte ventral, que se encuentra en el borde con el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial, donde presenta mayor intensidad de marcaje, aunque los somas no se tiñen. En el núcleo medial del cuerpo geniculado medial la parte lateral se marca intensamente para la Pv, mientras que la parte medial presenta un marcaje moderado. La mayoría del marcaje incluye fibras, sin embargo también encontramos un débil marcaje en el soma del núcleo medial del cuerpo geniculado medial posterior. En el caso de la parvoalbúmina en los animales experimentales no se apreciaban diferencias significativas entre el cuerpo geniculado medial ipsi- y contralateral a la lesión.

Corteza cerebral auditiva

Mediante la utilización de inmunocitoquímica para **calbindina** en los animales controles se observa mayor intensidad de marcaje en el neuropilo de las capas I-III. Se observan dos tipos de neuronas calbindina positivas, las primeras se tiñen moderadamente, son relativamente más pequeñas y están más densamente empaquetadas, estas neuronas se encuentran en las capas II-III. La segunda clase de células presenta un soma marcado más

intensamente con dendritas claramente marcadas y presenta una variedad de morfologías no piramidales, estas neuronas se distribuyen en las capas corticales II-VI, con un incremento en su concentración en la capa V. En la capa VI se observa un marcaje menos intenso para la calbindina. Por último, en la capa I aparecen pocos somas ovales teñidos débilmente. La inmunocitoquímica para calbindina en los animales experimentales mostró que en la corteza cerebral auditiva contralateral al oído lesionado se observaba una disminución en la densidad de neuronas positivas para la calbindina y una reducción de la intensidad del marcaje del neuropilo en las capas I-III, V y VIb. (Fig. 35).

La inmunocitoquímica para **calretinina** en los animales controles muestra que las neuronas calretinina positivas están presentes en todas las capas corticales, pero son predominantes en las capas II-III. Las capas que presentan mayor intensidad de marcaje para la calretinina son las capas V y VIb. La inmunocitoquímica para calretinina en los animales experimentales mostró que ambas cortezas presentaban el mismo número de neuronas positivas, con morfología y localización laminar similares. Sin embargo, en la corteza cerebral auditiva contralateral al oído lesionado se observaba una disminución de la intensidad del marcaje del neuropilo en las capa VIb (Fig. 36).

En los animales controles la inmunocitoquímica para la **parvoalbúmina** muestra que en la capa I la intensidad de tinción de la parvoalbúmina es baja, por el contrario, en el resto de capas corticales el marcaje es muy intenso. La mayor intensidad de marcaje se encuentra en la parte media e inferior de la capa V, en las capas III-IV y VI. Las células marcadas están bastante dispersas y aparecen en las capas II-VI, con morfologías diversas. Muchas de estas células se tiñen intensamente y tienen formas no piramidales sin dendritas apicales, típicas de interneuronas, aunque también observamos células positivas para parvoalbúmina en las capas infragranulares profundas que sí exhiben una soma triangular. Del mismo modo que en el resto de las proteínas

ligadoras de calcio estudiadas en los animales experimentales, en la corteza cerebral auditiva contralateral al oído lesionado también se produjeron cambios en la expresión de la parvoalbúmina, y en este caso se observaba una disminución de la intensidad del marcaje del neuropilo en general y más específicamente se observaba la desaparición de la banda de marcaje en la capa cortical IV (Fig. 37).

Alteraciones en la expresión de c-fos (Figs. 39-43; gráficas figs. 44, 45, 46; tabla fig. 47)

Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de las enzimas, y las proteínas ligadoras de calcio han sido confirmados por técnicas inmunocitoquímicas para la expresión de c-fos. El análisis de la expresión de c-fos a lo largo de la vía auditiva ascendente mostró que la deafferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano produce una alteración en el número de neuronas c-fos positivas.

Núcleos cocleares

En el caso de los núcleos cocleares, el análisis de la expresión de c-fos en los animales controles expuestos a un estímulo sonoro (ver material y métodos) muestra que las células inmunorreactivas para el c-fos están ampliamente distribuidas en el núcleo coclear dorsal, en el que las neuronas se sitúan a lo largo del eje dorsomedial a ventrolateral, con un predominio en las capas más superficiales del núcleo. En el núcleo coclear ventral, las neuronas positivas para c-fos se limitan a su porción posterior. La deafferentización periférica unilateral produjo una reducción en el número de neuronas c-fos positivas en el núcleo coclear dorsal y ventral ipsilaterales a la lesión (Fig. 39), la reducción fue del 47% con respecto a los animales controles. Sin embargo, el núcleo coclear dorsal y ventral contralaterales a la lesión únicamente presentaron una reducción del 3% (Fig. 44A) (este dato se obtuvo utilizando el número total de neuronas, en lugar de la densidad neuronal para un área determinada debido a la drástica reducción del tamaño de los núcleos).

Complejo olivar superior

Las neuronas inmunorreactivas para c-fos se distribuyen en los diferentes núcleos del complejo olivar superior, con un predominio en el núcleo medial del cuerpo trapezoide. Las neuronas positivas para c-fos se extienden en el borde del núcleo lateral de la oliva superior, en el núcleo paraolivar superior, en el núcleo medial de la oliva superior y en la región periolivar. Tras producirse una cocleotomía unilateral pudimos observar cómo el núcleo lateral de la oliva superior ipsilateral (Fig. 40) presentaba una morfología alterada, con límites menos claros y una disminución en el número de neuronas c-fos positivas, aproximadamente del 64% con respecto a los animales controles (Fig. 44B). En el núcleo medial de la oliva superior ipsilateral observamos una disminución en la inmunorreactividad para el c-fos, un 17% con respecto a los animales controles (Fig. 44C). El núcleo medial del cuerpo trapezoide ipsilateral a la lesión (Fig. 40) también presentaba una reducción del 30% aproximadamente en el número de neuronas c-fos positivas con respecto a los animales controles (Fig. 44D), mientras que en el núcleo lateral de la oliva superior, núcleo medial de la oliva superior, y el núcleo medial del cuerpo trapezoide contralaterales a la lesión no aparecían alteraciones significativas con respecto a los animales controles (1%, 3% y 7% respectivamente). Sin embargo, en el lado contralateral a la lesión observamos que el núcleo paraolivar superior presentaba una disminución en el número de neuronas c-fos positivas, en concreto la reducción consistió en un 16%, mientras que en el lado ipsilateral la reducción en el número de neuronas c-fos positivas fue del 5% (este dato se obtuvo utilizando el número total de neuronas, en lugar de la densidad neuronal para un área determinada debido a la drástica reducción del tamaño del núcleo paraolivar superior (Fig. 45A)).

Colículo inferior

El análisis del c-fos en el núcleo central del colículo inferior manifiesta que las neuronas c-fos positivas se distribuyen en el núcleo central del colículo inferior y en

las cortezas dorsal y externa del colículo inferior. La inmunocitoquímica para c-fos en animales experimentales mostraba una reducción en el número de neuronas c-fos positivas en todos los núcleos del colículo inferior contralateral a la lesión (Fig. 41) con una disminución de aproximadamente 66% con respecto al control, mientras que en el lado ipsilateral a la lesión la reducción fue de aproximadamente 11% (Fig. 45B).

Cuerpo geniculado medial

A nivel talámico, observamos que las neuronas inmunorreactivas para c-fos se localizan principalmente en el núcleo medial y núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial, mientras que el núcleo ventral presenta muchas menos. En los animales experimentales observamos una reducción en el número de neuronas c-fos positivas en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial contralateral a la lesión (Fig. 42), con una reducción del 21% con respecto a los animales no cocleotomizados, mientras que en el lado ipsilateral a la lesión la reducción no fue significativa (1%). La reducción en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial contralateral era menor a la encontrada en los núcleos inferiores de la vía auditiva, pero significativa (Fig. 45C).

El resto de núcleos de la vía auditiva analizados con técnicas inmunocitoquímicas para la expresión de c-fos, tanto ipsi- como contralaterales a la cóclea lesionada, no mostraron cambios significativos.

Corteza cerebral auditiva

El análisis de la expresión de c-fos en la corteza cerebral auditiva muestra que las neuronas inmunorreactivas para el c-fos se distribuyen en todas las capas corticales, a excepción de la capa más superficial, la capa I, que apenas presenta células c-fos positivas. La capa que presenta mayor número de neuronas positivas para el c-fos es la capa IV. La inmunocitoquímica para c-fos en animales que habían sido deaferentizados en el periodo postnatal temprano mostraba una considerable disminución en el número de neuronas c-fos positivas en todas las capas corticales, pero principalmente en las capas II, III y IV (Fig. 43). Concretamente, la capa II presentaba

una reducción en el número de neuronas c-fos positivas del 72%, la capa III, del 79%, la capa IV del 57% y por último, las capas V y VI presentaron una disminución de neuronas algo menor, en concreto la capa V presentó una reducción del 33% y por último la capa VI del 28% (Fig. 46). Por el contrario, en la corteza cerebral auditiva ipsilateral a la cóclea lesionada todos los parámetros estudiados fueron normales.

Tomando en conjunto todos estos datos se puede concluir que la deaferentización periférica unilateral resulta en alteraciones globales en el desarrollo de la corteza cerebral auditiva, reflejadas no sólo en alteraciones a largo plazo de la citoarquitectura cortical, sino también de circuitos neurales altamente específicos desde el punto de vista neuroquímico, reflejados en cambios en la expresión de determinadas enzimas, proteínas ligadoras de calcio y marcadores neuronales en capas concretas de la corteza cerebral auditiva que recibirían, en circunstancias normales, la información procedente del oído lesionado.

Conexiones tálamo-corticales y
conexiones córtico-corticales
interhemisféricas

Conexiones tálamo-corticales

En primer lugar analizamos las conexiones tálamo-corticales, procedentes de las inyecciones en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial, en la corteza homolateral al lugar de la inyección.

Control de la zona de inyección

Las inyecciones en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial no invadieron los núcleos adyacentes y las neuronas callosas marcadas retrógradamente se encontraban concentradas en el área Te1 (área auditiva primaria). Este patrón de marcaje coincide con estudios previos (Fig. 48).

Animales controles

El patrón normal de distribución de los axones tálamo-corticales auditivos, observado en los cortes coronales de los animales controles consistía en tres parches que se extendían a lo largo del eje rostro-caudal de la corteza cerebral auditiva. Los dos parches más dorsales se situaban en el área auditiva primaria (Te1) y, el más ventral se extendía en el área auditiva de asociación (Te3) (Fig. 49A). Los parches aparecían separados por zonas de marcaje menos intenso (Fig 49B). Los tres parches se extendían dorsoventralmente entre 300-500 μm . La distancia entre los parches variaba entre 400-500 μm (Fig. 49C). En cuanto a la extensión mediolateral era de 300 μm aproximadamente, la extensión de los diferentes parches no variaba significativamente, sin embargo el parche más ventral era el que presentaba menor extensión mediolateral (Fig. 49D).

Los axones tálamo-corticales en el hemisferio homolateral al tálamo inyectado ocupaban principalmente las capas corticales IIIb y IV. Algunos fascículos de axones alcanzaban el borde de las capas II y III. Además, en algunos casos aparecían axones en la mitad externa de la capa I, que se extendían tangencialmente largas distancias

(Fig. 50).

Animales cocleotomizados

Sin embargo, en los animales inyectados en el tálamo contralateral a la lesión y que por lo tanto reciben información procedente del oído lesionado, se había producido una alteración del patrón de distribución de los axones tálamo-corticales auditivos y, se podía ver un patrón claramente anormal. En la mayoría de los casos analizados los parches de axones tálamo-corticales se extendían rostro-caudalmente ocupando una extensión mayor a lo largo del eje dorsoventral de la corteza cerebral auditiva, en comparación con los animales controles, concretamente, los parches se extendían, 1200 μm aproximadamente (Fig 51A). La densidad de los botones sinápticos en los animales experimentales era similar a la encontrada en animales controles.

Los parches estaban separados por regiones de marcaje menos intenso, o incluso en muchos niveles rostrocaudales analizados la presencia de marcaje era prácticamente inexistente. La distancia entre los parches, era alrededor de 500 μm (Fig 51B). En cuanto a la extensión mediolateral no había diferencias con respecto a los animales controles, la extensión era de 300 μm (Fig. 51D).

En cuanto a la distribución laminar de los axones tálamo-corticales no presentaban diferencias con respecto a los animales controles. Los axones tálamo-corticales se localizaban en las capas corticales IIIb y IV. Algunos axones llegaban hasta el borde de las capas II y III. Incluso en algunos casos aparecían axones en la mitad externa de la capa I (Fig. 52).

Análisis del patrón tálamo-

cortical en secciones tangenciales

Con el fin de verificar los resultados obtenidos en las secciones coronales y de revelar detalles topográficos del patrón tálamo-cortical que no pueden ser aportados en los cortes coronales, nosotros examinamos las conexiones tálamo-corticales en secciones tangenciales de animales controles y animales cocleotomizados. En las secciones tangenciales de

ambos grupos de animales, se mantenían las características o rasgos principales del patrón tálamo-cortical descrito con anterioridad y además se aportaban nuevos datos topográficos más específicos (Ver el epígrafe “Inyecciones de doble trazado. Topografía y grado de solapamiento entre ambos sistemas de conexiones”).

Conexiones córtico-corticales

En segundo lugar analizamos las conexiones córtico-corticales, procedentes de las inyecciones en la corteza cerebral auditiva (Te1), en el lado opuesto al lugar de la inyección.

Control de la zona de inyección

Las inyecciones en Te1 no invadieron la sustancia blanca ni los campos corticales adyacentes. Las neuronas talámicas marcadas retrógradamente se encontraban concentradas en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial. Este patrón de marcaje coincide con estudios previos (Fig. 54).

Animales controles

El patrón normal de distribución de los axones callosos auditivos, observado en los cortes coronales de los animales controles consistía en dos columnas separadas y bien definidas que se extendían rostrocaudalmente. La columna dorsal se localizaba en la región correspondiente al área auditiva primaria (Te1), y la columna ventral se encontraba en el área auditiva de asociación (Te3), esta columna de marcaje era mucho menos densa que la columna dorsal (Fig. 55A). El marcaje anterógrado, reflejo de la distribución contralateral de los axones callosos auditivos, nunca aparecía en áreas no auditivas de la corteza cerebral. Las bandas se separaban por zonas sin marcaje o con un marcaje muy tenue, la distancia entre ambas bandas era de 1000 μm aproximadamente. La extensión dorsoventral variaba entre 400-500 μm (Fig. 55B).

En cuanto a la distribución laminar de los axones tálamo-corticales, los axones callosos en la corteza contralateral a la inyección se extendían mediolateralmente ocupando la totalidad de las capas corticales (Fig. 56).

Animales cocleotomizados

Sin embargo, en el lado contralateral a la lesión, y que por tanto recibe información procedente del oído lesionado, se había producido una alteración en el patrón de distribución de las conexiones córtico-corticales, en estos casos, aparecían bandas córtico-corticales que se extendían a lo largo del eje rostro-caudal. Este marcaje anterógrado, nunca aparecía en áreas no auditivas de la corteza cerebral. Las bandas se encontraban separadas por zonas de marcaje menos intenso, la distancia entre las distintas bandas variaba dependiendo del nivel rostrocaudal (Fig. 57A). La extensión dorsoventral variaba, dependiendo de la banda y de su localización a lo largo del eje rostrocaudal (Fig. 57B). En algunos casos aparecían bandas más extensas de lo normal (Fig. 57D) y bandas con una localización claramente anormal (Fig. 57C).

En cuanto a la distribución laminar de los axones callosos en la corteza contralateral a la inyección, no había diferencias con respecto a los animales controles. Los axones callosos se extendían mediolateralmente ocupando la totalidad de las capas corticales (Fig. 58).

Análisis del patrón caloso en secciones tangenciales

Para verificar los resultados obtenidos en las secciones coronales y con el fin de revelar detalles topográficos del patrón caloso que no se pueden obtener con los cortes coronales, nosotros examinamos las conexiones callosas en secciones tangenciales de animales controles y animales que han sido cocleotomizados y que, posteriormente, al igual que en los casos coronales han sido inyectados en la corteza cerebral auditiva (Te1) ipsilateral a la lesión. En las secciones tangenciales tanto de los animales controles como de los animales cocleotomizados, se mantenían las características o rasgos principales del patrón caloso descrito en los cortes coronales y además aparecían nuevos datos (ver el epígrafe “Inyecciones de doble trazado. Topografía y grado de solapamiento entre ambos sistemas de conexiones”).

Distribución laminar de las neuronas callosas. Inyecciones de WGA-HRP

Los resultados de las inyecciones realizadas con WGA-HRP en la corteza cerebral auditiva (Te1) en animales controles y en experimentales inyectados en el lado ipsi- o contralateral a la lesión, indicaron que existía una diferencia notable en la distribución laminar de las conexiones córtico-corticales interhemisféricas en la corteza cerebral auditiva entre los animales controles y los animales cocleotomizados.

En primer lugar, y con respecto a la distribución laminar del marcaje retrógrado, en el caso de los animales controles éste se extendía a lo largo del eje rostro-caudal en la corteza cerebral auditiva, ocupando mediolateralmente una extensión de 250-350 μm . El mayor porcentaje de las neuronas origen de la proyección auditiva interhemisférica, un 61%, se localizaban en la capa III, el 39% restante se distribuía entre las capas II, IV y V, de la siguiente manera, un 24% en la capa V, un 10 % en capa II, y por último un 5% en la capa IV (Fig. 6, Fig. 60).

En los animales experimentales inyectados en el lado derecho, anómalo y que por lo tanto analizamos la corteza que recibe información del oído intacto, las neuronas origen de la proyección en la corteza auditiva izquierda se extendían a lo largo del eje rostro-caudal, ocupando una extensión mediolateral de 250 a 300 μm al igual que en los animales controles. Así mismo, las neuronas callosas se localizaban principalmente en la capa III, en la cual presentaba el 61% del total, en la capa V encontramos el 34%, en la capa IV el 4% y en la capa II el 2% restante (Fig. 6, Fig. 60).

Por último, en los animales experimentales que han sido inyectados en la corteza izquierda, normal, y que por lo tanto analizamos la corteza que recibe información de la cóclea lesionada, las neuronas marcadas retrógradamente en la corteza derecha, anómala, formaban grupos con una extensión mediolateral de 400 a 550 μm . La mayoría de neuronas origen de la proyección en la corteza auditiva derecha se

encontraban entre las capas corticales III, IV y V y su distribución presentaba diferencias con respecto a los animales controles y a los que han sido inyectados en la corteza anómala. Concretamente en la capa III aparecían el 48% de las neuronas, y en la capa V el 45%, cabe resaltar que en este caso la distribución de las neuronas era más similar entre ambas capas que en el caso de los animales controles. Además, observamos que en la capa cortical II el porcentaje de neuronas marcadas era mucho menor, sólo un 0,3%. Sin embargo, el dato más destacable es que, con mucha frecuencia, aparecían bastantes neuronas localizadas ectópicamente en la capa cortical IV, en un porcentaje algo más alto que en los animales controles, un 6%. En este caso, podemos observar una reducción en el número de neuronas marcadas en las capas II y III y un aumento en capas más profundas, IV y V (Fig. 6, Fig. 60).

Las diferencias en el número de neuronas marcadas retrógradamente, entre los animales controles y los animales experimentales que han sido inyectados en la corteza derecha, anómala, ha sido analizada estadísticamente, mediante la prueba estadística *t* de Student. El resultado obtenido nos indica que no existían diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las capas corticales analizadas.

Inyecciones de BDA

Los resultados obtenidos mediante las inyecciones de BDA, confirmaban y corroboraban los resultados conseguidos con los trazadores descritos anteriormente, tanto en los animales controles como en los animales cocleotomizados.

Inyecciones de doble trazado.

Topografía y Grado de solapamiento

entre ambos sistemas de conexiones

La interacción e interdigitación de las aferencias tálamo-corticales con las aferencias córtico-corticales Interhemisféricas en la corteza cerebral auditiva, se obtuvo mediante el análisis de las secciones tangenciales.

Los resultados obtenidos de las inyecciones de doble trazado realizadas en

animales controles y en animales cocleotomizados aportaron que existían diferencias notables en la interdigitación de las conexiones talámicas y las callosas entre ambos grupos de animales.

En primer lugar y con respecto a la localización del marcaje retrógrado y anterógrado en el caso de los animales controles observamos que, tanto el marcaje retrógrado como el anterógrado, se encontraban segregados. Cada sistema de conexiones se fragmentaba en parches que se intercalaban unos con otros. En el área auditiva primaria (Te1) podemos distinguir dos parches talámicos, el parche más ventral en algunos niveles de profundidad se encontraba fragmentado en dos, sin embargo, en otros aparecía formando una única banda. Dicho parche se encontraba flanqueado por dos bandas callosas, una situada dorsal y la otra ventral. Sin embargo, aparecían algunas variaciones, concretamente, la presencia de una banda extra tálamo-cortical, pequeña y de baja densidad de botones sinápticos, que se localizaba dorsalmente (Fig. 61B) en algunos animales, pero no en otros (Fig. 61H) y por otro lado, la presencia de una banda extra callosa localizada ventrocaudalmente en algunos casos (Fig. 61J). Los parches talámicos se extendían dorsoventralmente 130 μm aproximadamente. Los parches callosos se extendían dorsoventralmente 110 μm aproximadamente. Los parches callosos se intercalaban con los parches tálamo-corticales y entre ellos aparecían regiones vacías y pequeñas zonas de solapamiento (Fig. 61; 62). Las áreas solapadas, las cuales recibían entradas talámicas y callosas se correspondían únicamente con un 2% del área total (Fig. 65A). En el área auditiva de asociación (Te3) aparecían dos parches, uno talámico y otro calloso, que se disponían rostrocaudalmente, y esta distribución se repetía en todos los casos analizados.

Por otra parte, en el plano tangencial pudimos observar que las neuronas callosas marcadas retrógradamente se segregaron formando grupos, estos con frecuencia coincidían espacialmente con los terminales axónicos de los axones callosos contralaterales (Fig. 61), especialmente en parches más superficiales, sin embargo, aparecían células marcadas fuera de los

parches de terminales axónicas y parches de terminales sin neuronas marcadas retrógradamente, especialmente en cortes más profundos. Concretamente el grado de coincidencia era del 67% (Fig 66A).

Las neuronas córtico-talámicas también formaban parches que con frecuencia se solapaban con los terminales axónicos de los axones talámicos, principalmente en cortes más profundos, aunque la coincidencia no era completa y aparecían parches de terminales axónicas sin neuronas origen de la proyección y dichas neuronas fuera de los parches, fundamentalmente en cortes más superficiales. El grado de coincidencia, era aproximadamente de un 44% (Fig. 66B).

Sin embargo, los animales cocleotomizados no seguían el patrón de distribución descrito en los animales controles, presentaban un patrón completamente distinto al encontrado en los animales controles. Dicho patrón se encontraba alterado tanto en la topografía como en la localización de los parches. En cuanto a los axones tálamo-corticales presentaban una extensión mucho mayor que en los animales controles, concretamente en la mayoría de los casos analizados aparecían dos parches que se extendían 400 μm aproximadamente (Fig 63H), que al igual que en los cortes coronales ocupaban casi 3 veces más la extensión presente en los animales controles. En el caso de los parches callosos presentan una localización diferente con respecto a los animales controles y una extensión variable (140 μm aproximadamente), y con frecuencia aparecían solapados con los parches talámicos (Fig 63; 64).

En la corteza contralateral a la lesión observamos una alteración en el grado de solapamiento entre ambos sistemas de proyecciones: en este caso los **axones tálamo-corticales se solapaban con los axones callosos formando regiones mayores que en los animales controles** (Fig. 63; 64). El mosaico estaba formado principalmente por dos parches tálamo-corticales mayores a los encontrados en los animales controles y que rodeaban a una región central de solapamiento que no existía en los animales controles (Fig. 63; 64). Asimismo, observamos una superposición entre ambos sistemas de

proyecciones, **los axones callosos y los axones tálamo-corticales se solapaban hasta alcanzar algo más del 23% de su área total** (Fig. 65A).

En cuanto a la segregación de las neuronas callosas y córtico-talámicas encontramos una gran variabilidad en los resultados, en algunos casos las neuronas callosas coincidían espacialmente con las terminaciones axónicas de los axones callosos contralaterales (Fig 63), de un modo similar a los controles, siendo el grado de coincidencia del 70% aproximadamente

DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en el que se analizan los efectos de la ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano mediante diferentes técnicas histoquímicas para enzimas, inmunocitoquímica para proteínas ligadoras de calcio e inmunocitoquímica para c-fos a lo largo de la vía auditiva de la rata. Así, nuestros resultados permiten profundizar en la comprensión de los mecanismos de formación de los circuitos neurales que vehiculan la información sensorial a la corteza cerebral y que, por ello, determinan la organización funcional de la misma y, además, conocer cuáles son los cambios plásticos que pueden sufrir como consecuencia de lesiones periféricas. Nuestros resultados también nos permiten conocer con exactitud la extensión y gravedad de la degeneración cortical auditiva en lesiones unilaterales del receptor durante el desarrollo, así como la dependencia que estos cambios tienen con respecto a la edad en la que se produce la lesión.

Por otra parte, nuestro estudio analiza los efectos de la ablación coclear unilateral en la organización topográfica de las proyecciones tálamo-corticales y callosas auditivas, tanto en ratas controles como en ratas deaferentizadas en el periodo postnatal temprano.

Control de los efectos de la lesión sobre

la vía auditiva central

En la literatura se puede encontrar una gran cantidad de trabajos sobre los efectos de la deaferentización periférica unilateral, sin embargo los trabajos

(Fig. 63B-F, 66A), sin embargo, en otros casos se pierde por completo la reciprocidad como en el caso ilustrado en la figura (Fig. 63H-L, 66A)

En cuanto a las neuronas córtico-talámicas también aparecían resultados de gran variabilidad, las neuronas cortico-talámicas ocupaban la misma región que los terminales axónicos de los axones tálamo-corticales, en un grado de coincidencia que varía entre el 75% hasta sólo el 23% (Fig. 63, 66B).

existentes, en general, se fundamentan en el sistema visual, mientras que la deaferentización en el sistema auditivo es un campo menos explorado. Además, los trabajos realizados en el sistema auditivo se han desarrollado en otras especies animales. Dentro de los estudios realizados en rata, la mayoría se realizan en la etapa adulta, y pocos estudios se han basado en el estadio postnatal temprano. Los resultados de nuestro trabajo muestran por primera vez los cambios producidos por la deaferentización unilateral periférica en la edad temprana en todos los núcleos de relevo de la vía auditiva, con diferentes técnicas histoquímicas para enzimas, inmunocitoquímica para proteínas ligadoras de calcio, e inmunocitoquímica para c-fos. De este modo ampliamos el conocimiento sobre los cambios o alteraciones que sufre la vía auditiva tras una deaferentización.

Consideraciones metodológicas

Con el fin de realizar un control de los efectos de la lesión a lo largo de la vía auditiva hemos elegido diferentes técnicas enzimáticas, proteínas ligadoras de calcio y marcadores neuronales.

La técnica de Nissl ha sido utilizada como control citoarquitectónico de los diferentes núcleos y nos ha permitido analizar las posibles variaciones en el tamaño de los núcleos auditivos, de este modo queremos confirmar que todos los animales experimentales usados en nuestro estudio han sido correctamente deprivados.

Las diferentes técnicas de visualización de la **acetilcolinesterasa** han sido estudiadas extensivamente durante las últimas décadas (Silver, 1974; Butcher, 1983) como una herramienta para la

localización de las estructuras que contienen acetilcolina y para la detección específica de fibras y células. De este modo, podemos obtener una determinación semicuantitativa de la actividad enzimática regional.

Trabajos realizados en los últimos años, encuentran una relación entre la **citocromo-oxidasa** y la actividad neuronal (Kageyama y Wong Riley, 1982; Wong Riley y Carroll, 1984; Mjaatredt y Wong Riley, 1991) por lo que la citocromo-oxidasa ha sido considerada como un marcador histoquímico muy útil para mostrar la actividad neuronal en varias estructuras cerebrales bajo condiciones experimentales (Wong-Riley, 1979; Wong-Riley y Welt, 1980; Horton y Hubel, 1981; Kageyama y Wong-Riley, 1982; Humphrey y Hendrickson, 1983). El empleo de esta técnica ha demostrado que el nivel de actividad de la citocromo-oxidasa varía en los diferentes núcleos, aumentando en zonas metabólicamente activas y disminuyendo en zonas de bajo nivel de actividad (Wong-Riley, 1976; Wong-Riley et al., 1978).

Desde que se demostró que la óxido nítrico sintetasa presentaba la misma localización que las poblaciones neuronales positivas para **NADPH-diaforasa**, la histoquímica para esta enzima ha sido extensivamente utilizada como marcador de moléculas que producen óxido nítrico (Dawson, 1991; Hope et al., 1991). El óxido nítrico actúa como un mensajero retrógrado en la plasticidad sináptica, actuando en el refinamiento y estabilización de las terminales aferentes y contribuyendo de este modo a la formación de mapas sensoriales y a la inducción de los cambios a largo plazo (Daniel et al., 1993; Dawson y Zinder, 1994; Son et al., 1996; Holscher, 1997; Mize y Lo, 2000; Prast y Philippu, 2001). Además, se piensa que está implicado en el procesamiento auditivo (Herbert et al., 1991; Rivier y Clarke, 1997). La NADPH-diaforasa en el sistema nervioso central se localiza en las estructuras corticales y subcorticales y su distribución presenta diferentes grados de coincidencia con otros neurotransmisores y neuromoduladores en varias regiones del sistema nervioso (Vicent y Kimura, 1992; Spike et al., 1993; Rodrigo et al., 1994; Szabó, 1996). Recientemente,

se ha demostrado que los niveles de NADPH-diaforasa son dinámicos y que en condiciones experimentales pueden presentar un aumento o disminución de su concentración.

La **parvoalbumina** (Pv; Heizmann, 1984), la **calretinina** (Cr; Rogers, 1987), y la **calbindina** (Cb; Bredderman y Wasserman, 1974) son proteínas ligadoras de calcio y por lo tanto están implicadas en la homeostasis del calcio intracelular. Los iones de calcio están implicados en varios aspectos de la función neuronal, tales como crecimiento, maduración, liberación de transmisores y plasticidad sináptica (Ghosh y Greenberg, 1995). La mayoría de las actividades neuronales requieren un control preciso de la concentración de calcio intracelular, y este control es realizado por varios elementos neuronales entre los cuales destacan las proteínas ligadoras de calcio.

En diversos sistemas sensoriales, al realizarse una privación se obtiene una gran heterogeneidad en la respuesta de la expresión de las proteínas ligadoras de calcio. Algunos trabajos, muestran cambios en la expresión de calbindina, calretinina, parvoalbumina en estas condiciones, sin embargo, en algunos casos los resultados son diferentes o incluso opuestos dependiendo del sistema sensorial alterado y de la estructura examinada (Tigges y Tigges, 1991; Cellerino et al., 1992; Mize et al., 1992; Raussel et al., 1992; Schmidt-Kastner et al., 1992; Arai et al., 1993; Blümcke et al., 1994; Gutierrez y Cusick, 1994; Sans et al., 1995; Caicedo et al., 1997). Los resultados concernientes a una inmunorreactividad positiva se contrastan de estructura a estructura en un sistema dado y los efectos no son consistentes en los diferentes estudios. De este modo, no podemos encontrar un denominador común.

Uno de los métodos clásicos para el estudio de la localización anatómica de la actividad neuronal en el sistema nervioso central utilizado hasta el momento ha sido la 2-desoxiglucosa (2-DG) (ej. Kennedy et al., 1975; Sokoloff et al., 1977). Sin embargo, actualmente, la expresión del gen *c-fos* ha sido ampliamente aceptada como un marcador bioquímico de la actividad neuronal (Sagar y Sharp, 1993; ver la

revisión de Kovacs, 1998). A pesar de las grandes diferencias en los componentes celulares marcados por la 2-desoxiglucosa y la expresión del *c-fos*, los dos métodos han mostrado detalles muy similares acerca de la actividad en el sistema auditivo central. Los paradigmas de estimulación requeridos para evocar una respuesta son similares para ambos métodos, aunque la 2-desoxiglucosa puede ser varios órdenes de magnitud más sensible a la estimulación acústica, las principales desventajas de la 2-DG son (1) la extrema dificultad en la identificación de las neuronas que empiezan a activarse y (2) la incapacidad para distinguir entre la actividad sináptica excitatoria y la inhibitoria (Ej. Nudo y Masterton., 1986).

Sin embargo, la expresión del *c-fos* parece ideal para el mapeo de la actividad individual de neuronas en el sistema auditivo central. Además, es un buen método no sólo para mostrar la función normal en el sistema auditivo central, sino también para mostrar las patologías que pueden resultar de la pérdida de la audición periférica (Luo et al., 1999).

Determinación del periodo crítico

Las entradas aferentes ejercen una importante función en el mantenimiento y desarrollo del sistema nervioso central (Bornstein, 1989; Shatz, 1990; Armstrong y Montminy, 1993). Existen evidencias cada vez mayores que sugieren que las conexiones del SNC pueden sufrir reorganización en los animales adultos (Kaas, 1991; Rausell et al., 1992; Recanzone et al., 1993). En distintas especies y en varios sistemas sensoriales, se ha demostrado que existe un **periodo crítico** durante el desarrollo en el cual las conexiones sinápticas críticas para la supervivencia neuronal se están estableciendo (Brunjes y Borrer, 1983; Durham y Woolsey, 1984; Farbman et al., 1988; Hashisaki y Rubel, 1989; Moore, 1990), por lo que la supresión o los cambios producidos en la actividad neural aferente tienen en este periodo efectos especialmente dramáticos en la función y en la estructura neuronal madura (Hubel y Wiesel, 1970; Van der Loos y Woolsey, 1973; Brunjes, 1994).

En el presente estudio establecemos la edad en la que el sistema auditivo presenta una mayor sensibilidad a la lesión

del receptor auditivo. El resultado es una alteración en el desarrollo del mismo cuando realizamos la cocleotomía en el periodo postnatal temprano. Concretamente, las cocleotomías realizadas en los días postnatales P0-P6 producen una alteración en el desarrollo normal del sistema, mientras que las cocleotomías realizadas en el día postnatal 6 o posteriores no impiden que el sistema se desarrolle normalmente. Una vez obtuvimos este resultado, en nuestro estudio las ablaciones cocleares se han restringido a los 6 primeros días de vida, cuando las estructuras auditivas centrales y periféricas están en proceso de maduración estructural y funcional. En este tiempo es cuando el desarrollo normal de la vía auditiva es especialmente vulnerable a la alteración de las entradas periféricas.

Nuestros resultados sobre la cronología del periodo crítico para el desarrollo normal del sistema auditivo corroboran los estudios previos en la vía auditiva (Okoyama et al., 1995; Gabriel et al., 2000), así como en otros sistemas sensoriales, como el sistema visual (Rothblat y Hayes, 1982; Olavarria y Van Sluyters, 1985).

Alteraciones en el tamaño, la expresión de las enzimas y proteínas ligadoras de calcio y c-fos en los diferentes núcleos de la vía auditiva

Nuestros resultados muestran que aunque la deaferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano produjo cambios en los núcleos de la vía auditiva que procesan información procedente de la cóclea lesionada, no todos los núcleos se alteraron de la misma manera, sino que la alteración más notable se observó en los núcleos más caudales de la vía, es decir, aquellos que se encuentran más próximos al receptor auditivo, especialmente los núcleos cocleares.

El análisis de la expresión de las enzimas, proteínas ligadoras de calcio y el marcador neuronal a lo largo de la vía auditiva nos indica que la deaferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano resulta en alteraciones globales en el desarrollo de la vía auditiva, reflejadas no sólo en alteraciones a largo plazo de la citoarquitectura, sino también

de circuitos neuronales altamente específicos desde el punto de vista neuroquímico, reflejados en cambios en la expresión de determinadas enzimas, proteínas ligadoras de calcio y marcadores neuronales, en núcleos concretos de la vía auditiva que recibirían, en circunstancias normales, la información procedente del oído lesionado.

Núcleos cocleares

La ablación coclear unilateral resulta en una reducción significativa del volumen del núcleo coclear ipsilateral a la lesión. Aunque las diferentes divisiones del núcleo coclear parecen afectarse en grados distintos, como se ha descrito en estudios previos (Trune, 1982; Moore y Kowalchuk, 1988), los porcentajes presentados en nuestro estudio reflejan la reducción en el volumen total. Estos resultados están en concordancia con otros estudios realizados en el sistema auditivo (**ratón**: Trune 1982; **hurón**: Moore y Kowalchuck, 1988; **rata**: Gabriele et al., 2000). Además de la reducción de volumen, el núcleo coclear ipsilateral a la cóclea lesionada presenta una reducción en la expresión de la **acetilcolinesterasa**. Sin embargo, con **citocromo-oxidasa** y **NADPH-diaforasa** no se observan cambios en la intensidad de la tinción. En cuanto a las proteínas ligadoras de calcio, en nuestro estudio no se observaron cambios en la expresión de la **calbindina** ni en la expresión de la **calretinina** en los núcleos cocleares tras la ablación, pero sí en la expresión de la **parvoalbúmina**. La expresión de la actividad para **c-fos** se vio reducida en el núcleo coclear dorsal y núcleo coclear ventral ipsilaterales al oído lesionado, los cuales son deaferentizados por la ablación.

Nuestros resultados referentes a la **acetilcolinesterasa** están apoyados por estudios previos (Godfrey et al., 1983).

En cuanto a las proteínas ligadoras de calcio, en la literatura nos encontramos con una enorme heterogeneidad en la respuesta de la **calbindina** a la deaferentización, Forster e Illing (2000), encuentran un aumento en el número de fibras inmunorreactivas para la calbindina en la subdivisión ventral del núcleo coclear ipsilateral a la lesión. Por otra parte, Philpot y colaboradores (1997) observan que la

expresión para la calbindina disminuye en el bulbo olfativo, tras una deprivación unilateral olfatoria.

En el caso de la **calretinina**, estudios previos apoyan nuestros resultados (Parks y Winsky, 1997). Sin embargo, existen otros estudios en los cuales se obtienen resultados diferentes, y la expresión de la calretinina se ve reducida en el núcleo coclear después de producir una ablación coclear o deprivación auditiva (Winsky y Jacobowitz, 1995; Stack y Code, 2000).

Nuestros resultados en la expresión de la **parvoalbúmina** corroboran los estudios previos realizados en otros sistemas sensoriales, como el sistema olfativo (Philpot et al., 1997).

La heterogeneidad en la respuesta de las proteínas ligadoras de calcio a la deaferentización nos indica que no hay un solo mecanismo para la regulación de su expresión sino que propiedades intrínsecas de las poblaciones celulares, tales como el origen, o los patrones de conexión, podrían determinar esta respuesta. Otra de las razones de la gran variedad en la respuesta de la Cb y de la Cr la podemos encontrar en los aspectos metodológicos, los cuales pueden influir en las modificaciones de la detección inmunocitoquímica de las proteínas ligadoras de calcio. Cambios producidos por enmascaramiento o desenmascaramiento de epitopos, variaciones en la redistribución de las proteínas o modificaciones de sus volúmenes, podrían ser algunas de las razones por las cuales observamos diferencias en la inmunocitoquímica para la expresión de proteínas ligadoras de calcio (Caicedo et al., 1997). Además, la conformación de las proteínas ligadoras de calcio depende de la concentración de calcio, y a elevadas concentraciones del mismo, las proteínas muestran una conformación que es fácilmente reconocida por los anticuerpos (Winsky y Kúznicki, 1996). Tras una deaferentización se producen cambios en la inmunorreactividad de las proteínas, estos cambios se deben, al menos en parte, a los cambios de conformación relacionados con modificaciones en la concentración de calcio intracelular.

En cuanto al **c-fos**, los resultados

obtenidos en nuestro estudio están en concordancia con los trabajos realizados por Wolf et al (1983) con otro marcador neuronal, como la 2-DG, en los cuales la incorporación de la 2-desoxiglucosa se reduce en el núcleo coclear dorsal y en el núcleo coclear ventral ipsilaterales a la ablación. Sin embargo, en ambos casos la actividad neuronal no se perdió por completo, sino que sobrevivió en gran parte en el núcleo coclear dorsal, independientemente del tiempo de supervivencia.

Complejo olivar superior

En los cortes teñidos con la técnica de Nissl se pudo apreciar cómo la deaferentización coclear unilateral produjo una alteración en la morfología y en el tamaño del núcleo lateral de la oliva superior ipsilateral al oído lesionado. Aparte de la reducción de tamaño, en dicho núcleo observamos una reducción en la expresión de **acetilcolinesterasa**, **citocromo-oxidasa**, **parvoalbúmina** y **c-fos**, sin embargo el resto de las técnicas no mostraron cambios apreciables en el mismo. El núcleo paraolivar superior contralateral a la cóclea lesionada presenta una reducción en la expresión de la **calbindina** y de **c-fos**. El núcleo medial del cuerpo trapezoide contralateral a la lesión presenta una reducción en la expresión de la **NADPH-diaforasa**, tanto en las neuronas como en el neuropilo, y en el número de neuronas positivas para **c-fos**.

Por tanto, nuestra hipótesis se corrobora, al alterarse de manera específica, núcleos concretos del complejo olivar superior, al igual como sucedía en los núcleos cocleares.

Los resultados obtenidos para la **acetilcolinesterasa** están en concordancia con trabajos previos (Godfrey et al., 1983). En el caso de la **citocromo-oxidasa**, estudios previos realizados en otros sistemas sensoriales, como por ejemplo el visual, apoyan nuestros resultados, mostrando que la enucleación unilateral produce una drástica reducción en los niveles de actividad de la citocromo-oxidasa a través de la vía retino-cortical (**mono**: Horton y Hubel, 1981; Horton, 1984; Wong-Riley y Carroll, 1984; Wong Riley et al., 1989; Hevner y Wong-Riley, 1990; Wong Riley et

al., 1994; Nie y Wong-Riley, 1996b; **gato**: Wong-Riley, 1979; Wong-Riley y Riley, 1983; Kageyama y Wong-Riley, 1986a, b; Luo et al., 1991; **rata**: Land, 1987; Zhang et al., 1996; Sukekawa, 1997; **musaraña**: Wong-Riley y Norton, 1988; **marsupial Didelphys aurita**: Vargas et al., 2001). Otros estudios realizados en el sistema somatosensorial, también corroboran nuestros resultados (**ratón**: Wong-Riley y Welt, 1980; Yip et al., 1987; **rata**: Fujii et al., 1993).

Sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo, otros estudios, como el de Hyde y Durham (1990) apuntan cambios rápidos y demuestran una respuesta bifásica en la actividad de la citocromo-oxidasa, de este modo, tras producir una ablación coclear unilateral en el pollo, en primer lugar observan un aumento prematuro de la actividad de la citocromo-oxidasa, seguido de una reducción de dicha actividad que se mantiene un largo periodo de tiempo, y que se observa a los tres días de quitar la cóclea. Por ello es posible que un aumento transitorio ocurra también en nuestro sistema pero a tiempos más tempranos que a los que hemos realizado el estudio ya que nuestros resultados provienen de un estudio a largo plazo (con un tiempo de supervivencia de 1-3 meses). La reducción de la actividad de la citocromo-oxidasa a largo plazo probablemente provenga de la reducción de la actividad fisiológica en las neuronas de la vía auditiva. Este resultado está en concordancia con las medidas de la actividad metabólica en los núcleos auditivos tras eliminar la cóclea, de modo semejante a como sucede en estudios de deaferentización en otros sistemas sensoriales (Kupfer, 1963; Kupfer y Palmer, 1964; Wong Riley et al., 1978; Wong Riley, 1979; Wong Riley y Riley, 1983; Yip et al., 1987).

En cuanto a las proteínas ligadoras de calcio, el núcleo lateral de la oliva superior no presenta cambios en la actividad de la **calbindina**, sin embargo a diferencia de nuestros resultados Förster e Illing (2000) observan un aumento en el número de neuronas Cb positivas en el núcleo lateral de la oliva superior contralateral a la cóclea lesionada tras producir una cocleotomía en ratas adultas.

La ablación periférica unilateral no

provoca cambios apreciables en los niveles de la actividad de la **calretinina** en los núcleos del complejo olivar superior. Aunque varios estudios han evaluado la distribución de la calretinina en el complejo olivar superior de varias especies (Baimbridge et al., 1992; Winsky y Jacobowitz, 1995; Caicedo et al., 1996; Lohmann y Friauf, 1996; Caicedo et al., 1997; Parks et al., 1997; Zettel et al., 1997; Henkel y Brunson-Bechtold, 1998; Kubke et al., 1999; Kubke y Carr, 2000; Snack y Code, 2000), sólo hay dos trabajos que describen los efectos de la ablación coclear unilateral en la expresión de la calretinina (**cobaya**: Winsky y Jacobowitz, 1995; **hurón**: Alvarado et al., 2004). Winsky y Jacobowitz (1995) observan una leve reducción en el neuropilo del núcleo lateral de la oliva superior. Estos resultados están en concordancia con el estudio de Alvarado et al., 2004, que además observa una reducción en la inmunorreactividad de la Cr en el neuropilo del núcleo lateral de la oliva superior bilateralmente. Sin embargo, a diferencia de los estudios previos no apreciamos cambios significativos en la inmunorreactividad de la calretinina en el neuropilo del núcleo lateral de la oliva superior ni ipsi- ni contralateralmente, esto podría ser debido a que los estudios previos fueron realizados en otras especies animales, las cuales presentan un patrón distinto del establecimiento de las conexiones y además estos estudios produjeron la deaferentización en tiempos distintos a los descritos en nuestro estudio. Por otro lado, es difícil determinar una posible disminución en el neuropilo del núcleo lateral de la oliva superior en la rata, ya que el núcleo lateral de la oliva superior, no presenta inmunorreactividad para la calretinina, ni neuronas calretinina-positivas. El patrón de distribución de la inmunorreactividad para la calretinina encontrado en el presente estudio en animales controles es coherente con las descripciones de estudios previos (Lohmann y Friauf, 1996).

Colículo inferior

El análisis de las preparaciones de **Nissl** nos indica que el núcleo central del colículo inferior contralateral se redujo como consecuencia de la ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano. Además de la reducción de tamaño, el

estudio enzimático del colículo inferior mostró que tras la ablación coclear unilateral la actividad de la **acetilcolinesterasa**, **citocromo-oxidasa**, **NADPH-diaforasa** se redujo significativamente. El núcleo central del colículo inferior contralateral a la lesión también presenta una reducción en el número de neuronas c-fos positivas. Sin embargo, la expresión de la **calbindina**, **calretinina** y **parvoalbúmina** no presentan cambios apreciables en su expresión.

En general, debido a la escasez de estudios realizados en el sistema auditivo, hemos apoyado nuestros resultados en estudios realizados principalmente en el sistema visual, considerando que la comparación directa de los resultados, no es posible debido a que se trata de dos sistemas sensoriales distintos.

Los resultados obtenidos para la **citocromo-oxidasa** están apoyados por trabajos realizados en otros sistemas sensoriales, como el sistema visual (Sukekawa, 1987; Zhang et al., 1996), en los cuales la deaferentización producía una disminución de la citocromo-oxidasa en los núcleos de la vía visual. Los resultados obtenidos para la **NADPH-diaforasa** están apoyados por estudios desarrollados en el sistema visual (Zhang et al., 1996; Tenorio et al., 1998).

El análisis de la ablación coclear para la **calbindina** esta en concordancia con estudios realizados en el sistema visual (Luo et al., 1990; Mize y Luo, 1992; Lane et al., 1996). A diferencia de nuestros resultados, Förster e Illing (2000) indican un aumento de las neuronas Cb positivas en el colículo inferior contralateral a la lesión. Sin embargo, con estos datos no podemos establecer comparaciones ya que no se refieren a animales cocleotomizados en el periodo postnatal temprano, sino a animales cocleotomizados en el periodo adulto.

Sin embargo, nuestros resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica para **calretinina** no coinciden con estudios anteriores. Estudios en el sistema auditivo del hurón, Fuentes-Santamaria y colaboradores (2003) indican que la inmunorreactividad para la calretinina fue mayor en el núcleo central del colículo inferior contralateral a la lesión que en el ipsilateral tras sufrir una ablación unilateral en el periodo postnatal temprano, aunque

estos cambios no eran estadísticamente significativos. Es posible que estas pequeñas diferencias se deban a las diferencias entre las distintas especies, variaciones en la edad de deprivación, tiempo de supervivencia y/o el efecto de la deprivación en la distribución intracelular de las proteínas ligadoras de calcio a diferentes niveles del sistema auditivo.

El análisis de la expresión de la **parvoalbúmina** corrobora los estudios previos (Mize y Luo, 1992). Sin embargo, otros autores presentan resultados distintos; así por ejemplo, si bien Schmidt-Kastner y sus colaboradores (1992) y Lane y sus colaboradores (1996) muestran un aumento en el número de células parvoalbúmina positivas, Barker y Dreher (1998) por el contrario, observan una disminución en el número de células inmunopositivas para la parvoalbúmina y Hada y sus colaboradores (1999) observan que el neuropilo muestra una disminución en la expresión de parvoalbúmina. Estos resultados siguen apoyando la heterogeneidad en la respuesta de las proteínas ligadoras de calcio.

Nuestros resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica para **c-fos** están apoyados por trabajos previos (Woolf et al., 1983; Luo et al., 1999).

Cuerpo geniculado medial

Cuando producimos una ablación periférica unilateral en el periodo postnatal temprano, observamos cómo a nivel talámico se produce una reducción en el tamaño del núcleo ventral del cuerpo geniculado medial; asimismo se produce una reducción de la actividad de la **acetilcolinesterasa**, **citocromo-oxidasa**, **NADPH-diaforasa**, **calbindina**, y una reducción en el número de neuronas **c-fos** positivas. Sin embargo no se aprecian alteraciones significativas en la expresión de la **calretinina** y de la **parvoalbúmina**.

Los resultados obtenidos con la técnica de la **acetilcolinesterasa** están apoyados por estudios realizados en el sistema auditivo (Robertson et al., 1991) y en otros sistemas sensoriales, como el sistema visual (Robertson et al., 1989). Los resultados conseguidos en nuestro estudio para la **citocromo-oxidasa** están apoyados por estudios realizados en otros sistemas

sensoriales, como el sistema visual (Sukekawa, 1987; Zhang et al., 1996). Los resultados obtenidos para la **NADPH-diaforasa** están apoyados por trabajos ejecutados en el sistema visual (Zhang et al., 1996).

Los datos obtenidos para la **calbindina** están en concordancia con estudios realizados en el sistema visual (Mize et al., 1992; Schmidt-Kastner et al., 1992). Sin embargo, Gutiérrez y Cusick (1994) encuentran un aumento en la expresión de la calbindina en las capas deafeerentizadas del cuerpo geniculado lateral tras producirse una enucleación. La comparación de nuestros resultados con los descritos por Gutiérrez y Cusick (1994) resulta complicada, ya que se trata de dos sistemas sensoriales completamente distintos, y el cuerpo geniculado lateral en el sistema visual no ocupa la misma posición que el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial en el sistema auditivo. Además, presentan condiciones experimentales distintas, por lo que las diferencias encontradas también podrían deberse a diferencias en el periodo de supervivencia y/o a diferencias técnicas que afectan a la sensibilidad de los métodos usados. En general, la heterogeneidad de los resultados se puede explicar por distintos motivos, entre los que cabe destacar los aspectos metodológicos, las propiedades intrínsecas de las poblaciones neuronales, los patrones de conexiones de los distintos circuitos neuronales y las variaciones en los niveles de calcio intracelular.

Del mismo modo, los resultados conseguidos con el análisis de la **parvoalbúmina** están apoyados parcialmente por trabajos previos realizados en el sistema visual del mono, sugiriendo que la tinción neuronal para la parvoalbúmina no se encuentra afectada por la lesión, sin embargo, sí se ha observado una reducción en las fibras parvoalbúmina-positivas, que en nuestro caso no apreciamos (Tigges y Tigres, 1991, Mize et al., 1992b; Tigges y Tigres, 1993; Gutierrez y Cusick, 1994). La comparación de nuestros resultados con los descritos previamente resulta complicada ya que estamos comparando dos especies distintas y dos sistemas sensoriales diferentes.

Los resultados alcanzados con

inmunocitoquímica para **c-fos** están parcialmente apoyados por los trabajos de Luo (1999) los cuales apuntan que todos los núcleos del cuerpo geniculado medial, se encuentran alterados por la deaferentización. En nuestro caso el núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial y el núcleo medial del cuerpo geniculado medial no se encuentran alterados por la ablación coclear unilateral.

Corteza cerebral auditiva

En los cortes teñidos con el método de **Nissl** se aprecia una reducción en el grosor de la corteza auditiva contralateral a la lesión, así como una ligera desestructuración de la laminación cortical. Específicamente, las capas corticales III y IV de la corteza auditiva contralateral a la lesión presentan menor grosor que los animales controles.

Además, observamos una reducción de la intensidad de tinción de la **acetilcolinesterasa**, **citocromo-oxidasa**, **NADPH-diaforasa** y **parvoalbúmina** en las capas corticales IIIb y IV de la corteza contralateral a la cóclea lesionada. La expresión de la **calbindina** se reduce en el neuropilo de las capas corticales II-III, V y VIb de la corteza auditiva contralateral a la lesión, y la **calretinina** presenta una reducción en su reactividad en las capas corticales V y VIb. El número de neuronas **c-fos** positivas se reduce en todas las capas corticales, pero esta reducción es más acusada en las capas II, III y IV.

Experimentos recientes en otros sistemas sensoriales apoyan nuestros resultados con la técnica para la **acetilcolinesterasa**, así por ejemplo, en el sistema visual (Robertson et al., 1985, 1987, 1988).

Los resultados conseguidos para la **calbindina** en nuestro estudio apoyan los estudios previos en otros sistemas sensoriales, como el sistema visual (Cellerino et al., 1992; Blumcke et al., 1994).

Los resultados obtenidos para la **parvoalbúmina** están apoyados por trabajos desarrollados en el sistema visual (Cellerino et al., 1992). Actualmente existen muchos trabajos de deaferentización realizados en la corteza visual, no sólo en ratas sino también en otros mamíferos más desarrollados, como es el caso del mono, y los datos obtenidos

apoyan nuestros resultados (Blumcke et al., 1994; Gutiérrez y Cusick, 1994; Garder et al., 1996).

Nissl

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano produce una reducción en el tamaño de los núcleos cocleares, núcleo lateral de la oliva superior ipsilaterales a la lesión y controlateralmente en el núcleo central del colículo inferior, el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial y el área auditiva primaria (Te1).

La reducción del núcleo coclear ipsilateral a la lesión se podría explicar ya que la destrucción del oído interno induce una degeneración del nervio coclear y de sus terminales, que inervan las neuronas del núcleo coclear ipsilateral (Moore, 1986). La reducción de volumen es más notable en el núcleo coclear anteroventral, ya que las células del núcleo coclear anteroventral reciben solamente entradas excitatorias desde la cóclea ipsilateral vía el octavo par craneal (Born, 1969; Parks y Rubel, 1978). La reducción en el tamaño del núcleo lateral de la oliva superior puede deberse, al menos en parte, a una reducción en las aferencias que proceden del núcleo coclear afectado. El núcleo lateral de la oliva superior responde a la estimulación ipsilateral del núcleo coclear que se encuentra alterado por la deprivación. Estas observaciones están apoyadas por estudios previos que muestran que el núcleo lateral de la oliva superior recibe proyecciones bilaterales del núcleo coclear anteroventral (Harrison e Irvin, 1966b). La proyección ipsilateral es directa y excitatoria (Warr, 1966). La proyección contralateral atraviesa la línea media hasta el núcleo medial del cuerpo trapezoide, que actúa como estación de relevo y envía una proyección inhibitoria al núcleo lateral de la oliva superior de su mismo lado (Moore y Caspary, 1983; Saint Marie et al., 1989; Adams y Mugnaini, 1990). Las entradas desde los dos sitios llegan a las neuronas del núcleo lateral de la oliva superior simultáneamente (Irvine, 1986). Como consecuencia, las neuronas del núcleo lateral de la oliva superior son excitadas por el ipsilateral y son inhibidas por el contralateral y en este caso el núcleo coclear ipsilateral se encuentra alterado por la ablación.

Según el conocimiento de las conexiones entre el colículo inferior y el resto de núcleos de la vía auditiva, es conocido que las neuronas del núcleo central del colículo inferior se encuentran bajo la influencia de los centros inferiores, de forma que el núcleo central del colículo inferior recibe información de los núcleos cocleares tanto dorsal como ventral contralaterales (Beyerl, 1978; Coleman y Clerici, 1987; Bajo et al., 1993; Merchán et al., 1994; González-Hernández et al., 1996; Merchán y Berbel, 1996; Oliver et al., 1999; Malmierca et al., 1999a, b), es decir, aquellos que están alterados por la lesión. Otra de las principales proyecciones que llegan al núcleo central del colículo inferior procede del núcleo lateral de la oliva superior; estas son proyecciones bilaterales, pero según estudios previos la mayoría de las proyecciones ipsilaterales son inhibitorias (Glendenning y Baker, 1988, Saint-Marie et al., 1989; Saint-Marie y Baker, 1990) y las proyecciones contralaterales son excitatorias (Saint-Marie et al., 1989; Saint-Marie y Baker, 1990). Las proyecciones contralaterales que son excitatorias, serían las que salen del núcleo lateral de la oliva superior ipsilateral a la lesión y que llegan al núcleo central del colículo inferior contralateral y que es el que se encuentra alterado según nuestros resultados.

Otra de las proyecciones que recibe el núcleo central del colículo inferior y que también está alterada sería la que va desde el núcleo paraolivar superior hasta el núcleo central del colículo inferior, esta conexión es ipsilateral (Faye-Lund, 1986; Friauf y Kandler, 1990; Saldaña y Berrebi, 2000), y sigue apoyando nuestros resultados ya que en nuestro caso el núcleo paraolivar superior contralateral está alterado y por lo tanto las proyecciones que salen del núcleo paraolivar superior también presentan una alteración, por lo que la información que envían al núcleo central del colículo inferior ipsilateral se encuentra alterada. Como resultado de la llegada de dichas proyecciones alteradas al núcleo central del colículo inferior, observamos una reducción del núcleo central del colículo inferior contralateral a la cóclea lesionada. La corteza dorsal y la corteza externa, no presentan cambios relevantes en su análisis, ya que estas cortezas reciben información principalmente de la vía no

lemniscal, es decir, reciben información procedente de las estructuras no estrictamente auditivas.

El núcleo ventral del cuerpo geniculado medial también se encuentra alterado, ya que la proyección principal que recibe este núcleo proviene del núcleo central del colículo inferior ipsilateral (LeDoux et al., 1987; González-Hernández et al., 1991; Peruzzi et al., 1997), el cual también se encuentra alterado y por lo tanto el número de "inputs" que llegan al núcleo ventral del cuerpo geniculado medial es menor. La reducción en el tamaño del núcleo ventral del cuerpo geniculado medial es menor que en otros núcleos de la vía ya que el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial también recibe una proyección cruzada desde el núcleo central del colículo inferior contralateral (Chernock y Winer, 2001), aunque esta proyección sea menor. El núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial y el núcleo medial del cuerpo geniculado medial no se encuentran alterados, ya que los mismos reciben entradas de la vía no lemniscal, concretamente el núcleo dorsal del cuerpo geniculado medial recibe información de la corteza externa y de la corteza dorsal del colículo inferior, y el núcleo medial del cuerpo geniculado medial recibe proyecciones principalmente de la corteza externa del colículo inferior, que no se encuentra alterada por la deprivación.

La reducción en el grosor de la corteza auditiva se debe a que las conexiones que llegan a la corteza cerebral auditiva desde centros inferiores de la vía los cuales también se encuentran alterados por la deprivación. Es bien conocido que la corteza cerebral auditiva (Te1) se encuentra recíprocamente conectada con el CGMV (Ryugo y Killackey, 1974; Willard y Ryugo, 1983; Games y Winer, 1988; Winer, 1985; Winer y Larue, 1987; Roger y Arnault, 1989; Arnault y Roger, 1990; Clerici y Coleman, 1990; Shi y Cassell, 1997; Winer et al., 1999c). Las fibras tálamo-corticales terminan en las capas IIIb y IV (Ryugo y Killackey, 1974; Ryugo y Weinberger, 1976; Vaughan, 1983; Mitani et al., 1985; Romanski y LeDoux, 1993a). Por ello, es lógico pensar que las capas de la corteza contralateral estén alteradas, ya que reciben información procedente del núcleo ventral

del cuerpo geniculado medial ipsilateral, que también está alterado. Te1 también recibe una débil proyección desde los núcleos dorsal y medial del cuerpo geniculado medial (Roger y Arnault, 1989). Las áreas auditivas secundarias (Te2 y Te3) no presentan alteraciones tras la ablación coclear unilateral, ya que Te2 recibe proyecciones desde los núcleos dorsal y medial del cuerpo geniculado medial y Te3 recibe proyecciones sólo desde el medial (Arnault y Roger, 1990; Clerehugh y Coleman, 1990; Winer et al., 1999c).

Acetilcolinesterasa

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano produce una disminución en la expresión de la acetilcolinesterasa en los núcleos cocleares, núcleo lateral de la oliva superior ipsilaterales a la lesión y contralateralmente en el núcleo central del colículo inferior, el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial y en las capas IIIb y IV de la corteza cerebral auditiva.

Una posible explicación a estos resultados la encontramos en el estudio de las conexiones (ver apartado "Nissl"). En este caso podría ser que la ablación coclear unilateral produjera una degeneración parcial en los núcleos que reciben información procedente del oído lesionado, dicha alteración sería producida como consecuencia de recibir entradas de los núcleos que se encuentran alterados por la privación, y se manifestaría en una pérdida de un gran número de neuronas, atrofia de las neuronas restantes y una disminución en la capacidad de las neuronas de sintetizar acetilcolinesterasa.

Nuestros resultados sugieren que la reducción de la acetilcolinesterasa en la corteza cerebral auditiva, concretamente en las capas IIIb y IV se podría explicar por una combinación de estos tres factores a lo largo de los núcleos de la vía auditiva que se encuentran alterados por la deafferentización.

Citocromo-oxidasa

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano no produce cambios en la expresión de la citocromo-oxidasa en los núcleos cocleares ni ipsi- ni contralaterales, sin embargo, podemos

observar una disminución en la intensidad de la tinción para la citocromo-oxidasa en el núcleo lateral de la oliva superior ipsilateral a la lesión y controlateralmente en el núcleo central del colículo inferior, el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial y en las capas corticales IIIb y IV de la corteza cerebral auditiva.

La falta de cambios en la tinción de la citocromo-oxidasa en los núcleos cocleares, a diferencia de otras enzimas, como por ejemplo la acetilcolinesterasa, podría deberse a que la actividad metabólica de las neuronas del núcleo coclear no depende de las entradas acústicas. Otra posible explicación sería que no todas las neuronas positivas para la citocromo-oxidasa son excitadas exclusivamente por aferencias que provienen de la cóclea lesionada, sino que son activados por otras vías que no son afectadas por la ablación coclear. La presencia de actividad para la citocromo-oxidasa en el núcleo coclear ipsilateral se podría explicar porque las neuronas del núcleo coclear dorsal pueden ser excitadas por el oído contralateral. Evidencias de esta estimulación contralateral fueron aportadas por Vischer y sus colaboradores (1994) y Brown y Liu (1995). Además, registros electrofisiológicos en el núcleo coclear dorsal nos han aportado evidencias de estimulación contralateral tanto excitatoria como inhibitoria (Mast, 1970; Young y Brownell, 1976). La existencia de posibles vías originadas en el núcleo coclear dorsal podría apoyar este fenómeno. Así, por ejemplo, existe una proyección directa desde el núcleo coclear contralateral hasta el núcleo coclear dorsal ipsilateral (Cant y Gaston, 1982; Shore et al., 1992) y proyecciones indirectas desde el núcleo periolivar (bilaterales) y desde el colículo inferior ipsilateral (Aitkin, 1986; Irving, 1986; Cant, 1992). Algunos autores (Wentholt, 1987; Benson y Potashner, 1990; Saint Marie et al., 1993; Ostapoff et al., 1997) piensan que las proyecciones desde el núcleo periolivar podrían ser inhibitorias, mientras que otros piensan que tienen un carácter excitatorio (Ostapoff et al., 1997). Sin embargo, la principal entrada excitatoria al núcleo coclear dorsal probablemente se origine en el colículo inferior (Caicedo y Herbert, 1993; Saldaña, 1993).

La razón de la disminución de la

intensidad de la tinción en los núcleos de la vía auditiva que reciben información procedente del oído lesionado, la podemos encontrar en su sistema de conexiones (ver apartado "Nissl"). La reducción en la síntesis de citocromo-oxidasa nos indica una disminución en la demanda de energía producida por muerte neuronal y por cambios degenerativos en los axones y terminales sinápticos de los núcleos inferiores de la vía auditiva afectados por la lesión. Por ejemplo, en el núcleo magnocelular del pollo se produce la muerte de aproximadamente el 25% de las neuronas y las neuronas que sobreviven presentan una disminución en el tamaño del soma (Born y Rubel, 1985). Por ello, la disminución de la actividad de la citocromo-oxidasa probablemente se deba a una reducción en el tamaño del soma, y a una reducción en la capacidad de síntesis de la citocromo-oxidasa, por lo que los axones que salen de ellas presentan una degeneración parcial, que se traduce en alteraciones en los núcleos que inervan.

Estos núcleos que forman parte de la vía auditiva presentan neuronas alteradas tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo, y sus axones se encuentran degenerados, por lo que es lógico pensar que la información que dichos axones transmiten a la corteza se encuentre también alterada, y el resultado sea una disminución de la actividad metabólica y, por lo tanto, de una pérdida en la reactividad de la citocromo-oxidasa.

NADPH-diaforasa

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano no produce cambios en la expresión de la NADPH-diaforasa en los núcleos cocleares ni ipsi- ni contralaterales a la lesión, sin embargo, podemos observar una disminución en la intensidad de la tinción para la misma en el núcleo paraolivar superior, el núcleo medial del cuerpo trapezoide, el núcleo central del colículo inferior, el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial y en las capas corticales IIIb y IV de la corteza cerebral auditiva, contralaterales a la lesión.

La falta de cambios en la tinción de la NADPH-diaforasa en los núcleos cocleares, al igual que en el caso de la citocromo-oxidasa se debe a que no todas las

neuronas positivas para la oxido nítrico sintetasa son excitadas exclusivamente por "inputs" que provienen de la cóclea lesionada, sino que son activadas por otras vías que no son afectadas por la ablación coclear. La presencia de actividad para la NADPH-diaforasa en el núcleo coclear ipsilateral se podría explicar por el estado de las conexiones (ver apartado "Citocromo-oxidasa").

La ablación coclear unilateral realizada en el periodo postnatal temprano produce una disminución de la actividad de la NADPH-diaforasa en el núcleo medial del cuerpo trapezoide contralateral a la lesión, la explicación de que este núcleo se encuentre alterado por la ablación la podemos encontrar en su sistema de conexiones, ya que se encuentra inervado contralateralmente por el núcleo coclear anteroventral (Warr, 1966; Van Noort, 1969; Harrison y Feldman, 1970), que es el núcleo que recibe información procedente de la cóclea lesionada.

Otro de los núcleos del complejo olivar superior que se encuentra alterado por la deaferentización periférica unilateral es el núcleo paraolivar superior contralateral a la lesión, esto se podría explicar porque a pesar de que el núcleo paraolivar superior reciba proyecciones bilaterales desde el núcleo coclear ventral (Friauf y Ostwald, 1988), y en un principio podemos pensar que debería encontrarse alterado en ambos lados, recibe una proyección ipsilateral importante desde el núcleo medial del cuerpo trapezoide (Banks y Smith, 1992; Sommer et al., 1993) que también se encuentra alterado. Estos cambios son comprensibles y pueden estar relacionados con la eliminación de las proyecciones cocleares a los diferentes núcleos de la vía alterados.

La ablación reduce la NADPH-diaforasa en las estructuras que reciben información de la cóclea lesionada, este hecho está asociado a la disminución de la demanda de la energía en los núcleos deaferentizados. La disminución de la NADPH-diaforasa puede estar relacionada con la abolición de la influencia de las vías glutamatérgicas. Se ha sugerido que la oxido nítrico sintetasa puede estar localizada en las neuronas postsinápticas las cuales reciben sinápsis glutamatérgicas excitatorias (Garthwaite, 1991). Las proyecciones de los

núcleos cocleares hacia el resto de núcleos de la vía auditiva podrían ser glutamatérgicas (Ottersen y Store-Mathisen, 1984; Godfrey et al., 1988; Caspary y Faingold, 1989; Glendenning et al., 1991; Helfert et al., 1992; Petralia y Wenthold, 1992; Wu y Nelly, 1992). Se ha demostrado que lesiones en la corteza cerebral visual disminuyen los niveles de glutamato de las fibras degeneradas y de sus terminales, acompañado de una reducción de la síntesis de glutamato en las neuronas postsinápticas (Jeon et al., 1997). Del mismo modo podría ser que la ablación periférica unilateral redujera los niveles de glutamato en las estructuras auditivas subcorticales asociado a una disminución en la demanda de energía en los centros auditivos deaferentizados. La reducción de la NADPH-diaforasa puede estar relacionada no sólo con la disminución de la descarga de glutamato en las proyecciones deaferentizadas por la lesión, sino además con la reducción en la síntesis de glutamato en las células postsinápticas deaferentizadas parcialmente.

Como hemos ido observando a lo largo de la vía auditiva los cambios en la citocromo-oxidasa son paralelos a los cambios observados en la NADPH-diaforasa, por lo que estos resultados nos sugieren que estos cambios se deben a una disminución de la actividad neuronal y del consumo metabólico.

Calbindina

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano no produce cambios en la expresión de la calbindina en los núcleos cocleares ni en el núcleo central del colículo ni ipsi- ni contralaterales a la lesión la lesión, sin embargo, podemos observar una disminución en la intensidad de la tinción para la misma en el núcleo paraolivario superior, el núcleo medial del cuerpo trapezoide, en todas las divisiones del cuerpo geniculado medial y en las capas corticales I-III, V y VIb de la corteza cerebral auditiva, contralaterales a la lesión.

Nuestros resultados muestran que los núcleos cocleares no sufren cambios tras la deaferentización ya que no todas las neuronas positivas para la Cb reciben proyecciones desde la cóclea lesionada sino que son activadas por vías que no están afectadas por la lesión, por ejemplo, el

núcleo coclear dorsal recibe entradas excitatorias desde el núcleo coclear dorsal contralateral, el cual no se afecta por la lesión.

La disminución en la expresión de la calbindina en el núcleo paraolivario superior y en el núcleo medial del cuerpo trapezoide contralaterales a la lesión se explica una vez más por su sistema de conexiones (ver apartado "NADPH-diaforasa").

Debido a que después de una ablación periférica unilateral se produce una disminución de las neuronas calbindina positivas y de las fibras que salen de los núcleos denervados, es posible que cambios en la inmunoreactividad de la calbindina, en los núcleos denervados, se reflejen en sus proyecciones en otros núcleos de la vía auditiva y, por lo tanto, en la inmunoreactividad del neuropilo. Otro mecanismo posible para explicar la reducción en la inmunoreactividad de la calbindina podría ser que fuera el resultado de una reducción en las dendritas de las neuronas de los núcleos afectados. La eliminación de la cóclea induce una selectiva pérdida o contracción de las dendritas que reciben proyecciones desde el núcleo denervado (Tucci et al., 2001). Finalmente, el declive de la inmunoreactividad para la calbindina en el neuropilo de los núcleos alterados podría ser el resultado de una combinación de la contracción dendrítica y axónica. Por ello, el número de neuronas se encuentra reducido y las neuronas que quedan han perdido la capacidad para sintetizar calbindina.

La calbindina se expresa principalmente en las capas de la corteza auditiva primaria dominadas por conexiones intracorticales (Sequier et al., 1990). Las capas II-III son las capas corticales que presentan alta concentración de calbindina en los animales controles, estas capas son las que reciben mayor cantidad de las entradas intracorticales y contienen células que proyectan a una gran variedad de dianas corticales (Willard y Ryugo, 1983; Ruttgers et al., 1990; Hofstetters y Ehret, 1992). La otra banda de marcaje intenso para la calbindina es la capa V, la cual probablemente contiene células que proyectan a la corteza contralateral (Games y Winer, 1988).

La pérdida de las fibras inmunorreactivas para la calbindina puede ser debida a la pérdida de las neuronas intrínsecas de las zonas corticales deaferentizadas que proyectan a las capas afectadas

Calretinina

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano no produce cambios en la expresión de la calretinina en ningún núcleo de la vía auditiva, a excepción de la corteza cerebral auditiva, que presenta una reducción en la expresión de la calretinina en el neuropilo de la capa VIb.

La falta de cambios en los núcleos que forman parte de la vía auditiva podría deberse a que su expresión es independiente de la funcionalidad de la cóclea en el periodo postnatal temprano, ya que se sabe que la Cr aparece en estadios muy tempranos del desarrollo prenatal. Otra posible explicación a la falta de cambios en la Cr, podría deberse a que muchas células Cr positivas reciben información procedente de vías alternativas, y no exclusivamente de la cóclea lesionada, así como, por los procesos de compensación que tienen lugar a lo largo de la vía auditiva.

Sin embargo, no conocemos el porque de la reducción en la expresión de la calretinina en la capa cortical VI de la corteza cerebral auditiva, este hecho podría deberse a una especial sensibilidad de las neuronas de la corteza auditiva a la deaferentización periférica, que no obedece a su sistema de conexiones.

Parvoalbúmina

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano produce una reducción en la expresión de la parvoalbúmina en los núcleos cocleares, y en el núcleo lateral de la oliva superior ipsilaterales a la lesión, y en la corteza cerebral auditiva contralateral a la lesión, concretamente en las capas IIIb y IV.

La reducción de la reactividad para la parvoalbúmina en los núcleos que reciben información de la cóclea lesionada podría ser el resultado de una pérdida en la inmunorreactividad de la parvoalbúmina en los axones que salen de los núcleos deprivados.

En general, la pérdida de la tinción para la Pv podría deberse a la pérdida de los axones cocleares, por lo que el contenido de la Pv puede ser menor en las células de los núcleos que reciben información de la cóclea lesionada. En este caso menos cantidad de Pv se transportaría hacia los terminales axónicos de las neuronas de los núcleos afectados o quizás el epítipo que se une al calcio que es reconocido por el anticuerpo monoclonal podría ser incapaz de unirse a los terminales axónicos.

Que no se altere la expresión de la Pv en el núcleo central del colículo inferior y en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial nos podría indicar que las células activas para la Pv no sólo reciben información de los núcleos alterados por la lesión sino que además reciben "inputs" procedentes de otras vías alternativas y que evitan la disminución de la actividad de la enzima.

Esta reducción puede representar una pérdida de la inmunoreactividad de la parvoalbúmina en los axones del núcleo ventral del cuerpo geniculado medial, cuyas dianas específicas son las capas IIIb-IV. Esta teoría está apoyada por la especificación laminar de la pérdida, ya que las capas afectadas son aquellas que reciben los axones talámicos.

C-fos

La ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano produce una reducción en el número de neuronas c-fos positivas en los núcleos cocleares, núcleo lateral de la oliva superior, núcleo medial de la oliva superior y núcleo medial del cuerpo trapezoide ipsilaterales a la lesión, en el núcleo paraolivar superior, núcleo central del colículo inferior, núcleo ventral del cuerpo geniculado medial, y en la corteza cerebral auditiva, contralaterales a la lesión.

La presencia de actividad para el c-fos en los núcleos cocleares una vez más se podría explicar gracias a la distribución de sus conexiones (ver apartado "Citocromooxidasa").

La expresión de neuronas positivas para c-fos no varía en el núcleo lateral de la oliva superior, núcleo medial de la oliva superior y núcleo medial del cuerpo trapezoide contralaterales y tampoco varía en el núcleo paraolivar superior ipsilateral,

por lo que una posible explicación podría ser que el núcleo lateral de la oliva superior, núcleo medial de la oliva superior y el núcleo medial del cuerpo trapezoide respondan a una estimulación ipsilateral y el núcleo paraolivar superior responda a una estimulación contralateral. Los estudios de trazadores nos indican que el núcleo lateral de la oliva superior está recíprocamente conectado con el núcleo coclear ventral ipsilateral (Friauf y Ostwald, 1988), el núcleo medial de la oliva superior está conectado bilateralmente con el núcleo coclear ventral (Friauf y Ostwald, 1988), el núcleo paraolivar superior está conectado bilateralmente (cobaya: Thompson y Thompson, 1991; Schofield, 1995; Thompson y Schofield, 2000). Por último, el núcleo medial del cuerpo trapezoide está conectado con el núcleo coclear ventral contralateral (Young et al., 1988a).

Por ello, el resultado más sorprendente es que exista inmunorreactividad para c-fos en el núcleo medial del cuerpo trapezoide contralateral, incluso durante largos periodos de supervivencia. Una explicación podría ser que la ablación y, por lo tanto, la privación resultante, desenmascaren la

influencia de entradas no auditivas hacia el núcleo medial del cuerpo trapezoide, entradas que podrían haber sido normalmente suprimidas por actividad espontánea en la vía intacta. El efecto de la activación del núcleo medial del cuerpo trapezoide en estructuras superiores de la vía auditiva es muy complicado, porque sus neuronas son principalmente inhibitorias (Caspary y Finlayson, 1991) y son un importante componente temprano de las vías binaurales responsables de la localización del sonido. Sin embargo, una de las principales dianas del núcleo medial del cuerpo trapezoide, el núcleo lateral de la oliva superior del mismo lado, está tonotópicamente activado bajo la misma ablación y las mismas condiciones de estimulación, sugiriendo que si estas neuronas se encuentran ampliamente activadas, ésta activación sería insuficiente para completar la inhibición de las neuronas del núcleo lateral de la oliva superior (Luo et al., 1999).

Una posible explicación a la reducción en el número de neuronas c-fos positivas en el resto de núcleos de la vía que se encuentran afectados por la lesión la podemos encontrar en los estudios de conexiones (ver apartado "Nissl").

Organización topográfica de las proyecciones talamocorticales y callosas auditivas

El resultado del análisis de los efectos de la ablación coclear unilateral en el periodo postnatal temprano en la organización topográfica de las proyecciones tálamo-corticales y callosas auditivas, nos indica que la corteza cerebral auditiva contralateral, es decir aquella que recibe información procedente del oído lesionado presenta alteraciones tanto en el patrón de distribución de las conexiones tálamo-corticales como callosas.

Consideraciones metodológicas

Los datos obtenidos al analizar los casos demuestran que hay una constancia en las características o rasgos principales entre los animales controles y los experimentales. Sin embargo, hemos encontrado pequeñas diferencias en el patrón de distribución de las proyecciones córtico-corticales y tálamo-corticales entre individuos de cada uno de los grupos, control y experimental. Las diferencias encontradas se aprecian tanto en la extensión del marcaje, como en la densidad de axones y neuronas marcadas. Estas diferencias no parecen ser debidas al tamaño de las inyecciones, por dos razones. En primer lugar, el volumen de las inyecciones de trazador (BDA+DF, DTR) realizadas fue el mismo, 0.46 μ l, establecido considerando la capacidad de difusión del trazador y que éste no debía extenderse a áreas adyacentes. En segundo lugar, en todos los casos la inyección cubrió un mínimo de dos tercios del área elegida. Tampoco deben ser debidas al método de inyección, ya que en todos los casos analizados la inyección de los trazadores se realizó mediante presión. Las diferencias encontradas tampoco pueden ser debidas a la concentración de trazador ya que no varió en ningún caso. Las variaciones encontradas tampoco deberían deberse a diferencias en la absorción y transporte del trazador.

Otra de las razones de esta variabilidad podría deberse a las coordenadas estereotáxicas establecidas según el atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 1998) para las inyecciones, tanto en

la corteza cerebral auditiva como en el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial, pero en todos los casos analizados en nuestro estudio las coordenadas son semejantes (incluyendo la profundidad de las mismas).

La edad a la cual se realiza la cocleotomía es un factor muy importante, pero lo descartamos como posible causa de las diferencias en el patrón de distribución de las conexiones, ya que previamente establecimos el periodo crítico a partir del cual las cocleotomías no producían ningún efecto en el desarrollo normal de las conexiones, por lo que los casos que hemos utilizado son aquellos cocleotomizados dentro del periodo crítico P0-P6, en el que, según nuestros propios resultados, no hay diferencias apreciables entre estos días. El periodo de supervivencia del animal (comprendido entre el día que se realiza la inyección y el día que el animal es perfundido) también es de especial relevancia, y pequeñas diferencias encontradas entre los animales cocleotomizados en la formación del patrón de conexiones córtico-corticales y tálamo-corticales podrían ser debidas a un tiempo de supervivencia insuficiente para que los axones lleguen a la corteza contralateral y se distribuyan correctamente. Estos casos que se caracterizaban por tener un periodo de supervivencia muy corto, realizados al principio del estudio, fueron desestimados.

En cuanto al corte del tejido no se observan diferencias ya que todos los casos fueron cortados a 60 μ m.

En consecuencia, la explicación más plausible es que la variabilidad entre los resultados es debida a una ligera variabilidad anatómica entre animales distintos.

Conexiones tálamo-corticales

El patrón de organización de las proyecciones tálamo-corticales auditivas ha sido descrito previamente utilizando técnicas de degeneración axónica (**rata**: Vaughan, 1983; Cipolloni y Keller, 1989; **ratón**: Frost y Caviness, 1980; **gato**: Sousa-Pinto, 1973a; **mono**: Mesulan y Pandya, 1973) o utilizando métodos autorradiográficos (**musaraña arborícola**: Oliver y Hall, 1978b). Aunque estas técnicas han servido para revelar los patrones básicos de organización de las conexiones tálamo-corticales en otros sistemas sensoriales,

como por ejemplo, en el caso del sistema visual (Jones, 1983), presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, los métodos de degeneración dependen de la selección apropiada del periodo de supervivencia, así como de la distinción entre las fibras normales y las patológicas (Morest, 1975a). En segundo lugar, las técnicas autorradiográficas proporcionan muy poca información acerca de la morfología de los terminales axónicos (**rata**: Winer y Laure, 1987), y no revelan todas las conexiones con igual sensibilidad y eficacia (Sousa-Pinto y Reis, 1975). De este modo, ninguno de estos métodos nos permite obtener resultados rigurosos sobre las diferencias y semejanzas de la vía tálamo-cortical.

Muchos detalles en la descripción de las fibras tálamo-corticales han sido estudiados en la corteza visual (**mono**: Blasdel y Lund, 1983), en la corteza somatosensorial (**gato**: Landry y Deschenes, 1981), y en la corteza motora (**rata**: Aumann et al., 1988), pero el sistema auditivo ha recibido menos atención.

En contraste con otros sistemas sensoriales, hay remarcablemente pocos estudios de las vías tálamo-corticales auditivas realizados con trazadores axoplásmicos. Existen estudios contados sobre el patrón de conectividad de las proyecciones tálamo-corticales auditivas mediante técnicas de transporte axónico en diferentes especies (**rata**: Le Doux et al., 1985; Winer y Larue, 1987; **gato**: Winer et al., 1977; Imig y Morel, 1983; Middlebrooks y Zook, 1983; Morel e Imig, 1987; **conejo**: de Venecia y McMullen, 1994; Cetas et al., 1999; **primate**: Hashikawa et al., 1995; Hackett et al., 1998). Los estudios de transporte axónico en el sistema auditivo se han centrado principalmente en el conejo (de Venecia y McMullen, 1994) y en el mono (Hashikawa et al., 1995). Por ello, en el presente estudio analizamos el sistema tálamo-cortical mediante la inyección de trazadores altamente sensibles y específicos (BDA+DF y DTR). Con estos métodos podemos revelar diferencias laminares y los patrones característicos de cada área, que con los métodos antiguos no se podían discernir.

El desarrollo y mantenimiento de las conexiones tálamo-corticales parece depender de los niveles normales de

excitación de la periferia auditiva. Así, una lesión en la cóclea puede alterar la organización de los mapas corticales en animales adultos (Robertson y Irvin, 1989; Rajan et al., 1993), efecto que resulta más notable cuando la lesión se lleva a cabo en el periodo postnatal temprano (Harrison et al., 1991). Por ello, el presente estudio es el primero que describe el patrón de conexiones de los axones tálamo-corticales auditivos en condiciones normales en ratas y el patrón de distribución de los axones tálamo-corticales tras haberse producido una cocleotomía en el periodo postnatal temprano.

Patrón de distribución de las

conexiones tálamo-corticales en

animales adultos controles

Las conexiones entre el CGM y la corteza auditiva se segregaron en bandas que se extendían a lo largo del eje rostrocaudal. Los resultados de nuestro trabajo corroboran los previos realizados en otras especies (**gato**: Andersen et al., 1980; Merzenich et al., 1982; Huang y Winer, 2000; Stanton y Harrison, 2000; **conejo**: McMullen y de Venecia, 1993; de Venecia y McMullen, 1994; **mono**: Hashikawa et al., 1992). La distribución parcheada de las conexiones tálamo-corticales también es característica de los sistemas visual y somatosensorial (Lorente de Nó, 1922; Hubel y Wiesel, 1972). Esto nos indica que la segregación en bandas de las proyecciones tálamo-corticales está altamente conservada en las diferentes especies estudiadas, y en los distintos sistemas sensoriales. Estos resultados contrastan con la hipótesis de una organización punto a punto propuesta por algunos autores (Bradner y Redies, 1990; Romanski y LeDoux, 1993), ya que la distribución de los axones tálamo-corticales sugiere que este sistema presenta un alto grado de convergencia y divergencia (Merzenich et al., 1982; Merzenich y Jenkins, 1984).

En un análisis más exhaustivo, observamos que las bandas de marcaje tálamo-corticales ocuparon principalmente el área auditiva primaria (Te1) y, además, aparecían pequeñas regiones de marcaje en

el área de asociación (Te3), como se ha descrito previamente (Patterson, 1977; Scheel, 1988; Roger y Arnault, 1989; Romanski y LeDoux, 1993b). Además, observamos que existen similitudes que se mantienen en las diferentes especies. Así en nuestro caso observamos que los parches aparecían separados por zonas de marcaje menos intenso como se ha descrito en el gato (Sousa y Pinto, 1973a; Peterson y Winer, 1988, 1993; Huang y Winer, 2000). Sin embargo, otros parámetros, como el número de bandas o su extensión, no eran idénticos a los resultados de los estudios realizados en gatos (Huang y Winer, 2000), diferencias probablemente debidas a que el cerebro de gato presenta un mayor tamaño y complejidad.

Desarrollo del patrón tálamo-

cortical en animales controles

Actualmente, no se conoce nada acerca del tiempo preciso del desarrollo embrionario de las conexiones tálamo-corticales auditivas en algunas especies (Cant, 1998). Los únicos estudios que existen hasta el momento en rata, se basan en el desarrollo de las conexiones del núcleo coclear (Kandler y Friauf, 1993), y en el desarrollo del colículo inferior (Gabriele et al., 2000a). Estos estudios apuntan que las proyecciones desde el núcleo coclear hasta el colículo inferior se forman entre E15-E17. Entre E18 y P5 se forman las colaterales de los núcleos cocleares y entre P5 y P14 aparecen las estructuras maduras. Las fibras del lemnisco lateral contralateral llegan al colículo inferior alrededor del día E19 y se diferencian entre P4 y P12.

Un estudio realizado en ratón indica que en el día E13.5 las fibras procedentes del colículo inferior empiezan a invadir el cuerpo geniculado medial. Las neuronas del cuerpo geniculado medial proyectan recíproca y específicamente a la corteza cerebral auditiva sobre el día 14.5. A partir de E16.5 hasta P0 se produce un aumento en la complejidad axónica y a partir de P0 continúa el proceso de maduración. La progresión temporal de las conexiones en el caso de las ratas coincide con el desarrollo en el ratón, asumiendo 1 o 2 días de retraso (Gurung y Fritzscht, 2004).

Todas las conexiones entre los núcleos cocleares y el resto de núcleos de la vía auditiva se establecen antes del nacimiento, en ausencia de un patrón de estimulación sensorial (Cant, 1998; Rubel y Fritzscht, 2002). Numerosos estudios indican que la organización inicial de los patrones de proyección en la vía auditiva se pueden originar en ausencia de un estimulación acústica inicial (Kandler y Friauf, 1993; Cant, 1998; Gabriele et al 2000a; Leake et al., 2002; Rubel y Fritzscht, 2002).

Sin embargo, el desarrollo más refinado de la organización de los patrones de proyección en el sistema auditivo dependen de la actividad neural aferente en el recién nacido (Gabriele et al., 2000b; Leake et al, 2002; Rubel y Fritzscht, 2002). De hecho, en el caso del sistema visual, Hübener y Bonhoeffer (1999) demostraron que la actividad espontánea y los gradientes moleculares contribuyen a la formación del patrón inicial que ocurre en ausencia de experiencia visual, por ejemplo, en el caso de la formación de columnas de dominancia ocular. Puede ser que estos mismos mecanismos de desarrollo influyan en la formación de patrones de proyección en el sistema auditivo, antes de comenzar a oír. Evidencias cada vez mayores, sugieren que una descarga rítmica espontánea, similar a la que fue descrita en la retina (Galli y Maffei, 1988; Meister et al., 1991; Wong et al., 1993; Feller et al.,1996,1997), está presente en varios niveles del sistema auditivo antes del comienzo de la audición (Romand y Ehret, 1990; Rübsamen y Schäfer, 1990; Gummer y Mark, 1994; Lippe, 1994, Kotak y Sanes, 1995; Lippe, 1995; Kros et al.,1998; Jones y Jones, 2000).

Patrón de distribución de las

conexiones tálamo-corticales en

animales adultos cocleotomizados en

el periodo postnatal temprano

En estos animales cocleotomizados el patrón de distribución de las conexiones tálamo-corticales en la corteza contralateral a la cóclea lesionada, presentaba alteraciones con respecto a los animales

controles. Concretamente, si bien los axones tálamo-corticales siguen segregándose en bandas de orientación rostrocaudal, se produce una variación con respecto a los animales controles en la localización de las bandas y en la extensión de las mismas (en los animales experimentales las bandas se extienden 3 veces más que en los controles). De este modo, de nuestros resultados podemos inferir que la vía auditiva puede mantener algunos principios básicos de su conectividad aún en ausencia de la actividad neural aferente, como la segregación de algunas proyecciones. Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados en gato (Stanton y Harrison, 2000). Sin embargo, la presencia de anomalías en el patrón indica que el correcto funcionamiento del receptor es necesario para la distribución fina de las conexiones tálamo-corticales.

Estudios realizados en otros sistemas sensoriales, como el somatosensorial, apoyan nuestros resultados. Así, Jensen y Killackey (1987) han demostrado que, tras seccionar el nervio infraorbital, se produce un patrón alterado de las conexiones tálamo-corticales, que sigue organizado en bandas, pero más extensas y amorfas.

En la literatura se puede encontrar una gran cantidad de trabajos sobre la plasticidad de las cortezas somatosensorial, visual y motora. Sin embargo, el estudio de la plasticidad en la corteza cerebral auditiva ha sido un campo poco explorado. El primer trabajo en que se estudió la plasticidad en la corteza cerebral auditiva fue el realizado por Robertson e Irvine (1989) en el cual, tras realizar una lesión periférica unilateral restringida (en la porción de la cóclea sensible a las frecuencias medias-altas) en animales adultos, se observó que la región de la corteza auditiva contralateral a la lesión en la cual tales frecuencias estarían normalmente representadas, fue parcialmente ocupada por la representación de frecuencias adyacentes a las frecuencias que se habían perdido con la lesión. A diferencia de este diseño experimental, en nuestro estudio hemos producido una destrucción masiva de la cóclea, por lo que no quedan zonas cercanas a la lesión que proyecten a la corteza. No obstante, no podemos descartar que en el hemisferio

contralateral a la cóclea lesionada persista alguna representación de frecuencias de los estímulos sonoros, información que provendría de núcleos no alterados por la lesión, a través de las múltiples vías cruzadas, subcorticales y callosa, que existen en la vía auditiva.

Sin embargo, el desarrollo de conexiones precisas en el sistema nervioso central de los mamíferos requiere de la actividad neural aferente, y existen evidencias de que tanto un patrón sincrónico de actividad aferente, como la coincidencia de actividad de la aferencia y la célula diana, son necesarios para la especificación de la conectividad neuronal en algunos sistemas sensoriales, como por ejemplo el visual (ver la revisión de Singer, 1995).

Un estudio realizado en el sistema auditivo mediante ablaciones cocleares en estadios tempranos del desarrollo también apoya esta idea (Gabriele et al., 2000b). Los resultados del mismo apuntan a que la ablación coclear unilateral altera el desarrollo normal de los patrones de segregación de los axones aferentes que al colículo inferior llegan desde el núcleo dorsal del lemnisco lateral (NDLL). Así, en los animales cocleotomizados aparece una asimetría en el patrón de segregación y en la densidad relativa de las proyecciones marcadas en uno y otro colículo, en contraste con la simetría normalmente encontrada en los animales controles. Concretamente, las fibras que llegan desde el NDLL no deprivado (funcional) son capaces de segregarse en bandas en el colículo inferior contralateral, sí deprivado (anormal), mientras que los axones que llegan procedentes del NDLL deprivado (disfuncional) al colículo inferior no deprivado (normal), no se segregan. Estos resultados sugieren que la segregación en bandas de las proyecciones aferentes al colículo inferior parece depender de la actividad presináptica (la actividad en el NDLL). Por el contrario, la normalidad de la actividad aferente parece no ser suficiente para determinar otro de los parámetros del patrón de conexiones, la densidad de las proyecciones, ya que las más densas son las que terminan en el colículo inferior normal desde el NDLL deprivado, mientras que las que acaban en el colículo inferior alterado desde un NDLL no deprivado, son mucho

más escasas. Por ello, estos resultados sugieren que el medio postsináptico (actividad eléctrica de las células del colículo inferior) determina la densidad relativa de las proyecciones a las dianas.

Un estudio realizado en el sistema visual aporta evidencias de que la correlación entre la actividad cortical y la actividad aferente regula el crecimiento y la retracción de las fibras tálamo-corticales (Hata et al., 1999). Este hecho nos indica que la correcta formación de los diferentes aspectos de la organización aferente no se basa simplemente en la cantidad de actividad neural aferente sino en la correlación entre la actividad pre- y postsináptica. De hecho, se ha demostrado que la correlación entre la actividad pre- y postsináptica es necesaria para la correcta segregación de las columnas de dominancia ocular en el desarrollo del sistema visual (Stryker, 1984; Stryker y Harris, 1986; Constantine-Paton et al., 1990; Shatz., 1990), resultados que han sido corroborados en la corteza somatosensorial (Schlaggar et al., 1993).

En nuestro estudio, los terminales de los axones procedentes del núcleo ventral del cuerpo geniculado medial privado presentan alteraciones en su topografía en la corteza cerebral auditiva, concretamente observamos una expansión tangencial del territorio donde las conexiones tálamo-corticales terminan. Así, nuestros resultados sugieren que la topografía de las aferencias a la corteza cerebral auditiva parece depender de la actividad presináptica (actividad en el tálamo). De este modo, nuestros resultados corroboran la hipótesis propuesta por Gabriele et al (2000b), en cuanto a la capacidad de segregación de las aferencias.

Existen evidencias en el sistema visual de que el bloqueo de la actividad neuronal en los gatos recién nacidos o la reducción de la misma altera la morfología de las arborizaciones axónicas retinogeniculadas (ver la revisión de Garraghty y Sur, 1993). Manipulaciones similares también alteran la extensión de las arborizaciones tálamo-corticales y, así, las arborizaciones que reciben información procedente del ojo privado se encogen, mientras que las que proceden del ojo no privado se expanden en la corteza (Antonini y Stryker, 1993a, b). Consistente

con esta expansión de las aferencias tálamo-corticales, las células corticales son dominadas por el ojo no privado (Shatz, 1990; Goodman y Shatz, 1993). Cuando las células postsinápticas se inactivan farmacológicamente, se observa como las respuestas visuales son dominadas por el ojo privado y las arborizaciones procedentes del mismo son más extendidas en la corteza (Reiter y Stryker, 1988; Hata y Stryker, 1994), de este modo, cuando las células corticales están inhibidas las entradas menos activas llegan a ser dominantes. Estos experimentos muestran que la actividad postsináptica en células corticales actúa conjuntamente con la actividad presináptica para modificar la fuerza de las entradas sinápticas y la extensión de las conexiones tálamo-corticales. Así, estos experimentos apuntan que el refinamiento de las conexiones dependiente de la actividad es semejante a un proceso Hebbiano, mediante la coincidencia entre la actividad pre- y postsináptica. Asimismo, en nuestro caso la expansión de las conexiones tálamo-corticales podría ser debida a una alteración en dicho refinamiento, como consecuencia de la falta de actividad neural aferente apropiada en la corteza contralateral a la lesión.

Durante el desarrollo, los axones que se originan o terminan en la corteza cerebral, inicialmente forman ramificaciones y sinapsis exuberantes que se distribuyen difusamente y que, posteriormente, sufren un refinamiento topográfico, desapareciendo una gran cantidad de axones (Innocenti, 1995). La deaferentización periférica puede interferir en este proceso de retracción y/o eliminación de las colaterales axónicas, haciendo que el proceso de eliminación de las mismas no se realice adecuadamente y quedan dispersas en la corteza, ocupando un espacio mayor que en condiciones normales. Esta hipótesis fue sugerida por Levay et al., (1980) para explicar las alteraciones observadas en la segregación de las columnas de dominancia ocular en la corteza visual tras la privación periférica unilateral.

Distribución laminar de los axones tálamo-corticales

La distribución laminar de los axones tálamo-corticales está altamente conservada en las diferentes especies, sistemas sensoriales y áreas corticales (Jones, 1985). El patrón de distribución de los mismos en la corteza cerebral auditiva de todas las especies estudiadas hasta el momento, a excepción de las aves y reptiles, es similar al descrito en el gato, en el cual el principal destino de las conexiones tálamo-corticales son las capas IIIb y IV. Tal patrón ha sido observado en rata, aunque la parte superficial de la capa III recibe menos axones tálamo-corticales que en el gato (Patterson, 1976; Vaughan, 1983).

En los animales controles, nuestros resultados están de acuerdo con descripciones previas en varias especies (**gato**: Sousa-Pinto, 1973a; Niimi y Naito, 1974; Peterson y Winer, 1988, 1993; **conejo**: McMullen y de Venecia, 1993; Cetas et al., 1999; **mono**: Mesulam y Pandya, 1973; Jones y Burton, 1976; **musaraña arborícola**: Casseday et al., 1976; **oposum**: Ebner, 1969; **rata**: Patterson 1976; Vaughan 1983; Vaughan y Peters, 1985; Kimura et al., 2003), y en diferentes sistemas sensoriales (ej. corteza somatosensorial primaria [Ausó et al., 2001]). Al igual que en los animales controles, en los animales deprivados en el periodo postnatal temprano, los axones terminan principalmente en las capas corticales IIIb y IV, algunos fascículos de axones alcanzaba el borde de las capas II y III, y en algunos casos incluso los axones llegaban a la mitad externa de la capa I, y se extendían tangencialmente largas distancias. Como podemos observar además de las dianas convencionales algunos axones terminan en capa I. Las proyecciones desde el núcleo ventral del cuerpo geniculado medial hasta la capa I de la corteza auditiva se han observado también en gatos (Niimi y Naito, 1974), en conejo (McMullen y de Venecia, 1993; Cetas et al., 1999) y en mono (Hashikawa et al., 1995). En rata (Kimura et al., 2003), encuentran axones en capa I ocasionalmente (concretamente en 1/6 de los casos analizados). La distribución

laminar de los axones tálamo-corticales en animales controles no presentaba diferencias con el patrón obtenido en animales cocleotomizados en el periodo postnatal temprano por lo que la información necesaria para especificar las dianas laminares de los axones tálamo-corticales se mantiene tras producirse la cocleotomía aunque se haya producido una pérdida de información auditiva. En el colículo inferior, Gabriele et al (2000b) han apuntado que la capacidad de las proyecciones aferentes para reconocer las zonas terminales apropiadas se mantiene tras producirse una ablación en el periodo postnatal temprano, confirmando de este modo nuestros resultados.

Conexiones córtico-corticales interhemisféricas

Los primeros estudios que abordaban el estudio de las conexiones córtico-corticales usaron métodos de degeneración axónica (Vaughan y Foundas, 1982; Vaughan y Peters, 1985). Sin embargo, en el caso de la rata la identificación de las conexiones córtico-corticales sólo fue posible a partir de la utilización de técnicas más sensibles de trazado retrógrado y anterógrado. Estas técnicas permitieron un estudio más específico, aunque todavía no se conoce una descripción detallada de las conexiones inter- o intrahemisféricas en la corteza cerebral auditiva de la rata. Por ello, nuestro trabajo es el primero en el que se describe el patrón de distribución de las conexiones córtico-corticales con todo detalle en cuanto a su localización en la corteza cerebral auditiva, extensión, y distribución laminar bajo condiciones normales, y tras producirse una deprivación.

Patrón de distribución de las

conexiones callosas en animales

adultos controles

El patrón de distribución de las conexiones callosas en nuestros animales controles cumple los principios básicos de organización de las conexiones callosas, descritos previamente para la rata (Cipollini y Peters, 1979; Zaborsky y Wolf, 1982; Vaughan, 1983), y que se cumplen en la

mayoría de especies animales (**hurón**: Pallas y Wright, 1993; Wallace y Harper, 1997; **gato**: Imig y Brugge, 1978; **macaco**: Morel et al., 1993; **rhesus**: Pandya y Rosene, 1993; **mono búho**: Morel y Kaas, 1992). Sin embargo, en algunos animales lisencefálicos como la ardilla, los axones callosos se distribuyen de manera desigual y no forman bandas (Luethke et al., 1988).

Así, está ampliamente admitido que el marcaje calloso forma campos terminales discontinuos que presentan una organización radial, alternándose regiones de elevada densidad con regiones de baja densidad de marcaje axónico, sugiriendo que el sistema calloso es divergente.

Nuestros resultados corroboran estos resultados parciales, completándolos con datos acerca del número de parches, extensión y distancia entre los mismos.

Al igual que en estudios anteriores (Imig y Brugge, 1978; Kelly y Wong, 1981; Vaughan, 1983; Code y Winer, 1986), los parches vistos en el presente estudio estaban separados por zonas de menor marcaje, lo cual implica que algunas aferencias callosas, si bien de forma reducida o atenuada, se encuentran presentes en las zonas que separan los parches de marcaje. Sin embargo, no se conoce exactamente el significado funcional de las zonas de separación entre los parches. Imig y Brugge (1978) en el gato, describieron que las bandas callosas se superponen con columnas binaurales que han sido definidas fisiológicamente y, de hecho, en el gato las bandas de denso marcaje de terminales callosos coinciden con columnas de sumación y las bandas no callosas se corresponden con columnas de supresión (ver epígrafe "Organización funcional de la corteza auditiva"). Las columnas binaurales se disponen ortogonalmente a las bandas de isofrecuencia en el gato (Imig y Adrian, 1977; Middlebrooks et al., 1980).

Sin embargo, nosotros no podemos comparar directamente nuestras zonas de separación entre los parches con las columnas de supresión ni nuestros parches con las columnas de sumación binaural, ya que no se aportan datos sobre la anchura de las columnas. Quizás conexiones córtico-corticales intrínsecas y/o callosas también rellenen estas zonas de separación. Un patrón comparable de superposición parcial y de proyecciones parcialmente segregadas

ha sido propuesto para el tronco del encéfalo auditivo, concretamente en el NCCI del gato donde, tras producirse una lesión medular, las aferencias forman bandas gruesas de degeneración, separadas por escasas fibras en degeneración (Oliver y Morest, 1984). Quizá la última proyección sea similar a la zona de marcaje más débil que observamos entre los parches.

Desarrollo del patrón calloso en

animales normales

En los estudios sobre el desarrollo del patrón de conexiones callosas se establece que durante los días P0 a P4, la distribución de las proyecciones es difusa y poco uniforme, en el día postnatal 6 o 7 ya empiezan a ser discernibles los rasgos tempranos del patrón calloso maduro (Olavarria y Van Sluyters, 1985) y, en el día postnatal P12, el patrón calloso aparece totalmente establecido en los sistemas auditivo (Gabriel et al., 2000), y visual (Olavarria y Van Sluyters, 1985) de la rata.

Desarrollo del patrón calloso en

animales cocleotomizados en el

periodo postnatal temprano

Las deaferentizaciones realizadas en los días P7 o posteriores permiten que el patrón calloso se desarrolle normalmente ya que en este estadio del desarrollo postnatal dicho patrón ya se encuentra estabilizado, mientras que las cocleotomías realizadas entre P0 y P6 producen anomalías en el desarrollo del patrón calloso ya que se realizan antes de que se establezca el patrón calloso maduro.

Se piensa que la deaferentización periférica unilateral puede alterar el desarrollo de la organización del sistema deaferentizado, por ejemplo, Rothblat y Hages (1982) apuntan que la enucleación antes de los 10 primeros días postnatales estabiliza el desarrollo calloso en un estadio inmaduro. En el sistema auditivo, Pallas et al., (1999) han mostrado que la ablación coclear en el periodo postnatal temprano del hurón producía un patrón de distribución de las conexiones callosas más extendido y más uniforme que en los animales controles,

hallazgo que se parece mucho al patrón de conexiones encontrado en el periodo postnatal temprano del gato (Feng y Brugge, 1983).

Estudios realizados en el sistema visual, (Kingsbury et al., 2002) o en el sistema somatosensorial (Miller et al., 1991), en los cuales se realizan ablaciones talámicas en el periodo postnatal temprano con el fin de reducir las aferencias tálamo-corticales, se observa un considerable aumento de las conexiones córtico-corticales y una expansión de las mismas en los animales que han sufrido la ablación, con respecto a los animales controles. Sin embargo, no sólo encontramos alteraciones en las conexiones callosas cuando producimos una ablación en el tálamo, sino que la ablación en centros inferiores de la vía también provoca cambios en el patrón de distribución de las conexiones callosas. Algunos estudios llevados a cabo en el sistema visual (**rata**: Toldi et al., 1989; **gato**: Lund et al., 1978; Innocenti y Frost, 1979; Berman y Payne, 1983; **hamster**: Rhoades y DellaCroce, 1980; Rhoades y Fish, 1983; **ratón**: Olavarria y Van Sluyters, 1984a) muestran que la enucleación en el periodo postnatal temprano resulta en una expansión de las conexiones callosas.

Por ello, estos resultados demuestran que las entradas talámicas son un importante factor extrínseco en el desarrollo de la conectividad cortical y que para mantener un desarrollo normal de las conexiones córtico-corticales hace falta que las proyecciones tálamo-corticales estén intactas. De este modo, nuestros resultados apoyan la idea de que la experiencia sensorial es importante en la organización y regionalización de la corteza auditiva. Sin embargo, el hecho de que nosotros observemos anomalías en las ratas cocleotomizadas en el periodo postnatal temprano y que no fueron observadas en animales normales durante el desarrollo, nos sugiere que la cocleotomía no altera el patrón calloso simplemente por detener el desarrollo normal.

Patrón de distribución de las conexiones callosas en animales

adultos cocleotomizados en el periodo postnatal temprano

En los animales cocleotomizados, el patrón de distribución de las conexiones callosas en la corteza contralateral a la lesión presentaba alteraciones en comparación con los animales controles, concretamente, en algunos casos aparecían bandas más extensas de lo normal y bandas con una localización claramente anormal.

La capacidad de segregación de las bandas callosas se mantiene en los animales cocleotomizados en el periodo postnatal temprano. El hecho de que la eliminación de las proyecciones que salen de la cóclea en estados tempranos del desarrollo no afecte la segregación (Crowley y Katz, 1999), nos indica que dicha segregación en bandas alternas durante el desarrollo es un proceso específico de la propia corteza. Por ello, puede decirse que, en general, la estructura básica de la corteza cerebral es innata, y que la actividad sería esencial para determinar los aspectos más finos y el correcto mantenimiento de dicha estructura.

Manipulaciones experimentales (cocleotomías, enucleaciones, etc.) o alteraciones patológicas, sólo producen variaciones en determinados parámetros como el ancho, número de bandas, periodicidad y otras alteraciones que, fácilmente detectables, nunca implican la total anulación del patrón calloso (Hubel y Wiesel, 1977; LeVay et al., 1980; Mower et al., 1985; Horton y Hocking, 1998).

Al mismo tiempo que se establece el patrón calloso también se produce el establecimiento de otras aferencias corticales, como las talámicas, de este modo, los axones callosos interactúan con los axones tálamo-corticales. En condiciones normales ambos sistemas de conexiones interactúan correctamente dando lugar a un patrón adulto normal. Sin embargo, en condiciones de privación, las conexiones tálamo-corticales están alteradas funcionalmente ya que no vehiculan la información auditiva habitual. En una competición dependiente de actividad, generalmente se favorecen las entradas activas, haciendo que éstas sean más grandes y más fuertes, mientras que las entradas menos activas se

hacen más pequeñas y débiles (Hata et al., 1999). Lesiones en el tálamo o en la corteza cerebral auditiva en adultos producen una expansión del sistema de conexiones intacto (Vaughan y Foundas, 1982). En nuestro caso, las conexiones callosas van a competir con axones débiles y por lo tanto van a extenderse y van a ocupar localizaciones anormales dentro de la corteza cerebral auditiva.

Debido a la escasez de estudios en el sistema auditivo, nos hemos basado en los datos obtenidos en el sistema visual para apoyar nuestros resultados. De acuerdo con estudios previos llevados a cabo en diferentes especies de roedores (Rhoades y DellaCroce, 1980; Cusick y Lund, 1982; Rothblat y Hayes, 1982; Rhoades y Fish, 1983; Lund et al., 1984; Olavarria y Van Sluyters, 1984a) las principales características o rasgos del patrón calloso presentes en las ratas normales aparecen también en animales enucleados y además pueden ser reconocidos en ratas que han nacido sin ojos (Olavarria y Van Sluyters, 1984a). Así, la información requerida para especificar los rasgos principales del patrón calloso reside en el S.N.C, pero no está claro si es intrínseca o extrínseca a la corteza. Por ejemplo, las conexiones tálamo-corticales pueden proporcionar un conjunto de instrucciones extrínsecas para generar al menos una tosca versión del patrón calloso normal en ratas que nacen sin los dos ojos. Por otra parte, hay alteraciones en el patrón calloso de roedores cuyo desarrollo cursa sin ojos y la naturaleza de las alteraciones nos indica que las aferencias retinianas pueden actuar finamente en el establecimiento de las conexiones callosas. Mientras que es posible que procesos intrínsecos de la corteza puedan estar implicados en la formación de las conexiones callosas, los resultados de estudios previos sugieren que las entradas subcorticales proporcionan información extrínseca para el desarrollo calloso. La idea de que las entradas tálamo-corticales guían el desarrollo calloso también ha sido demostrada en estudios realizados en el sistema somatosensorial (Koralek y Killackey, 1990; Schlaggar y O'leary, 1991). Además, hay evidencias considerables de que características concretas de la organización de la corteza cerebral auditiva, tales como la arealización

de la corteza de mamíferos es controlada en gran medida por las entradas de axones tálamo-corticales (López-Bendito y Molnár).

En el presente estudio, tras producirse una ablación coclear unilateral en animales jóvenes podemos observar cómo en la corteza contralateral a la lesión aparecen bandas con un localización anormal. La aparición de bandas anormales en los animales deaferentizados en el periodo postnatal temprano podría ser debida a la transmisión de un mapa anómalo a través de la vía cóclea-tálamo-corteza. La idea de que un mapa anómalo sea transmitido a la corteza contralateral está apoyado por estudios realizados en el sistema visual (**hamster**: Finlay et al., 1979; Thompson, 1979; Rhoades, 1980; **rata**: Fukuda et al., 1984).

Estas consideraciones junto con la exuberancia de la vía auditiva nos sugieren que tanto en el tálamo como en la corteza que recibe información procedente del oído lesionado puede aparecer un mapa alterado y, que la presencia de bandas callosas anormales es un rasgo característico de dicho mapa. De hecho, ya que las conexiones callosas normalmente se concentran a lo largo de representaciones en el espacio sonoro, la presencia de bandas EE anormales podría corresponderse con una representación aberrante del espacio sonoro en la corteza cerebral auditiva que recibe información procedente de la cóclea lesionada.

La presencia de bandas con localización anormal en la corteza contralateral a la lesión nos hace plantearnos una serie de preguntas.

Se supone que las neuronas de la corteza ipsilateral a la lesión proyectan a las bandas anormales encontradas en el hemisferio contralateral.

¿Cómo pueden axones de células callosas normales ser guiados en un territorio anormal?

La presencia de alteraciones en el patrón calloso de ratas que han sufrido una deaferentización periférica unilateral podría derivar de que el tálamo ipsilateral a la lesión forma una organización normal de las células callosas en el hemisferio homolateral y de algún modo estimula las células de estas regiones para que envíen sus axones al hemisferio opuesto. Sin embargo, las regiones callosas en las cuales estos axones

son enviados podrían ser establecidas por instrucciones anormales que provienen del tálamo deprivado.

El curso de los eventos puede ser el siguiente: Producimos una deaferentización periférica unilateral en el oído izquierdo, por lo que se produce una alteración de la transmisión de la información que llega al tálamo contralateral a la cóclea lesionada. Las proyecciones que llegan a este tálamo están alteradas desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. Como consecuencia de esta alteración los axones no emiten una información auditiva apropiada, por lo que determinan una organización incorrecta de la corteza cerebral auditiva, esta desorganización se refleja tanto en el número como en la localización de las neuronas y de los axones eferentes que se dirigen a la corteza opuesta.

Distribución laminar de los

axones callosos

En cuanto a la distribución laminar de los axones callosos, tanto en los animales controles como en animales cocleotomizados, los axones callosos ocupaban la totalidad de las capas corticales. Los datos obtenidos en nuestro trabajo están en concordancia con estudios previos realizados en gato (Kelly y Wong, 1981; Code y Winer, 1986). Nuestros resultados apuntan que este aspecto de la topografía de los axones callosos se mantiene tras la deprivación, lo que implica que la información necesaria para la especificación laminar de los axones no se altera tras la cocleotomía. Como hemos comentado anteriormente, la capacidad de las proyecciones aferentes para reconocer las zonas terminales apropiadas se mantiene tras la ablación (Gabriele et al., 2000b).

Distribución laminar de las

neuronas retrógradas en el hemisferio

contralateral a la inyección

La identificación de las neuronas callosas se intentó, aunque con modestos resultados, con estudios de degeneración (Pines y Maiman, 1939), sin embargo, su identificación solo ha sido posible gracias a

la introducción de los métodos de transporte retrógrado. Actualmente las neuronas callosas se estudian mediante la utilización del trazador retrógrado HRP solo o conjugado con WGA, o con trazadores fluorescentes en diferentes especies y áreas. Este método complementa las técnicas de degeneración que se empleaban con anterioridad y nos proporciona información específica sobre la organización laminar de las neuronas callosas.

Como regla general en estudios anatómicos, la mayor fracción de neuronas de proyección callosa se encontró en la capa III, el resto de las capas corticales también contribuyen, pero de manera diferente dependiendo de la especie y del área. Concretamente en el caso de la rata tras realizar un estudio previo sobre la localización de las neuronas callosas en la corteza cerebral auditiva mediante inyecciones de HRP, se extrajo que la segunda mayor fracción de neuronas callosas se encontraba en la capa V (Jacobson y Trojanowski, 1974). En nuestro trabajo, la distribución radial de las neuronas marcadas retrógradamente en la corteza contralateral a la inyección corrobora los estudios previos (Jacobson y Trojanowski, 1974; Wallace y Harper, 1997). Las neuronas de proyección callosa se encontraban en las capas II-VI, con una mayor densidad en la capa III y la segunda mayor concentración en capa V. En contraste, en la corteza contralateral a la lesión de los animales cocleotomizados, las neuronas marcadas retrógradamente se encontraron principalmente en las capas III, IV y V. En las capas II y III se produjo una disminución en el número de neuronas marcadas, y en la capa IV y V se produjo un aumento en el número de neuronas marcadas con respecto a los animales controles. Sin embargo, ninguno de los cambios obtenidos es estadísticamente significativo.

Nuestros resultados indican que en los animales cocleotomizados en el periodo postnatal temprano, las neuronas marcadas retrógradamente se localizan en capas más profundas de la corteza cerebral auditiva, este hecho, es interesante desde el punto de vista del origen laminar de las proyecciones corticales, ya que éste es un rasgo fiable en la organización cortical, relacionado con el tiempo en el que las neuronas corticales

nacen (McConnell y Kaznowski, 1991; McConnell, 1992). Los cambios en el origen radial de las proyecciones corticales han sido descritos bajo condiciones experimentales distintas. Así por ejemplo, en los ratones *reeler* (Caviness, 1980), en ratas que han sufrido radiación con rayos X durante la neurogénesis (Jensen y Killackey, 1984), en hurones después de injertos heterocrónicos (McConnel, 1988) o en ratas hipotiroideas (Berbel et al., 1993), neuronas destinadas a una capa dada pueden migrar anormalmente y ser "atrapadas" en una capa diferente. Mecanismos similares podrían explicar los cambios obtenidos en la distribución radial de las conexiones callosas en los animales cocleotomizados. Una posible explicación alternativa a la distribución anormal de las neuronas de proyección callosa, podría estar relacionada con el hecho de que la cocleotomía pueda interferir en el desarrollo normal de las conexiones callosas y en el proceso de estabilización y/o eliminación de los axones callosos transitorios (Innocenti, 1991).

En la literatura, el estudio de la localización de las neuronas callosas en la corteza cerebral auditiva tras haberse realizado una deaferentización periférica unilateral, ha sido un campo poco explorado. Los trabajos existentes, en general, se fundamentan en la corteza visual, así por ejemplo, los trabajos de Olavarria y sus colaboradores (1987) apuntan pequeñas diferencias en la densidad celular de las neuronas callosas en algunas capas, sin embargo, al igual que en nuestro trabajo muestran que las diferencias en la distribución laminar de las mismas no son significativas.

Solapamiento entre las aferencias tálamo-corticales y córtico-corticales en la corteza cerebral auditiva primaria

Estudios previos sobre las proyecciones callosas de la corteza cerebral auditiva han demostrado que, tanto los campos axónicos terminales, como las neuronas de origen de los mismos, forman grupos separados entre sí por zonas de marcaje mucho menos intenso, que se encuentran ocupadas por axones tálamo-corticales (Zaborszky y Wolff, 1982; Vaughan, 1983). En cortes histológicos

paralelos a la superficie cortical, los "parches" de marcaje forman bandas alargadas rostrocaudalmente, perpendiculares a las bandas de isofrecuencia. Los resultados de nuestro estudio en animales controles corroboran los estudios previos.

Un estudio más reciente realizado en mono por Pandya y Rosene (1993) aporta que además, frecuentemente, aparecían pequeñas zonas de solapamiento en la periferia de las bandas tálamo-corticales y callosas. Nuestro trabajo confirma estos resultados parciales, completándolos con un estudio más exhaustivo sobre el grado de solapamiento entre ambos sistemas de conexiones. El presente estudio supera las limitaciones encontradas por Pandya y Rosene, (1993), ya que contamos con dos trazadores de igual sensibilidad que podían ser inyectados en el mismo animal, lo que nos permitió definir con claridad las aferencias talámicas y córtico-corticales y calcular con exactitud el porcentaje de solapamiento entre ambos sistemas de conexiones. Los resultados del estudio cuantitativo apuntan que en los animales controles aparecen pequeñas regiones de solapamiento entre las conexiones tálamo-corticales y córtico-corticales las cuales suponen únicamente un 2% del área total. El hecho de que el grado de superposición fuera limitado entre ambos sistemas de conexiones nos sugiere que las aferencias tálamo-corticales y callosas se encuentran segregadas.

Desde el punto de vista electrofisiológico se han registrado tres tipos de unidades en la corteza cerebral auditiva: (i) aquellas que responden a la estimulación del oído contralateral, pero son inhibidas por la estimulación del ipsilateral (EI: excitación/inhibición) y que son las más numerosas; (ii) las que son excitadas por la estimulación de uno u otro oído, presentando fenómenos de sumación cuando dicha estimulación es bilateral (EE: excitación/excitación) y, por último, (iii) neuronas que responden a la estimulación de solo un oído, pero la estimulación del contralateral no produce la inhibición de las mismas (MO: monoaurales), que son muy poco frecuentes (Imig y Adrian, 1977; Kelly y Sally, 1988). Estos hallazgos han planteado la posibilidad de que la corteza auditiva primaria pudiera contener una

representación sistemática, o mapa, del espacio sonoro, hipótesis que se ha visto apoyada por los resultados de experimentos de lesiones corticales que han demostrado la importancia de la corteza auditiva primaria para la localización espacial de la fuente del sonido (Jenkins y Merzenich, 1984). Sin embargo, existen evidencias de que, a lo largo de un contorno de isofrecuencia, no existe un mapa único y sistemático del acimut de la fuente sonora. Esto es debido a que los dos tipos principales de respuestas binaurales (EI y EE) se encuentran agrupadas formando bandas alternas (Middlebrooks et al., 1980). Debido a ello, lo que existe en cada banda de isofrecuencia es una representación fragmentada del espacio acimutal contralateral, con gradientes locales ocasionales, y discontinuidades entre grupos de neuronas con preferencias acimutales similares (Middlebrooks et al., 1978; Schreiner, 1995).

La naturaleza parcheada de las entradas talámicas y callosas nos sugiere que cada sistema de aferencias influye en módulos corticales específicos. En el caso de la rata no existen estudios electrofisiológicos que nos permitan determinar un significado funcional para esta organización de la corteza cerebral auditiva, sin embargo, estudios electrofisiológicos en gato, demuestran que las bandas de neuronas EE coinciden con bandas de conexiones callosas, mientras que las bandas de neuronas EI presentan conexiones callosas escasas (Imig y Brugge, 1978) y en ellas terminan los axones tálamo-corticales (McMullen y De Venecia, 1993). Otras proyecciones córtico-corticales (Imig y Reale, 1981), y también las aferentes talámicas (Pandya y Rosene, 1993) se interdigitan con las densas bandas de proyección callosa y puede haber competición por el espacio cortical entre los diferentes sistemas de entrada (Feng y Brugge, 1983).

En estudios realizados en conejo se han identificado las regiones EE/EI y se ha demostrado que el tamaño y la orientación de estas regiones son similares a los parches anatómicos marcados por los trazadores anterógrados (Glaser y McMullen, 1980). En el caso de la rata, se ha observado que las propiedades de respuesta binaural y la

distribución espacial de los diferentes tipos de respuesta en la superficie cortical, es similar al encontrado en el gato y en otros mamíferos. Sin embargo, a diferencia del gato, no podemos comparar directamente nuestros parches con las columnas de supresión o de sumación binaural, porque no se conocen datos acerca de la anchura de las mismas.

En el caso de los animales cocleotomizados, el resultado de la organización de las diferentes aferencias en la corteza cerebral auditiva, ha sufrido una alteración y no se forman bandas claramente definidas que se intercalan unas con otras y que poseen aferencias distintas, sino que se ha producido una superposición de ambos sistemas llegando hasta el 23% de su área total. Las bandas callosas y las bandas tálamo-corticales se cruzan unas con otras formando un mosaico de bloques en la corteza cerebral auditiva (Te1), los cuales presentan diferentes entradas aferentes. Las regiones donde se cruzan las bandas reciben entradas talámicas y callosas, las zonas restantes reciben entradas desde uno de los dos sistemas. En las zonas de superposición se ha producido una integración de aferencias de distinta naturaleza, lo que nos sugiere que se ha perdido la segregación de ambos sistemas de conexiones. De este modo, esta nueva organización actuaría funcionalmente de manera distinta. Por ello, cabría suponer que se produciría una alteración en la capacidad de análisis de frecuencias y de la localización espacial de la fuente del sonido.

Una posible explicación a la alteración de la organización de las aferencias a la corteza cerebral auditiva la podemos encontrar en el estudio del establecimiento de las conexiones durante el desarrollo. Como hemos comentado previamente, el establecimiento de las conexiones callosas, coincide temporalmente con el establecimiento de otras aferencias corticales. Este dato apunta a que los axones callosos transitorios pueden actuar críticamente con el resto de aferencias a la corteza. Este proceso en condiciones normales, llevaría a la formación del patrón adulto normal, sin embargo, en condiciones de deprivación, la falta de actividad neural aferente impide el desarrollo normal del patrón maduro. Como consecuencia de la falta de dicha actividad,

la competencia entre las conexiones tálamo-corticales y callosas por el espacio cortical se encuentra alterada. Concretamente, los axones tálamo-corticales no transmiten la información auditiva adecuada, asimismo, los axones callosos compiten con axones débiles y consiguen extenderse y ocupar un mayor espacio. De este modo se solapan con los campos axónicos adyacentes, haciendo que el grado de solapamiento sea mucho mayor que el de los animales controles.

Reciprocidad aferente y eferente

Estudios previos realizados en el gato apuntan a que las células origen de la proyección callosa y los campos terminales forman bandas, columnas o parches en AI (Imig y Brugge, 1978; Kelly y Wong, 1981; Code y Winer, 1983, 1985a). Sin embargo, el grado de reciprocidad tanto en el marcaje retrógrado como en el anterógrado es controvertido.

Kelly y Wong (1981) aportan que algunas bandas de terminales callosas no se solapaban con las células origen de la proyección córtico-cortical en el área auditiva primaria del gato (AI), mientras que Imig et al. (1982) describen una clara correspondencia entre la localización de las terminales callosas y los somas neuronales en la capa III. Code y Winer (1986) indican que aunque las bandas de terminales axónicos callosos con frecuencia se solapan con las neuronas origen de la proyección en la corteza cerebral del gato. También reportan la existencia de células marcadas retrógradamente fuera de los parches y parches de terminales sin células marcadas, de este modo, no siempre se produce un

solapamiento entre ambos. Nuestros resultados están en concordancia con los resultados de Code y Winer (1986) para el gato, completándolos con un estudio cuantitativo del porcentaje de reciprocidad. Con este estudio confirmamos que existe reciprocidad entre las bandas callosas y las neuronas origen de la proyección callosa, sin embargo, esta no es completa.

En cuanto a la reciprocidad entre las proyecciones tálamo-corticales y las neuronas origen de la proyección cortico-talámica, estudios previos afirman que se dan zonas de reciprocidad anterógrada y retrógrada entre la corteza cerebral auditiva y el CGM (Laure y Winer, 1985), aunque se han aportado importantes discontinuidades en el tálamo auditivo (Winer y Laure, 1987). Nuestros resultados apoyan los previos, y basándonos en un estudio cuantitativo del número de neuronas que ocupan los campos terminales axónicos podemos afirmar, que existe una reciprocidad incompleta en la vía tálamo-cortical-talámica.

Nuestros resultados indican que en algunos animales cocleotomizados en el periodo postnatal temprano las neuronas callosas y las neuronas córtico-talámicas se localizan fuera de los terminales axónicos de los axones callosos y de los axones tálamo-corticales respectivamente, rompiéndose por completo la reciprocidad que se mantenía en los animales controles. El hecho de que no se mantenga la reciprocidad supondría una alteración en la conectividad y en los mecanismos de “feed-back” entre el tálamo y la corteza cerebral auditiva.

CONCLUSIONES

- La cocleotomía unilateral periférica realizada en el periodo postnatal que va desde P0 a P6 provoca alteraciones a largo plazo en la organización de las estructuras de la vía auditiva que reciben información neuronal fundamentalmente del oído lesionado. Si la intervención quirúrgica tiene lugar más tarde no existen cambios apreciables. Ello define el **periodo crítico** de mayor sensibilidad a la lesión como el correspondiente a los seis primeros días de vida postnatal, en la rata albina.
- La deaferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano (P0-P6) resulta en alteraciones globales en el desarrollo de la vía auditiva, reflejadas no sólo en alteraciones a largo plazo de la citoarquitectura de sus distintos núcleos, sino también de circuitos neuronales altamente específicos desde el punto de vista neuroquímico, reflejados en cambios en la expresión local de determinadas enzimas (acetilcolinesterasa, citocromo-oxidasa, NADPH-diaforasa), proteínas ligadoras de

calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina) y marcadores neuronales (c-fos), en núcleos concretos de la vía auditiva que recibirían, en circunstancias normales, la información procedente del oído lesionado. Estos fenómenos se extienden hasta la corteza cerebral auditiva contralateral a la lesión, con una afectación laminar, específica, circunscrita a las capas receptoras de aferencias tálamo-corticales.

- En los animales controles, las proyecciones tálamo-corticales consisten en tres parches que se extienden a lo largo del eje rostro-caudal de la corteza cerebral auditiva. Los dos parches más dorsales se sitúan en el área auditiva primaria (Te1) y, el más ventral se extiende en el área auditiva de asociación (Te3). Los axones tálamo-corticales en el hemisferio homolateral al tálamo inyectado ocupan principalmente las capas corticales IIIb-IV. Las neuronas marcadas retrógradamente aparecían principalmente en la capa cortical VI, y algunas neuronas daban colaterales que se dirigían hacia la capa cortical V.
- En los animales inyectados en el tálamo contralateral a la lesión y que por ello, reciben información procedente del oído lesionado, se ha producido una alteración en el patrón de distribución de las conexiones tálamo-corticales auditivas. Concretamente, aparecen dos parches con una localización anormal y con una extensión mucho mayor que en los animales controles. Los axones tálamo-corticales ocupaban principalmente las capas corticales IIIb y IV, al igual que en los animales controles. Nuestros resultados demuestran que la deaferentización unilateral en animales jóvenes produce una alteración del desarrollo del sistema auditivo reflejada en algunos aspectos de la organización de las conexiones tálamo-corticales. Estos resultados implican que aunque la vía auditiva pueda mantener algunos principios básicos de su conectividad aún en ausencia de actividad neural aferente, dicha actividad es necesaria para el desarrollo fino de las conexiones aferentes a la corteza cerebral auditiva.
- El patrón normal de distribución de los axones callosos auditivos observado en los animales controles consiste en tres columnas separadas y bien definidas que se extienden rostrocaudalmente, la dos columnas más dorsales se localizan en el área auditiva primaria (Te1), y la columna ventral se encuentra en el área de asociación (Te3). Los axones callosos se distribuyen en todas las capas corticales. Las neuronas de proyección callosa se localizan básicamente en las capas III y V.
- En los animales cocleotomizados, en la corteza contralateral a la lesión se ha producido una alteración del patrón de distribución de las conexiones callosas auditivas, consistente en una localización anormal de las conexiones callosas y en una extensión dorsoventral de las columnas mayor a la encontrada en los animales controles. Nuestros resultados demuestran que la deaferentización unilateral produce una alteración en la organización de las conexiones córtico-corticales interhemisféricas. Como consecuencia de la ausencia de información sensorial en uno de los dos lados de la vía auditiva, los axones tálamo-corticales del lado afectado son incapaces de inducir el desarrollo normal de características específicas en la corteza auditiva hacia la que proyectan. Estos resultados muestran que las entradas talámicas son un importante factor extrínseco en el desarrollo de la conectividad cortical y que para mantener un desarrollo normal de las conexiones córtico-corticales hace falta que las conexiones tálamo-corticales estén intactas.

- El análisis de la interacción e interdigitación de las aferencias tálamo-corticales y córtico-corticales en la corteza cerebral auditiva, muestra que tras una deaferentización periférica unilateral en el periodo postnatal temprano, se ha producido una superposición entre ambos sistemas de proyecciones. Estos resultados implican que la interacción entre ambos sistemas de conexiones no se produce adecuadamente como consecuencia de la ausencia de actividad periférica, por lo que la segregación normal entre ambos sistemas es imperfecta.



BIBLIOGRAFÍA

1. Adams JC, Mugnaini E (1990). Immunocytochemical evidence for inhibitory and disinhibitory circuits in the superior olive. *Hearing Res.* 49: 281-298.
2. Aitkin LM, Philips SC (1984). Is the inferior colliculus an obligatory relay in the cat auditory system?. *Neurosci Lett* 44: 259-264.
3. Aitkin LM (1986). The auditory midbrain. Structure and function in the central auditory pathway. Clifton, New Jersey: Human Press.
4. Alvarado JC, Fuentes-Santamaria V, Henkel C, Brunson-Bechtold JK (2004). Alterations in calretinin immunostaining in the ferret superior olivary complex alter cochlear abaltion. *J. Comp. Neurol.* 470: 63-79.
5. Andersen RA, Knight PL, Merzenich MM (1980). The thalamocortical and corticothalamic connections of AI, AII, and the anterior auditory field (AAF) in the cat: evidence for two largely segregated systems of connections. *J. Comp. Neurol.* 194(3): 663-701.
6. Anson BJ, Davies J, Duckert LG (1991). Embriology of the ear: Developmental anatomy of the ear. En *Otolaryngology: Basic Sciences and Related Principles*. M.M. Paparella, D.A. Shumrick, J.L. Gluckman, W.L. Meyerhoff. (Eds) Vol. 1, p. 3-21. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
7. Antonini A, Stryker MP (1993). Development of individual geniculocortical arbors in cat striate cortex and effects of binocular impulse blockade. *J. Neurosci.* 13(8): 3549-73.
8. Antonini A, Stryker MP (1993). Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science.* 260(5115): 1819-21.
9. Arai M, Arai R, Sasamoto K, Kani K, Maeda T, Deura S, Jacobowitz DM (1993). Appearance of calretinin-immunoreactive neurons in the upper layers of the rat superior colliculus after eye enucleation. *Brain Res.* 613(2): 341-6.
10. Ard MD, Morest K (1984). Cell death during development of the cochlear and vestibular ganglia of the chick. *Int. J. Devl. Neurosci.* 2 (&): 535-547.
11. Armstrong RC, Montminy MR (1993). Transsynaptic control of gene expression. *Annu Rev Neurosci.* 16: 17-29. Review.
12. Arnault P, Roger M (1990). Ventral temporal cortex in the rat: connections of the secondary auditory areas Te2 and Te3. *J. Comp. Neurol.* 302: 110-123.
13. Aumann TD, Ivanisic J, Horne MK (1988). Arborisation and termination of single motor thalamocortical axons in the rat. *J. Comp. Neurol.* 396(1): 121-30.
14. Ausó E, Cases O, Fouquet C, Camacho M, Garcia-Velasco JV, Gaspar P, Berbel P (2001). Protracted expression of serotonin transporter and altered thalamocortical projections in the barrelfield of hypothyroid rats. *Eur. J. Neurosci.* 14(12): 1968-80
15. Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15: 303-308.
16. BajoVM, Merchán MA, López DE, Roullier E M (1993). Neuronal morphology and efferent projections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 334: 241-262.
17. Banks MI, Smith PH (1992). Intracellular recordings from neurobiotin-labeled cells in brain slices of the rat medial nucleus of the trapezoid body. *J. Neurosci.* 12: 2819-2837.
18. Barker DA, Dreher B (1998). Spatiotemporal patterns of ontogenetic expression of parvalbumin in the superior colliculi of rats and rabbits. *J. Comp. Neurol.* 393(2): 210-30.

19. Bast T, Anson A (1949). The temporal bone and the ear. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
20. Benson CG, Potashner SJ (1990). Retrograde transport of [3H] glycine from the cochlear nucleus to the superior olive in the guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 296(3): 415-26
21. Benson CG, Gross JS; Suneja SK, Potashner SJ (1997). Retrograde transport of (3H) glycine from the cochlear nucleus to the superior olive in the guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 296: 415-426.
22. Berbel P, Guadaño-Ferraz A., Martínez M, Quiles JA, Balboa R, Innocenti GM (1993). Organization of auditory callosal connections in hypothyroid adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 5: 1465-1478.
23. Berman AI (1968). The brain stem of the cat: A cytoarchitectonic atlas with stereotaxic coordinates. Madison, WI: University of Wisconsin Press.
24. Berman NE, Payne BR (1983). Alterations in connections of the corpus callosum following convergent and divergent strabismus. *Brain Res.* 274(2): 201-12.
25. Beyerl BD (1978). Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat. *Brain Res.* 145: 209-223.
26. Blasdel GG, Lund JS (1983). Termination of afferent axons in macaque striate cortex. *J. Neurosci.* (7): 1389-413.
27. Blümcke I, Weruaga E, Kasas S, Hendrickson AE, Celio MR (1994). Discrete reduction patterns of parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in the dorsal lateral geniculate nucleus and the striate cortex of adult macaque monkeys after monocular enucleation. *Vis. Neurosci.* 11(1): 1-11.
28. Boorn RL (1969). The anatomy of the avian auditory system. *Ann. NY. Acad. Sci.* 167: 186-198.
29. Born DE, Rubel EW (1985). Afferent influences on brain stem auditory nuclei of chicken: neuron number and size following cochlea removal. *J. Comp. Neurol.* 231: 435-445.
30. Born DE, Rubel EW (1988). Afferent influences on brain stem auditory nuclei of chicken: presynaptic action potentials regulate protein synthesis in nucleus magnocellularis neurons. *J. Neurosci.* 8: 901-919.
31. Born DE, Durham D, Rubel EW (1991). Afferent influences on brainstem auditory nuclei of chick: nucleus magnocellularis neuronal activity following cochlea removal. *Brain Res.* 557: 37-47.
32. Bornstein MH (1989). Sensitive periods in development: structural characteristics and causal interpretations. *Psychol Bull.* 105(2): 179-97. Review.
33. Bowman EM, Olson CR (1988a). Visual and auditory association areas of the cat's posterior ectosylvian gyrus: cortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 272: 30-42.
34. Bowman EM, Olson CR (1988b). Visual and auditory association areas of the cat's posterior ectosylvian gyrus: thalamic afferents. *J. Comp. Neurol.* 272: 15-29.
35. Bradner S, Redies H (1990). The projection from medial geniculate to field AI in cat: organization in the isofrequency dimension. *J. Neurosci.* 10: 50-61.
36. Bredderman PJ, Wasserman RH (1974). Chemical composition, affinity for calcium, and some related properties of the vitamin D dependent calcium-binding protein. *Biochemistry.* 13(8): 1687-94.
37. Breschet G (1836). *Mem. Acad. Yoy. Med. París.* 5: 229.
38. Brodmann K (1909). *Vergleichende lokalisationslehre der grosshirnrinde in ihren prinzipien dargestellt auf grund des zellenbaues.* Leipzig: JA Barth.
39. Brown MC, Liu TS (1995). Fos-like immunoreactivity in central auditory neurons of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 357: 85-97.
40. Bruce LL, Kingsley J, Nichols DH, Fritsch B (1997). The development of vestibulocochlear efferents and cochlear afferents in mice. *Int. J. Devl. Neurosci.* 15 (4/5): 671-692.

41. Brunjes PC, Borror MJ (1983). Unilateral odor deprivation: differential effects due to time of treatment. *Brain Res Bull.* 11(5): 501-3.
42. Brunjes PC (1994). Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res Brain Res Rev.* 19(1):146-60. Review.
43. Butcher LL (1983). Acetylcholinesterase histochemistry. *Hndbk. Chem. Neuroanat.* 1: 1-49.
44. Caicedo A, Herbert H (1993). Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 328: 377-392.
45. Caicedo A, D'Aldin C, Puel JL, Eybalin M (1996). Distribution of calcium-binding protein immunoreactivities in the guinea pig auditory brainstem. *Ant. Embryol (Berl)* 194: 465-487.
46. Caicedo A, D'Aldin C, Eybalin M, Puel JL (1997). Temporary sensory deprivation changes calcium-binding proteins levels in the auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.* 378: 1-15.
47. Caldford M.B, Aitikin LM (1983). Ascending projections to the medial geniculate body of the cat: evidence for multiple, parallel auditory pathways through the thalamus. *J. Neurosci.* 3: 2365-2380.
48. Callaway EM (1998). Local circuits in primary visual cortex of the macaque monkey. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 47-74. Review.
49. Cant NB, Gaston KC (1982). Pathways connecting the right and left cochlear nuclei. *J. Comp. Neurol.* 212: 313-326.
50. Cant NB (1992). The cochlear nucleus: neuronal types and their synaptic organization. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR, editors. *Springer handbook of auditory research, volumen 1, the mammalian auditory pathway: neuroanatomy.* New York, New York: Springer-Verlag. Páginas: 66-116.
51. Cant NB (1998). Structural development of the mammalian central auditory pathways. In: Rubel ED, Popper AN, Fay RR, editors. *Development of the auditory system.* New York: Springer.
52. Caspary DM, Faingold CL (1989). Non-N-methyl-D-aspartate receptors may mediate ipsilateral excitation at lateral superior olivary synapses. *Brain Res.* 503(1): 83-90.
53. Caspary DM, Finlayson PG (1991). Superior olivary complex: Functional neuropharmacology of the principal cell types. IN: Altschuler RA, Bobbin RP, Clopton BM, Hoffman DW, eds: *Neurobiology of hearing: The central auditory system.* New York: Raven Press. P. 141-161.
54. Casseday JH, Diamond IT, Harting JK (1976). Auditory pathway to the cortex in Tupaia glis. *J. Comp. Neurol.* 166 (3): 303-340.
55. Caviness VS (1980). The development consequences of abnormal cell position in the reeler mouse. *Trends. Neurosci.* 3: 31-33.
56. Cellerino A, Siciliano R, Domenici L, Maffei L (1992). Parvalbumin immunoreactivity: a reliable marker for the effects of monocular deprivation in the rat visual cortex. *Neuroscience.* 51(4): 749-53.
57. Cetas JS, de Venecia RK, McMullen NT (1999). Thalamocortical afferents of Lorente de No: medial geniculate axons that project to primary auditory cortex have collateral branches to layer I. *Brain Res.* 830(1): 203-8.
58. Chernock ML, Winer JA (2001). Organization of bilateral projections from the inferior colliculus to the medial geniculate body. *SFN Abstr.* 27: 930.10.
59. Cipolloni PB, Peters A (1979). The bilaminar and banded distribution of the callosal terminals in the posterior neocortex of the rat. *Brain Res.* 176: 33-47.
60. Cipolloni PB, Peters A (1983). The termination of callosal fibres in the auditory cortex of the rat. A combined Golgi-electron microscope and degeneration study. *J. Neurocytol.* 12: 713-726.
61. Cipolloni PB, Keller A (1989). Thalamocortical synapses with identified neurons in monkey primary

- auditory cortex: a combined Golgi/EM and GABA/peptide immunocytochemistry study. *Brain Res.* 492(1-2): 347-55.
62. Clerehugh WJ, Coleman JR (1990). Anatomy of the rat medial geniculate body, I citoarchitecture, myeloarchitecture, and neocortical connectivity. *J. Comp. Neurol.* 297: 14-31.
 63. Clerehugh WJ, McDonald AJ, Thompson R, Coleman JR (1990). Anatomy of the rat medial geniculate body, II. Dendritic morphology. *J. Comp. Neurol.* 297: 32-54.
 64. Code RA, Winer JA (1983). Heterogeneous origin of commissural neurons in cat primary auditory cortex (AI). *Proc. Soc. Neurosci.* 9, 953 (Abstract).
 65. Code RA, Winer JA (1985a). Commissural neurons in layer III of cat primary auditory cortex (AI): pyramidal and non-pyramidal cell input. *J. Comp. Neurol.* 242: 485-510.
 66. Code RA, Winer JA (1986). Columnar organization and reciprocity of commissural connections in cat primary auditory cortex (AI). *Hear. Res.* 23: 205-222.
 67. Coleman JR, Clerehugh WJ (1987). Sources of projections to subdivisions of the inferior colliculus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 262: 215-26.
 68. Constantine-Paton M, Cline HT, Debski E (1990). Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. Review. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 129-54.
 69. Coogan TA, Burkhalter A (1990). Conserved pattern of corticocortical connections define area hierarchy in rat visual cortex. *Exp. Brain Res.* 80: 49-53.
 70. Coogan TA, Burkhalter A (1993). Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. *J. Neurosci.* 13: 3749-3772.
 71. Corti A (1851). *Zeitsch. F. Wiss. Zool.* III-109.
 72. Crowley JC, Katz LC (1999). Development of ocular dominance columns in the absence of retinal input. *Nature Neurosci.* 2: 1125-30
 73. Cusick CG, Lund RD (1982). Modification of visual callosal projections in rats. *J. Comp. Neurol.* 212(4): 385-98.
 74. Daniel H, Hemart N, Jaillard T, Crepel F (1993). Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3':5'-cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* 5: 1079-1082.
 75. Dawson TM, Snyder SH (1994). Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 14 (9): 5147-5159.
 76. Davis H (1958). Transmission and transduction in the cochlea. *Laryngoscope* 68: 359-382.
 77. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (17): 7797-7801.
 78. de Venecia RK, McMullen NT (1994). Single thalamocortical axons diverge to multiple patches in neonatal auditory cortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 81(1): 135-42.
 79. Diamond IT (1983). Parallel pathways in the auditory, visual and somatic system. In: Macchi G, Rustioni A, Spreafico R, editors. Somatosensory integration in the thalamus. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Publishing Company: 251-272.
 80. Doron NN, LeDoux JE, Semple MN (2002). Redefining the tonotopic core of rat auditory cortex: physiological evidence for a posterior field. *J. Comp. Neurol.* 453: 345-360
 81. Durham D, Woolsey TA (1984). Effects of neonatal whisker lesions on mouse central trigeminal pathways. *J. Comp. Neurol.* 223(3): 424-47.
 82. Ebner FF (1969). A comparison of primitive forebrain organization in metatherian and eutherian mammals. *Ann. New York. Acad. Sci.* 167: 241-257.
 83. Echterler SM (1992). Developmental segregation in the afferent projections to mammalian auditory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6324-6327.
 84. Eggston AA, Wolf D (1947). Embryology of the ear. In

- histopathology of the ear, nose and throat. pp: 37-64. Williams and Wilkins Co, Baltimore, MD.
85. Engström H, Engström B (1978). Structure of hair on the cochlear sensory cells. *Hear. Res.* 1: 49-66.
 86. Farbman AI, Brunjes PC, Rentfro L, Michas J, Ritz S (1988). The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 8(9): 3290-5.
 87. Faye-Lund H (1986). Projection from the inferior colliculus to the superior olivary complex in the albino rat. *Anat. Embryol.* 175: 35-52.
 88. Feller MB, Wellis DP, Stellwagen D, Werblin FS, Shatz CJ (1996). Requirement for cholinergic synaptic transmission in the propagation of spontaneous retinal waves. *Science* 272: 1182-1187.
 89. Feller MB, Butts DA, Aaron HL, Rokhsar DS, Shatz (1997). Dynamic processes shape spatiotemporal properties of retinal waves. *Neuron* 19: 293-306.
 90. Feng JZ, Brugge JF (1983). Postnatal development of auditory callosal connections in the kitten. *J. Comp. Neurol.* 214: 416-426.
 91. Finlay BL, Wilson KG, Schneider GE (1979). Anomalous ipsilateral retinotectal projections in syrian hamsters with early lesions: topography and functional capacity. *J. Comp. Neurol.* 183: 721-740.
 92. Förster C, Illing RB (2000). Plasticity of the auditory brainstem: Cochleotomy-induced changes of calbindin-d28k expression in the rat. *J. Comp. Neurol.* 416: 173-187.
 93. Friauf E, Ostwald J (1988). Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Exp. Brain Res.* 73: 263-84.
 94. Friauf E, Kandler K (1990). Auditory projections to the inferior colliculus of the rat are present by birth. *Neurosci. Lett.* 120: 58-61.
 95. Frost DO, Caviness VS (1980). Radial organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 194: 369-393.
 96. Fuentes-Santamaria V, Alvarado JC, Brunso-Bechtold JK, Henkel C (2003). Upregulation of calretinin immunostaining in the ferret inferior colliculus after cochlear ablation. *J. Comp. Neurol.* 406: 585-596.
 97. Fujii M, Katayama Y, Makiyama Y, Maejima S, Tsubokawa T (1993). Dynamic changes in cytochrome oxidase activity in the rat somatosensory cortex following thalamocortical deafferentation. *Neurol. Res.* 15(6): 384-8.
 98. Fukuda Y, Hsiao CF, Sawai H, Wakakuda K (1984). Retinotopic organization of the expanded ipsilateral projection to the rat's superior colliculus; variations along its rostrocaudal axis. *Brain Res.* 321: 390-395.
 99. Furness DN, Hackney C (1985). Cross-links between stereocilia in guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 18: 177-188.
 100. Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2000a). Development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat: projection from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus. *J. Comp. Neurol.* 416(3): 368-82.
 101. Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel C (2000b). Plasticity in the Development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat after cochlear ablation. *J. Neuroscience.* 20(18): 6939-6949.
 102. Galli L, Maffei L (1988). Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life. *Science* 242: 90-91.
 103. Games KD, Winer JA (1988). Layer V in rat auditory cortex: Projections to the inferior colliculus and contralateral cortex. *Hear. Res.* 34: 1-26.
 104. Garder RK, Leclere SS, Hendry SHC (1996). Regulation of calcium-binding protein immunoreactivity in GABA neurons of macaque primary visual cortex. *Cere. cortex.* 6: 271-287.

105. Garraghty PE, Sur M (1993). Competitive interactions influencing the development of retinal axonal arbors in cat lateral geniculate nucleus. *Physiol. Rev.* 73: 529-545.
106. Garthwaite (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14(2): 60-7. Review.
107. Ghosh A, Greenberg ME (1995). Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 268(5208): 239-47. Review.
108. Glaser EM, McMullen NT (1980). Tonotopic organization and dendrite orientation in primary auditory cortex of the rabbit. *Soc. Neurosci. Abstrat.* 6: 557
109. Glendenning KK, Masterton RB (1983). Acoustic chiasm: efferent projections of the lateral superior olive. *J. Neurosci.* 3: 1521-1537.
110. Glendenning KK, Baker B N (1988). Neuroanatomical distribution of receptors for three potential inhibitory neurotransmitters in the brainstem auditory nuclei of the cat. *J.Comp. Neurol.* 275: 288-308.
111. Glendenning KK, Masterton RB, Baker BN, Wenthold RJ (1991). Acoustic chiasm. III: Nature, distribution, and sources of afferents to the lateral superior olive in the cat. *J. Comp. Neurol.* 310(3): 377-400.
112. Godfrey DA, Park JL, Rabe JR, Dunn JD, Ross CD (1983). Effects of large brain stem lesions on the cholinergic system in the rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 11(2): 133-56.
113. Godfrey DA, Parli JA, Dumn JD, Ross CD (1988). Neurotransmitter microchemistry of the cochlear nucleus and superior olivary complex, in *Auditory Pathway* (Syka J, Masterton RB.,eds) pp. 107-121. Plenum Press. New York.
114. Goldberg JM, Moore RY (1967). Ascending projections of the lateral lemniscus in the cat and monkey. *J. Comp. Neurol.* 129: 143-156.
115. González-Hernández TH, Galindo-Míreles D, Castaneyra-Perdomo A, Ferres-Torres R (1991). Divergent projections of projecting neurons of the inferior colliculus to the medial geniculate body and the contralateral inferior colliculus in the rat. *Hear. Res.* 52: 17-21.
116. González-Hernández T, Mantolan-Sarmiento B, González-González B, Pérez-González H (1996). Sources of GABAergic input to the inferior colliculus of the rat. *J. Comp.Neurol.* 372: 309-326.
117. Gonzalez-Lima F, Cada A (1994). Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: a qualitative and quantitative histochemical study. *Neuroscience.* 63(2): 559-78.
118. Goodman CS, Shatz CJ (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* 72 Suppl: 77-98. Review.
119. Graziosi ME, Tucci E, Barbaresi P, Ugolini G, Manzoni T (1982). Cortico-cortical neurones of somesthetic area SI as studied in the cat with fluorescent retrograde double-labelling. *Neurosci. Lett.* 31: 105-110.
120. Gummer AW, Mark RF (1994). Patterned neural activity in brain stem auditory areas of a prehearing mammal, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *NeuroReport* 5: 685-688.
121. Gurung B, Fritzsche B (2004). Time course of embryonic midbrain and thalamic auditory connection development in mice as revealed by carbocyanine dye tracing. *J. Comp. Neurol.* 479(3): 309-27.
122. Gutierrez C, Cusick, CG (1994). Effects of chronic monocular enucleation on calcium binding proteins calbindin-D28k and parvalbumin in the lateral geniculate nucleus of adult rhesus monkeys. *Brain Research.* 651: 300-310.
123. Hackett TA, Stepniewska I, Kaas JH (1998). Thalamocortical connections of the parabelt auditory cortex in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 400(2): 271-86.
124. Hada Y, Yamada Y, Imamura K, Mataga N, Watanabe Y, Yamamoto M (1999). Effects of monocular

- enucleation on parvalbumin in rat visual system during postnatal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40(11): 2535-45.
125. Harrison, JM., Irving R. (1966b). Ascending connections of the anterior ventral cochlear nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 126: 51-63.
 126. Harrison JM, Feldman ML (1970). Anatomical aspects of the cochlear nucleus and superior olivary complex. *Contrib. Sens. Physiol.* 4: 95-142.
 127. Harrison RV, Nagasawa A, Smith DW, Stanton SG, Mount RJ (1991). Reorganization of auditory cortex after neonatal high frequency cochlear hearing loss. *Hear. Res.* 54: 11-19.
 128. Hashikawa T, Ojiva H, Jones EG (1992). Differential cortical projections from subnuclei of monkey medial complex revealed by anterograde transport of PHA-L. *Soc. Neurosci. Abstr.* 18: 1038.
 129. Hashikawa T, Molinari M, Raussel E, Jones EG (1995). Patchy and laminar terminations of medial geniculate axons in monkey auditory cortex. *J. Comp. Neurol.* 362(2): 195-208.
 130. Hashisaki GT, Rubel EW (1989). Effects of unilateral cochlea removal on anteroventral cochlear nucleus neurons in developing gerbils. *J. Comp. Neurol.* 283(4): 5-73.
 131. Hata Y, Stryker MP (1994). Control of thalamocortical afferent rearrangement by postsynaptic activity in developing visual cortex. *Science.* 265(5179): 1732-5.
 132. Hata Y, Tsumoto T, Stryker MP (1999). Selective pruning of more active afferents when the cat visual cortex is pharmacologically inhibited. *Neuron* 22: 375-381.
 133. Heizmann (1984). Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia.* 40(9): 910-21. Review.
 134. Heffner RS, Heffner HE (1984). Hearing loss in dogs after lesions of the brachium of the inferior colliculus and medial geniculate. *J. Comp. Neurol.* 230(2): 207-17.
 135. Held R (1926). Die cochlea der säuger und der vögel, ihre entwicklung und ihr bau. In "Handbuch der normalen und pathologischen physiologie" (A. Bethe, de.), Vol. II: 467-526.
 136. Helfert RH, Juiz JM, Bledsoe SC Jr, Bonneau JM, Wenthold RJ, Altschuler RA (1992). Patterns of glutamate, glycine, and GABA immunolabeling in four synaptic terminal classes in the lateral superior olive of the guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 323(3): 305-25.
 137. Henkel C, Brunson-Bechtold JK (1993). Laterality of superior olive projections to the inferior colliculus in adult and developing ferret. *J. Comp. Neurol.* 20: 1-5.
 138. Henkel CK, Brunso-Bechtold JK (1998). Calcium-binding proteins and GABA reveal spatial segregation of cell types within the developing lateral superior olivary nucleus of the ferret. *Microsc. Res. Tech.* 41(3): 234-45.
 139. Herbert H, Aschof AF, Ostwald J (1991). Topography of projections from the auditory cortex of the inferior colliculus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 304: 103-122.
 140. Hevner RK, Wong-Riley MT (1990). Regulation of cytochrome oxidase protein levels by functional activity in the macaque monkey visual system. *J Neurosci.* 10(4): 1331-40.
 141. Hofstetter KM, Ehret G (1992). The auditory cortex of the mouse: connections of the ultrasonic field. *J. Comp. Neurol.* 323(3): 370-86
 142. Holscher C (1997). Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *TINS* 20 (7): 298-303.
 143. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vicent SR (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88(7): 2811-4.
 144. Horton JC, Hubel DH (1981). Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature.* 292(5825): 762-4.
 145. Horton JC (1984). Cytochrome oxidase patches: a new cytoarchitectonic feature of monkey visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 304(1119): 199-253.

146. Horton JC, Hocking DR (1998). Effect of early monocular enucleation upon ocular dominance columns and cytochrome oxidase activity in monkey and human visual cortex. *Vis. Neurosci.* 15: 289-303.
147. Huang CL, Winner JA (2000). Auditory thalamocortical projections in the cat: laminar and areal patterns of input. *J. Comp. Neurol.* 427(2): 302-31.
148. Hübener M, Bonhoeffer T (1999). Eyes wide shut. *Nat. Neurosci.* 2: 1043-1045.
149. Hubel DH, Wiesel TN (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J. Physiol.* 206(2): 419-36.
150. Hubel DH, Wiesel TN (1972). Laminar and columnar distribution of geniculate-cortical fibers in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 146(4): 421-50.
151. Hubel DH, Wiesel TN (1977). Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc Roy Soc Lond B.* 198:1-59.
152. Hudspeth AJ, Jacobs R (1979). Stereocilia mediate transduction in vertebrate hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1506-1509.
153. Huffman KL, Molnar Z, Van Dellen A, Kahn DM, Blakemore C, Krubitzer L (1999). Formation of cortical fields on a reduced cortical sheet. *J. Neurosci.* 19: 9939-9952.
154. Humphrey AL, Hendrickson AE (1983). Background and stimulus-induced patterns of high metabolic activity in the visual cortex (area 17) of the squirrel and macaque monkey. *J. Neurosci.* 3(2): 345-58.
155. Hyde GE, Durham D (1990). Cytochrome oxidase response to cochlea removal in chicken auditory brainstem neurons. *J. Comp. Neurol.* 297: 329-339.
156. Imig TJ, Adrian HO (1977). Binaural columns in the primary field (AI) of auditory cortex. *Brain Res.* 138: 241-257.
157. Imig TJ, Brugge JF (1978). Sources and terminations of callosal axons related to binaural and frequency maps in primary auditory cortex of the cat. *J. Comp. Neurol.* 182: 637-660.
158. Imig TJ, Morel A, Kauer CD (1982). Covariation of distributions of callosal cell bodies and callosal axon terminals in layer III of cat primary auditory cortex. *Brain Res.* 251: 157-159.
159. Imig TJ, Morel A (1983). Organization of the thalamocortical auditory system in the cat. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 95-120.
160. Imig TJ, Morel A, (1984). Topographic and cytoarchitectonic organization of thalamic neurons related to their targets in low-, middle-, and high-frequency representations in cat auditory cortex. *J. Comp. Neurol.* 227: 511-539.
161. Innocenti GM, Frost DO (1979). Effects of visual experience on the maturation of the efferent system to the corpus callosum. *Nature.* 280(5719): 231-4.
162. Innocenti GM, Clarke S (1984a). Bilateral transitory projection to visual areas from auditory cortex in kittens. *Dev. Brain Res.* 14: 143-148.
163. Innocenti GM, Clarke S (1984b). The organization of immature callosal connections. *J. Comp. Neurol.* 230: 287-309.
164. Innocenti GM, Frost DO, Illes J (1985). Maturation of visual callosal connections in visually deprived kittens: A challenging critical period. *J. Neurosci.* 5: 255-267.
165. Innocenti GM (1986). General organization of callosal connections in the cerebral cortex. En: *Cerebral Cortex*, vol. X. Jones, E.G. y Peters, A. (eds.). Plenum. New York, pp. 291-353.
166. Innocenti GM (1995). Exuberant development of connections, and its possible permissive roles in cortical evolution. *Trends Neurosci.* 18: 397-402.
167. Innocenti GM (1991). The development of projections from cerebral cortex. *Prog. Sens. Physiol.* 12: 65-114.
168. Irvine DRF (1986). A review of the structure and function of auditory brainstem processing mechanisms. In 'Sensory physiology' (Ottson, D. Ed.). 1-279. Springer-Verlag. Berlin.

169. Ivy GO, Killackey HP (1981). The ontogeny of the distribution of callosal projection neurons in the rat parietal cortex. *J. Comp. Neurol.* 195: 367-389.
170. Jacobson S, Trojanowski JQ (1974). The cells of origin of the corpus callosum in rat, cat and rhesus monkey. *Brain Res.* 74(1): 149-55.
171. Jenkins WM, Masterton RB (1982). Sound localization: effects of unilateral lesion on central auditory system. *J. Neurophysiol.* 52: 819-847.
172. Jenkins WM, Merzenich MM (1984). Role of cat primary auditory cortex for sound-localization behavior. *J. Neurophysiol.* 52: 819-847.
173. Jensen KF, Killackey HP (1984). Subcortical projections from ectopic neocortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 964-968.
174. Jensen KF, Killackey HP (1987). Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. II. The altered morphology of thalamocortical afferents following neonatal infraorbital nerve cut. *J. Neurosci.* 7(11): 3544-53.
175. Jeon CJ, Hartman MK, Mize RR (1997). Glutamate-like immunoreactivity in the cat superior colliculus and visual cortex: further evidence that glutamate is the neurotransmitter of the corticocollicular pathway. *Vis Neurosci.* 14(1): 27-37.
176. Jewett DL, Romano MN (1972). Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Res.* 36: 101-115.
177. Jones EG (1985). *The Thalamus.* New York: Plenum Press.
178. Jones, E. G. (1983). *The Thalamus.* (Emson, P. C. Ed.). Raven Press, New York.
179. Jones EG, Burton H (1976). Cytoarchitecture and somatic sensory connectivity of thalamic nuclei other than the ventrobasal complex in the cat. *J. Comp. Neurol.* 154: 395-432.
180. Jones S, Jones T (2000). Bursting discharge pattern of cochlear ganglion cells in the E15-E-18 chicken embryo. *Assoc. Res. Otolaryngol. Abstr* 23: 248.
181. Kaas JH (1983). What, if anything, is SI? Organization of first somatosensory area of cortex. *Physiol. Rev.* 63 (1): 206-31.
182. Kaas JH (1991). Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 137-67.
183. Kageyama GH, Wong-Riley (1982). Histochemical localization of cytochrome oxidase in the hippocampus: correlation with specific neuronal types and afferent pathways. *Neuroscience.* 7(10): 2337-61.
184. Kageyama GH, Wong-Riley (1986a). Laminar and cellular localization of cytochrome oxidase in the cat striate cortex. *J. Comp. Neurol.* 245(2): 137-59.
185. Kageyama GH, Wong-Riley (1986b). Differential effect of visual deprivation on cytochrome oxidase levels in major cell classes of the cat LGN. *J. Comp. Neurol.* 246(2): 212-37.
186. Kandler K, Friauf E (1993). Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 328(2): 161-84.
187. Keller G, Innocenti GM (1981). Callosal connections of suprasylvian visual areas in the cat. *Neuroscience.* 6: 703-712.
188. Kelly JB, Sally SL (1988). Organization of auditory cortex in the albino rat: Binaural response properties. *J. Neurophysiol.* 59: 1756-1769.
189. Kelly JP, Wong P (1981). Laminar connections of the cat's auditory cortex. *Brain Res.* 212(1): 1-15.
190. Kennedy C, Des Rosiers MH, Jehle JW, Reivich M, Sharpe F, Sokoloff L (1975). Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with (14C)deoxyglucose. *Science.* 187(4179): 850-3.
191. Kimura A, Donishi T, Sakoda T, Hazama M, Tamai Y (2003). Auditory thalamic nuclei projections to the temporal cortex in the rat. *Neuroscience.* 117(4): 1003-16.
192. Kingsbury MA, Lettman NA, Finlay BL (2002). Reduction of early

- thalamic input alters adult corticocortical connectivity. *Develop. Brain Res.* 138: 35-43.
193. Koerber KC, Pfeiffer WB, Kiang NY-S (1996). Spontaneous spike discharges from single units in the cochlear nucleus after destruction of the cochlea. *Exp. Neurol.* 16: 119-130.
 194. Kölliker A (1963). Bau der Schnecke. In "Handbuch der gewebelehre des menschen". Vol.4, p. 708.
 195. Koralek KA, Killackey HP (1990). Callosal projections in rat somatosensory cortex are altered by early removal of afferent input. *Proc Natl Acad. Sci. U S A.* 87(4): 1396-400.
 196. Kotak VC, Sanes DH (1995). Synaptically evoked prolonged depolarizations in the developing auditory system. *J. Neurophysiol.* 74: 1611-1620.
 197. Kovacs KJ (1998). C-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int.* 33(4): 287-97. Review.
 198. Krieg WJS (1946a). Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A. Topography of the cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 84: 221-275.
 199. Krieg WJS (1946b). Connections of the cerebral cortex. II. The albino rat. B. Structure of the cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 84: 277-323.
 200. Krieg WJS (1947). Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. C. Extrinsic connections. *J. Comp. Neurol.* 86: 267-394.
 201. Kristt DA (1979). Development of neocortical circuitry: histochemical localization of acetylcholinesterase in relation to the cell layers of rat somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 186: 1-16.
 202. Kros CJ, Ruppertsberg JP, Rusch A (1998). Expression of a potassium current in inner hair cells during development of hearing in mice. *Nature* 394: 281-284.
 203. Kubke MF, Gauger B, Basu L, Wagner H, Carr CE (1999). Development of calretinin immunoreactivity in the brainstem auditory nuclei of the barn owl (*Tyto alba*). *J. Comp. Neurol.* 415: 189-203.
 204. Kubke MF, Carr CE (2000). Development of the auditory brainstem of birds: comparison between barn owls and chickens. *Hear. Res.* 147: 1-20.
 205. Kulesza RJ Jr, Berrebi AS (2000). Superior paraolivary nucleus of the rat is a GABAergic nucleus. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 1: 255-269.
 206. Kupfer C (1963). Changes in dehydrogenase activity during transneuronal atrophy. *Nature* 200: 80-81.
 207. Kupfer C, P Palmer (1964). Lateral geniculate nucleus: Histological and cytochemical changes following afferent denervation and visual deprivation. *Exp. Neurol.* 9: 400-409.
 208. Land PW (1987). Dependence of cytochrome oxidase activity in the rat lateral geniculate nucleus on retinal innervation. *J. Comp. Neurol.* 262(1): 78-89.
 209. Landry P, Deschenes M (1981). Intracortical arborizations and receptive fields of identified ventrobasal thalamocortical afferents to the primary somatic sensory cortex in the cat. *J. Comp. Neurol.* 199(3): 345-71.
 210. Lane RD, Allan DM, Bennett-Clarke CA, Rhoades RW (1996). Differential age-dependent effects of retinal deafferentation upon calbindin- and parvalbumin-immunoreactive neurons in the superficial layers of the rat's superior colliculus. *Brain Res.* 740(1-2): 208-14.
 211. Larue DT, Winer JA (1985). Patterns of auditory corticothalamic and thalamocortical projections: study with autoradiographic and horseradish peroxidase methods in rat medial geniculate body. *Proc. Soc. Neurosci.* 11, 33 (Abstract).
 212. Leake PA, Snyder RL, Hradek GT (2002). Postnatal refinement of auditory nerve projections to the cochlear nucleus in cats. *J. Comp. Neurol.* 448(1): 6-27.
 213. LeDoux JE, Ruggiero DA, Reis DJ (1985). Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined

- regions of the medial geniculate body in the rat. *J. Comp. Neurol.* 242: 182-213.
214. LeDoux JE, Ruggiero DA, Forest R, Stornetta R, y Reis DJ (1987). Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.* 264: 123-146.
215. Le Vay S, Wiesel TN, Hubel DH (1980). The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J. Comp. Neurol.* 191: 1-51.
216. Lim DJ, Anniko M (1985). Developmental morphology of the mouse inner ear: a scanning electron microscopis observation. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 42: 1-69.
217. Lim DJ, Rueda J (1992). Structural development of the cochlea. En *Development of auditory and vestibular system 2.* (Eds Romand R.) Elsevier Science Publishers. Amsterdam. pp. 33-58.
218. Lippe WR (1994). Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J. Neurosci.* 14: 1486-1495.
219. Lippe WR (1995). Relationship between frequency of spontaneous burst-ing and tonotopic position in the developing avian auditory system. *Brain Res.* 703: 205-213.
220. Lohmann C, Friauf E (1996). Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J. Comp. Neurol.* 367: 90-109.
221. Lopez-Bendito G, Molnar Z (2003). Thalamocortical development: how are we going to get there? *Nat. Rev. Neurosci.* 4(4): 276-89. Review.
222. Lorente de Nó R (1922). La corteza cerebral del ratón (primera contribución de la corteza acustica). *Trab. Lab. Invest. Biol.*, 20; 41-78.
223. Lorente de Nó R (1993). Anatomy of the eighth nerve: The central projection of the endings of the inner ear. *Laryngoscope* 43: 1-38.
224. Lucio RA, García JV, Cerezo JR, Pacheco P, Innocenti GM, Berbel P (1997). The development of auditory callosal connections in normal and hypothyroid rats. *Cer. Cortex* 7: 303-316.
225. Luethke LE, Krubitzer LA, Kaas JH (1988). Cortical connections of electrophysiologically and architectonically defined subdivisions of auditory cortex in squirrels. *J. Comp. Neurol.* 268(2): 181-203.
226. Lund RD, Mitchell DE, Henry GH (1978). Squint-induced modification of callosal connection in cats. *Brain Res.* 144(1): 169-72.
227. Lund RD, Chang FL, Land PW (1984). The development of callosal projections in normal and one-eyed rats. *Brain Res.* 316(1): 139-42.
228. Luo G, Mize RR, Tigges M (1990). Anti-calbindin labeling in the lateral geniculate nucleus of the rhesus monkey and its reduction by enucleation. *Soc. Neurosci. Abstr.* 16: 180.
229. Luo WG, Kong XY, Wong-Riley MT (1991). Effect of monocular enucleation or impulse blockage on gamma-aminobutyric acid and cytochrome oxidase levels in neurons of the adult cat lateral geniculate nucleus. *Vis. Neurosci.* 6(1): 55-68.
230. Luo L, Ryan AF, Saint Marie RL (1999). Cochlear ablation alters acoustically induced c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.* 404(2): 271-83.
231. Macchi G, Bentivoglio M, Molnari M, Minciacchi D (1984). The thalamo-caudate versus thalamo-cortical projections as estudied in the cat with fluorescent retrograde double labeling. *Exp. Brain Res.* 54: 225-239.
232. Malmierca MS, Merchán MA, Oliver DL (1999a). Convergence of dorsal and ventralcochlear nuclei input onto frequency-band laminae of the inferior colliculus, a double tracer study in rat and cat. *ARO Abstr.* 22: 221
233. Malmierca MS, Oliver DL, Merchán MA (1999b). Convergence laminar projectionsfrom dorsal (DCN) and ventral cochlear nucleus (VCN) to inferior colliculus (IC) of rat and cat. *SFN Abstr.* 25: 1418

234. Mast TE (1970). Binaural interaction and contralateral inhibition in dorsal cochlear nucleus of the chinchilla. *J. Neurophysiol.* 33: 108-155.
235. McConnell SK (1988). Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. *J. Neurosci.* 8(3): 945-74.
236. McConnell SK (1992). The control of neuronal identity in the developing cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2(1): 23-7.
237. McConnell SK, Kaznowski CE (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science.* 254(5029): 282-5.
238. McMullen NT, Glaser EM (1982). Morphology and laminar distribution of nonpyramidal neurons in the auditory cortex of the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 208(1): 85-106.
239. McMullen NT, Glaser EM, Tagamets M (1984). Morphometry of spine-free nonpyramidal neurons in rabbit auditory cortex. *J. Comp. Neurol.* 222(3): 383-95.
240. McMullen NT, de Venecia RK (1993). Thalamocortical patches in auditory neocortex. *Brain Res.* 620: 317-322.
241. McMullen NT, Smelser CB, de Venecia RK. A quantitative analysis of parvalbumin neurons in rabbit auditory neocortex. *J. Comp. Neurol.* 349(4): 493-511.
242. Meister M, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ (1991). Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. *Science.* 252: 939-943.
243. Merchán MA, Saldaña E, Plaza I (1994). Dorsal nucleus of the lateral lemniscus in the rat, concentric organization and tonotopic projection to the inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 342: 259-278.
244. Merchán MA, Berbel P (1996). Anatomy of the ventral nucleus of the lateral lemniscus in rats. A nucleus with a concentric laminar organization. *J. Comp. Neurol.* 372: 245-263.
245. Merzenich MM, Knight PL, Roth GL (1975). Representation of cochlea within primary auditory cortex in the cat. *J. Neurophysiol.* 38(2): 231-49.
246. Merzenich MM, Colwell SA, Andersen RA (1982). Auditory forebrain organization: thalamocortical and corticothalamic connections in the auditory system of the cat. In C. N. Woolsey (Ed). *Cortical sensory Organization. Vol III.* Human Clifton NJ. 43-57.
247. Merzenich MM, Kaas JH, Wall J, Nelson RJ, Sur M, Felleman D (1983). Topographic reorganization of somatosensory cortical areas 3b and 1 in adult monkeys following restricted deafferentation. *Neuroscience.* 8(1): 33-55.
248. Merzenich MM, Jenkins WM, Middlebrooks JC (1984). Observations and hypotheses on special organizational features of the central auditory nervous system, in: Edelman GW, Gall WE, Cowan (Eds). *Dynamic Aspects of Neocortical function,* Wiley, New York: 397-424.
249. Mesulam MM, Pandya DN (1973). The projections of the medial geniculate complex within the sylvian fissure of the rhesus monkey. *Brain Res.* 60: 315-333.
250. Meyer G, Gonzalez-Hernández TH, Ferrer-Torres R (1989). The spiny stellate neurons in layer IV of the human auditory cortex. A Golgi study. *Neuroscience* 33: 489-498.
251. Middlebrooks JC, Dykes RW, Merzenich MM (1980). Binaural response-specific bands in primary auditory cortex (AI) of the cat: Topographical organization orthogonal to isofrequency contours. *Brain Res.* 181: 31-48.
252. Middlebrooks JC, Zook JM (1983). Intrinsic organization of the cat's medial geniculate body identified by projections to binaural response-specific bands in the primary auditory cortex. *J. Neurosci.* 3: 203-224.
253. Miller WA, Vogt BA (1984). Heterotopic and homotopic callosal connections in rat visual cortex. *Brain Research* 297: 75-89.
254. Miller B, Windrem MS, Finlay BL (1991). Thalamic ablations and neocortical development: alterations thalamic and callosal connectivity. *Cereb. Cortex.* 1(3): 241-61.

255. Mize RR, Luo Q (1992). Visual deprivation fails to reduce calbindin 28kD or GABA immunoreactivity in the Rhesus monkey superior colliculus. *Visual Neurosci.* 9: 157-168.
256. Mize RR, Luo Q, Tigges M (1992). Monocular enucleation reduces immunoreactivity to the calcium-binding protein calbindin 28 kD in the rhesus monkey lateral geniculate nucleus. *Vis Neurosci.* 9(5): 471-82.
257. Mize RR, Lo FS (2000). Nitric oxide, impulse activity and neurotrophins in visual system development. *Brain Res.* 886: 15-32.
258. Mjaatvedt AE, Wong-Riley MT (1991). Effects of unilateral climbing fibre deafferentation on cytochrome oxidase activity in the developing rat cerebellum. *J. Neurocytol.* 20(1): 2-16.
259. Moore RY, Goldberg JM (1963). Ascending projections of the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 121: 109-135.
260. Moore RY, Goldberg JM (1966). Projections to the inferior colliculus in the monkey. *Exp. Neurol.* 14: 429-438.
261. Moore JK, Moore RY (1971). A comparative study of the superior olivary complex in primate brain. *Folia Primatologica (Basel)* 16: 35-51.
262. Moore JK (1986). Cochlear nuclei: relationship to the auditory nerve. In: Altschuler RA, Hoffmann DW, Robbin RP, editors. *Neurobiology of hearing: the coclea.* New York: Raven Press. pp. 283-301.
263. Moore DR, Kowalchuk NE (1988). Auditory brainstem of the ferret: effects of unilateral cochlear lesions on cochlear nucleus volume and projections to the inferior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 272: 503-515.
264. Moore DR (1990). Auditory brainstem of the ferret: bilateral cochlear lesions in infancy do not affect the number of neurons projecting from the cochlear nucleus to the inferior colliculus. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* 54(1): 125-30.
265. Moore MJ, Caspary DM (1983). Strychnine blocks binaural inhibition in lateral superior olivary neurons. *J. Neurosci.* 3: 237-242.
266. Morel A, Imig TJ (1987). Thalamic projections to fields A, AI, P and VP in the cat auditory cortex. *J. Comp. Neurol.* 265: 119-144.
267. Morel A, Kaas JH (1992). Subdivisions and connections of auditory cortex in owl monkeys. *J. Comp. Neurol.* 318(1): 27-63.
268. Morel A, Garraghty PE, Kaas JH (1993). Tonotopic organization, architectonic fields, and connections of auditory cortex in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 335(3): 437-59.
269. Morest DK (1964). The neural architecture of the medial geniculates body of the cat. *J. Anat (London)* 98: 611-630.
270. Morest DK (1975). Synaptic relationships of Golgi type II cells in the medial geniculate body of the cat. *J. Comp. Neurol.* 162(2): 157-93.
271. Mower GD, Caplan CJ, Christen WG, Duffy FH (1985). Dark rearing prolongs physiological but not anatomical plasticity of the cat visual cortex. *J. Comp. Neurol* 235: 448-66.
272. Neff WD, Diamond IT, Casseday JH (1975). Behavioral studies of auditory discrimination: central nervous system. In: Keidel WD, Neff WD (Eds). *Handbook of Sensory Physiology, Vol V, Part 2, Auditory System. Anatomy, Physiology (Ear).* Berlin: Springer-Verlag: 307-400.
273. Nie F, Wong-Riley MT (1996b). Metabolic and neurochemical plasticity of gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the adult macaque striate cortex following monocular impulse blockade: quantitative electron microscopic analysis. *J. Comp. Neurol.* 370(3): 350-66.
274. Niimi K, Naito F (1974). Cortical projections of the medial geniculate body in the cat. *Exp. Brain Res.* 19: 326-342.
275. Niimi K, Matsuoka H (1979). Thalamocortical organization of the auditory system in the cat studied by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 57: 1-56.

276. Nudo RJ, Masterton RB (1986). Stimulation-induced [14C]-deoxyglucose labeling of synaptic activity in the central auditory system. *J. Comp. Neurol.* 245(4): 553-65.
277. Okoyama S, Moriizumi T, Kitao Y, Kawano J, Kudo M (1995). Anatomical plasticity in the medial superior olive following ablation of the inferior colliculus in neonatal and adult rats. *Hear. Res.* 88(1-2): 71-8.
278. Olavarria JF, Van Sluyters RC (1984a). Callosal connections of the posterior neocortex in normal-eyed, congenitally anophthalmic, and neonatally enucleated mice. *J. Comp. Neurol.* 230(2): 249-68.
279. Olavarria JF, Van Sluyters RC (1985). Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 239(1): 1-26.
280. Olavarria JF, Malach R, Van Sluyters RC (1987). Development of visual callosal connections in neonatally enucleated rats. *J. Comp. Neurol.* 260: 321-348.
281. Olavarria JF, Li CP (1995). Effects of neonatal enucleation on the organization of callosal linkages in striate cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 361: 138-151.
282. Olavarria JF, Van Sluyters RC (1995). Comparison of the patterns of callosal connections in lateral parietal cortex of the rat, mouse and hamster. *Anat. Embryol. (Berl.)* 191(3): 239-42.
283. O'Leary DDM, Stanfield BB, Cowan WM (1981). Evidence that the early postnatal restriction of the cells of origin of the callosal projection is due to the elimination of axonal collaterals rather than to the death of neurons. *Dev. Brain Res.* 1: 607-617.
284. Oliver DL y Hall WC (1978b). The medial geniculate body of the tree shrew, *Tupaia glis*. I. Cytoarchitecture and midbrain connections. *J. Comp. Neurol.* 182: 459-494.
285. Oliver DL (1984). Dorsal cochlear nucleus projections to the inferior colliculus in the cat. A light and electron microscopy study. *J. Comp. Neurol.* 224: 155-172.
286. Oliver DL, Morest DK (1984). The central nucleus of the inferior colliculus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 222(2): 237-64.
287. Oliver DL, Ostapoff EM, Beckius GE (1999). Direct innervation of identified tectothalamic neurons in the inferior colliculus by axons from the cochlear nucleus. *Neuroscience* 93: 643-658.
288. Osen KK, Mugnaini E, Dahl AL, Christiansen AH (1984). Histochemical localization of acetylcholinesterase in the cochlear and superior olivary nuclei. A reappraisal with emphasis on the cochlear granule cell system. *Arch. Ital. Biol.* 122: 169-212.
289. Osen KK (1988). Anatomy of the mammalian cochlear nuclei; a review. In: Syka J, Masterton RB, editors. *Auditory Pathway: Structure and Function*. New York: Plenum Press, pp. 65-75.
290. Ostapoff E-M, Benson CG, Saint Marie RL (1997). GABA- and glycine-immunoreactive projections from the superior olivary complex to the cochlear nucleus in guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 381: 500-512.
291. Ottersen OP, Ben-Ari (1979). Afferent connection to the amygdaloid complex of the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* 187: 401-424.
292. Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1984). Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J. Comp. Neurol.* 229(3): 374-92.
293. Pallas SL, Wright J (1993). Alteration of callosal circuitry in primary auditory cortex by developmentally induced visual inputs. *Soc. Neurosci. Abstr* 19: 675.
294. Pallas SL, Littman T, Moore DR (1999). Cross-modal reorganization of callosal connectivity without altering thalamocortical projections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(15): 8751-6.
295. Pandya DN, Rosene DL (1993). Laminar termination patterns of thalamic, callosal, and association afferents in the primary auditory area

- of the rhesus monkey. *Exp. Neurol.* 119(2): 220-34.
296. Parks TN, Rubel EW (1978). Organization and development of the brainstem auditory nuclei of the chicken: Primary afferent projections. *J. Comp. Neurol.* 180: 439-448.
297. Parks TN, Code RA, Taylor DA, Solum DA, Strauss KI, Jacobowitz DM, Winsky L (1997). Calretinin expression in the chick brainstem auditory nuclei develops and is maintained independently of cochlear nerve input. *J. Comp. Neurol.* 383(1): 112-121.
298. Patterson HA (1976). An anterograde degeneration and retrograde axonal transport study of the cortical projections of the rat medial geniculate body. Ph. D. Thesis, Department of anatomy. Boston university graduate school. Boston, MA.
299. Patterson HA (1977). An anterograde degeneration and retrograde axonal transport study of the cortical projections of the rat medial geniculate body. Doctoral dissertation. Boston University.
300. Paula-Barbosa MM, Feyer PB, Sousa-Pinto A (1975). The association connections of the suprasylvian fringe (SF) and other areas of the cat auditory cortex. *Exp. Brain Res.* 23: 535-554.
301. Paxinos G, Watson CH (1986). The rat brain stereotaxic coordinates. De Academic press, INC. Second Edition.
302. Paxinos G, Watson R (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego.
303. Paxinos G, Kus L, Ashwell, Watson C (1999b). Chemoarchitectonic atlas of the rat forebrain. Academic Press, San Diego.
304. Pearson A, Jacobson A, Van Calcar R, Sauter R (1973). The development of the ear. *Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* Rochester MN.
305. Peterson BA y Winer JA (1988). Projections of the cat medial geniculate body to the primary auditory cortex. *Proc. Soc. Neurosci.* 14: 492.
306. Peterson BA y Winer JA (1993). Laminar and areal patterns of input to auditory cortical fields from the cat medial geniculate body (in preparation).
307. Petralia RS, Wenthold RJ (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318(3): 329-54.
308. Peruzzi D, Bartlett E, Smith PH, Oliver DL (1997). A monosynaptic GABAergic input from the inferior colliculus to the medial geniculate body in rat. *J. Neurosci.* 17: 3766-3777.
309. Philpot BD, Lim JH, Brunjes PC (1997). Activity-dependent regulation of calcium-binding proteins in the developing rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 387(1): 12-26.
310. Pines LJ, Maiman RM (1939). Cells of origin of fibers of corpus callosum: Experimental and pathologic observations. *Arch. Neurol. Psychiatry* 42: 1076-1098.
311. Poirier P, Miljourns S, Lassonde M, Lepore F (1993). Sound localization in acallosal human listeners. *Brain* 116: 53-69.
312. Poirier P, Lepore F, Provençal C, Pito M, Guillemot JP (1995). Binaural noise stimulation of auditory callosal fibers of the cat: Responses to interaural time delays. *Exp. Brain Res.* 104: 30-40.
313. Popelar J, Erre JP, Aran, JM, Cazals Y (1994). Plastic changes in ipsi-contralateral differences of auditory cortex e inferior colliculus evoked potentials after injury to one ear in the adult guinea pig. *Hear. Res.* 72: 125-34.
314. Prast H, Philippu A (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progr. Neurobiol.* 64: 51-68.
315. Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994a). Morphology and spatial distribution of GABAergic neurons in cat primary auditory cortex (AI). *J. Comp. Neurol.* 344: 349-382.
316. Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994b). Laminar distribution and neuronal targets of GABAergic axon terminals in cat primary auditory cortex (AI). *J. Comp. Neurol.* 344: 383-402.

317. Puel JL, Uziel A (1987). Correlative development of cochlear action potential sensitivity, latency, and frequency selectivity. *Brain Res.* 465: 179-188.
318. Rajan R, Irvine DRF, Wise LZ, Heil P (1993). Effect of unilateral partial cochlear lesions in adult cats on the representation of lesioned and unlesioned cochleas in primary auditory cortex. *J. Comp. Neurol.* 338: 17-49.
319. Raussel E, Cusick CG, Taub E, Jones EG (1992). Chronic deafferentation in monkeys differentially affects nociceptive and nonnociceptive pathways distinguished by specific calcium-binding proteins and down-regulates g-aminobutyric acid type A receptors at thalamic levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2571-2575.
320. Reale RA, Imig TJ (1980). Tonotopic organization in auditory cortex of the cat. *J. Comp. Neurol.* 182: 265-291.
321. Reale RA, Brugge JF, Chan JC (1987). Maps of auditory cortex in cats reared after unilateral cochlear ablation in the neonatal period. *Brain Res.* 431(2): 281-90.
322. Recanzone GH, Schreiner CE, Merzenich MM (1993). Plasticity in the frequency representation of primary auditory cortex following discrimination training in adult owl monkeys. *J. Neurosci.* 13(1): 87-103.
323. Reinoso. Suárez F, Roda JM (1985). Topographical organization of the cortical afferent connection to the cortex of the anterior ectosylvian sulcus in the cat. *Exp. Brain. Res.* 59(2): 313-324.
324. Reiter Ho, Stryker MP (1988). Neural plasticity without postsynaptic action potentials: less-active inputs become dominant when kitten visual cortical cells are pharmacologically inhibited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(10): 3623-7.
325. Retzius G (1981). *Das geörorgan der wirbeltiere. I das gehörorgan der fische und amphibien*, Samson and Wallin. Stockholm.
326. Retzius G (1984). *Das geörorgan der wirbeltiere. II das gehörorgan der reptilien, vögen und säugetiere*, Samson and Wallin. Stockholm.
327. Reuss S (1998). Nitric oxide synthase in the auditory brain stem. *Neuroreport.* 9(16): 3643-6.
328. Rhoades RW (1980). Effects of neonatal enucleation on the functional organization of the superior colliculus in the golden hamster. *J. Physiol. (Lond.)* 301: 383-399.
329. Rhoades RW, DellaCroce DD (1980). Neonatal enucleation induces an asymmetric pattern of visual callosal connections in hamsters. *Brain Res.* 202(1): 189-95.
330. Rhoades RW, Fish SE (1983). Bilateral enucleation alters visual callosal but not corticotectal or corticogeniculate projections in hamster. *Exp. Brain Res.* 51: 451-462.
331. Rhode WS, Greenberg S (1992). Physiology of the cochlear nuclei. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR, editors. *Springer Handbook of Auditory Research, volumen 2, The Mammalian Auditory System: Neurophysiology.* New York: Springer-Verlag. pp: 94-152.
332. Rivier F, Clarke S (1997). Cytochrome oxidase, acetylcholinesterase, and NADPH-diaphorase staining in human supratemporal and insular cortex: evidence for multiple auditory areas. *Neuroimage.* 6(4): 288-304.
333. Robertson D, Irvine DRF (1989). Pasticity of frequency organization in auditory cortex of guinea pigs with partial unilateral deafness. *J. Comp. Neurol.* 282: 456-471.
334. Robertson RT, Tijerina AA, Gallivan ME (1985). Transient patterns of acetylcholinesterase activity in visual cortex of the rat: normal development and the effects of neonatal monocular enucleation. *Brain Res.* 353(2): 203-14.
335. Robertson RT (1987). A morphogenic role for transiently expressed acetylcholinesterase in developing thalamocortical systems?. *Neurosci. Lett.* 75: 259-264.
336. Robertson RT, Hanes MA, Yu J (1988). Investigations of the origins of transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex. *Dev. Brain. Res.* 41: 1-23.

337. Robertson RT, Poon H, Duran MR, Yu J (1989). Neonatal enucleations reduce number, size and acetylcholinesterase staining in neurons of the dorsal lateral geniculate nucleus of developing rats. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* 47: 209-225.
338. Robertson RT, Mostamand F, Kageyama GH, Gallardo KA, Yu J (1991). Primary auditory cortex in the rat: transient expression of acetylcholinesterase activity in developing geniculocortical projections. *Brain Res. Dev. Brain. Res.* 58(1): 81-95.
339. Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-molina F, Riveros-Moreno V, Martinez-Murillo R, Polak JM, Moncada S (1994). Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond. B. Biol. Sci.* 345(1312): 175-221.
340. Roger M, Arnault P (1989). Anatomical study of the connections of the primary auditory area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 287: 339-356.
341. Rogers JH (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell. Biol.* 105(3): 1343-53. Erratum in: *J. Cell. Biol.* 1990. 110(5): 1845.
342. Romand R, Ehret G (1990). Development of tonotopy in the inferior colliculus. I. Electrophysiological mapping in house mice. *Dev. Brain Res.* 54: 221-234.
343. Romanski LM, LeDoux (1993a). Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb. Cortex.* 3(6): 515-32.
344. Romanski LM, LeDoux (1993b). Organization of rodent auditory cortex: Anterograde transport of PHA-L from MGv to temporal neocortex. *Cereb. Cortex* 3: 499-514.
345. Rose JE, Galambos R, Hughes JR (1959). Microelectrode studies of the cochlear nuclei of the cat. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 104: 211-251.
346. Roth B, Bruns V (1992). Postnatal development of the rat organ of Corti. I. General morphology, basilar membrane, tectorial membrane and border cells. *Anat. And. Embriol.* 185: 559-569.
347. Rothblat LA, Hayes LL (1982). Age-related changes in the distribution of visual callosal neurons following monocular enucleation in the rat. *Brain Res.* 246(1): 146-9.
348. Rouiller EM, Simm GM, Villa AE, de Ribaupierre Y, de Ribaupierre F (1991). Auditory corticocortical interconnections in the cat: evidence for parallel and hierarchical arrangement of the auditory cortical areas. *Exp. Brain Res.* 86(3): 483-505.
349. Rubel EW, Fritsch B (2002). Auditory system development: primary auditory neurons and their targets. *Annu. Rev. Neurosci.* 25: 51-101. Review.
350. Ruben RJ (1967). Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 104: 417-421.
351. RübSamen R, Schäfer M (1990). Ontogenesis of auditory fovea representation in the inferior colliculus of the Sri Lankan rofous horseshoe bat. *Rhinolophus rouxi.* *J. Comp. Physiol.* 167: 757-769.
352. Rueda J, De la Sen C, Juiz JM, Merchán JA (1987). Neuronal loss in the spiral ganglion of young rats. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 104: 417-421.
353. Rueda J, Cantos R, Jim DJ (1996). Tectorial membrane-organ of Corti relation ship during cochlear development. *Anat. Embriol.* 194: 501-514.
354. Rüttgers K, Aschoff A, Friauf E (1990). Commissural connections between the auditory cortices of the rat. *Brain Research* 509: 71-79.
355. Ryugo DK, Killackey HP (1974). Differential telencephalic projections of the medial and ventral divisions of the medial geniculate body of the rat. *Brain Res.* 82: 173-177.
356. Ryugo DK, Weinberger D (1976). Corticofugal modulation of the medial geniculate body. *Exp. Neurol.* 51: 377-391.

357. Ryugo DK (1992). The auditory nerve: peripheral innervation, cell body morphology and the central projections. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR, editors. Springer handbook of Auditory Research, volumen 1. The Mammalian auditory Pathway: Neuroanatomy. New York: Springer-Verlag, pp: 23-65.
358. Sagar SM, Sharp FR (1993). Early response genes as markers of neuronal activity and growth factor action. *Adv Neurol.* 59: 273-84. Review.
359. Saint-Marie RL, Ostapoff DK, Morest DK, Wenthold R.J (1989). Glycineimmunoreactive projection of the cat lateral superior olive, possible role in brain ear dominance. *J. Comp. Neurol.* 279: 382-396.
360. Saint-Marie RL, Baker RA (1990). Neurotransmitter specific uptake and retrograde transport of ³H-glycine from the inferior colliculus by ipsilateral projections of the superior olivary complex and nuclei of the lateral lemniscus. *Brain Res.* 524: 244-253.
361. Saint Marie RL, Ostapoff E-M, Benson CG, Morest DK, Potasher SJ (1993). Noncochlear projections to the ventral cochlear nucleus: are they mainly inhibitory? In: "The mammalian cochlear nuclei, organization and Function" (Merchán M, Juiz J, Godfrey D., Mugnaini E, Eds.), pp: 121-131. Plenum Press, New York.
362. Saldaña E (1993). Descending projections from the inferior colliculus to the cochlear nuclei in mammals. In "The mammalian cochlear nuclei, organization and Function" (Merchán M, Juiz J, Godfrey D., Mugnaini E, Eds.), pp: 153-166. Plenum Press, New York.
363. Saldaña E, Berrebi AS (2000). Anisotropic organization of the rat superior paraolivary nucleus. *Anat. Embryol.* 202: 265-279.
364. Sally SL, Kelly JB (1988). Organization of auditory cortex in the albino rat: sound frequency. *J. Neurophysiol.* 59: 1627-1638.
365. Sans N, Moniot B, Raymond J (1995). Distribution of calretinin mRNA in the vestibular nuclei of rat and guinea pig and the effects of unilateral labyrinthectomy: a non-radioactive in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 28(1): 1-11. Erratum in: *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 30(1):177-9.
366. Scheel M (1988). Topographic organization of the auditory thalamocortical system in the albino rat. *Anat. Embryol.* 179: 181-190.
367. Scheffler K, Brisson JR, Weisemann R, Magnani JL, Wong WT, Ernst B, Peters T (1997). Application of homonuclear 3D NMR experiments and 1D analogs to study the conformation of sialyl Lewis (x) bound to E-selectin. *J. Biomol. NMR* 9(4): 423-36.
368. Schlaggar BL, O'Leary DDM (1991). Potential of visual cortex to develop an array of functional units unique to somatosensory cortex. *Science.* 252(5012): 1556-60.
369. Schlaggar BL, Fox K, O'Leary DDM (1993). Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex. *Nature* 364: 623-626.
370. Schmidt-Kastner R, Meller D, Eysel UT (1992). Immunohistochemical changes of neuronal calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D-28k following unilateral deafferentation in the rat visual system. *Exp. Neurol.* 117(3): 230-46.
371. Schober W (1986). The rat cortex in stereotaxic coordinates. *J. Hirnforsch.* 27: 121-143.
372. Schofield BR (1995). Projections from the cochlear nucleus to the superior paraolivary nucleus in guinea pigs. *J. Comp. Neurol.* 360(1): 135-49.
373. Schreiner C (1995). Order and disorder in auditory cortical maps. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 489-496.
374. Schwartz ML, Goldman-Rakic (1982). Single cortical neurones have axon collaterals to ipsilateral and contralateral cortex in fetal and adult primates. *Nature* 299: 154-155.
375. Schwartz IR (1992). The superior olivary complex and lateral lemniscal nuclei. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR, editors. Springer handbook of Auditory Research, volumen 1, The

- Mammalian auditory Pathway: Neuroanatomy. New York: Springer-Verlag, pp: 117-167.
376. Segraves MA, Rosenquist AC (1982). Afferent efferent callosal connections of retinotopically defined areas in cat cortex. *J. Neurosci.* 2: 1090-1107.
377. Segraves MA, Innocenti GM (1982). An examination of the projections of cat visual neurons using double retrograde tracers. *Neurosci. Lett.* 10: S442.
378. Sequier JM, Hunziker W, Andressen C, Celio MR (1990). Calbindin D-28k Protein and mRNA Localization in the Rat Brain. *Eur. J. Neurosci.* 2(12): 1118-1126.
379. Shatz CJ (1990). Impulse activity and the patterning of connections during CNS development. *Neuron.* 5(6): 745-56. Review.
380. Shi C, Cassel MD (1997). Cortical, thalamic, and amygdaloid projections of rat temporal cortex. *J. Comp. Neurol* 382: 153-175.
381. Shore SE, Godfrey DA, Helfert RH, Altschuler RA, Bledsoe SC (1992). Connections between the cochlear nuclei in the guinea pig. *Hearing Res.* 62: 16-26.
382. Silver A (1974). The biology of cholinesterases. North Holland Press. Amsterdam.
383. Simmons DD (1994). A transient afferent innervation of outer hair cells in the postnatal cochlea. *Neur.* 370: 551-562.
384. Singer W (1995). Development and plasticity of cortical processing architectures. *Science* 270: 758-764.
385. Snack KE, Code RA (2000). Calretinin expresión in the chick cochlear nucleus after deafferentation. *Brain Res.* 873: 135-139.
386. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977). The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 28(5): 897-916.
387. Sommer I., Lingenhöhl K, Friauf E. (1993). Principal cells of the rat medial nucleus of the trapezoid body, an intracellular in vivo study of their physiology and morphology. *Exp. Brain Res.* 95: 223-239.
388. Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87: 1015-1023.
389. Sousa-Pinto A (1973a). Cortical projections of the medial geniculate body of the cat. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 48: 1-42.
390. Sousa-Pinto A, Reis FF (1975). Selective uptake of (3H)leucine by projection neurons of the cat auditory cortex. *Brain Res.* 85(2): 331-6.
391. Spike RC, Todd AJ, Johnston HM (1993). Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 335(3): 320-33.
392. Stack KE, Code RA (2000). Calretinin expression in the chick cochlear nucleus after deafferentation. *Brain Res.* 873(1): 135-9.
393. Stanton SG, Harrison RV (2000). Projections from the medial geniculate body to primary auditory cortex in neonatally deafened cats. *J. Comp. Neurol.* 426: 117-129.
394. Stryker MP, Strickland SL (1984). Physiological segregation of ocular dominance columns depends on the pattern of afferent electrical activity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25 (suppl): 278.
395. Stryker MP, Harris WJ (1986). Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 6(8): 2117-33.
396. Sukekawa K (1987). Changes of cytochrome oxidase activity in the rat subcortical visual centers after unilateral eye enucleation. *Neurosci. Lett.* 75(2): 127-32.
397. Swanson L.W (1992). Brain maps, Structure of the rat brain. Elsevier, New York.
398. Szabó C (1996). Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system.

- Brain Res Bull. 41(3): 131-41. Review.
399. Tago H, Kimura H, Maeda T (1986). Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat by a sensitive histochemical procedure. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 34(11): 1431-1438.
400. Takada M, Itoh K, Yasui Y, Sugimoto T, Mizuno N (1985). Topographical projections from the posterior thalamic regions to the striatum in the cat, with reference to possible tecto-thalamo-estrial connections. *Exp. Brain Res*. 60: 385-396.
401. Tenorio F, Giraldi-Guimaraes A, Santos HR, Cintra WM, Mendez-Otero R (1998). Eye enucleation alters intracellular distribution of NO synthase in the superior colliculus. *Neuroreport*. 9(1): 145-8.
402. Thompson ID (1979). Changes in the uncrossed retinotectal projection after removal of the other eyes at birth. *Nature* 279: 63-66.
403. Thompson AM, Thompson GC (1991). Projections from the posteroventral cochlear nucleus to the superior olivary complex in guinea pig: light and EM observations with the PHA-L method. *J. Comp. Neurol*. 311(4): 495-508.
404. Thompson AM, Schofield BR (2000). Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc. Res. Tech*. 51(4): 330-54. Review
405. Tigges M, Tigges J (1991). Parvalbumin immunoreactivity of the lateral geniculate nucleus in adult rhesus monkeys after monocular eye enucleation. *Vis. Neurosci*. 6(4): 375-82.
406. Tigges M, Tigges J (1993). Parvalbumin immunoreactivity in the lateral geniculate nucleus of rhesus monkeys raised under monocular and binocular deprivation conditions. *Vis. Neurosci*. 10(6): 1043-53.
407. Toldi J, Wolf JR, Wiese UH (1989). Functional consequences of modification of callosal connections by perinatal enucleation in rat visual cortex. *Neuroscience*. 33(3): 517-24.
408. Trune DR (1982). Influence of neonatal cochlear removal on the development of mouse cochlear nucleus: I. Number, size, and density of its neurons. *J. Comp. Neurol*. 209: 409-424.
409. Tucci DL, Cant NB, Durham D (2001). Effects of conductive hearing loss on gerbil central auditory system activity in silence. *Hear Res*. 155(1-2): 124-32.
410. Valverde F (1986). Intrinsic neocortical organization: some comparative aspects. *Neuroscience* 18: 1-23.
411. Van de Water TR y Ruben RJ (1976). Organogenesis of the ear. En *Scientific Foundation of Otolaryngology*. R. Hinchcliffe and D. Harrison (Eds.) pp. 173-184. YearBook med. Publishers Chicago, IL.
412. Van de Water TR (1983). Embryogenesis of the inner ear: "in vitro studies". En *development of auditory and vestibular system*. R. Romand (Eds.) pp: 337-374. Academic Press. New York.
413. Van der Loos H, Woolsey (1973). Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science*. 179(71): 395-8.
414. Van Essen DC, Maunsell JH (1983). Hierarchical organization and functional streams in the visual cortex. *TINS* 6: 370-375.
415. Van Noort J (1969). The structure and connections of the inferior colliculus. An investigation of the lower auditory system. Doctoral thesis. State University of Leiden. The Netherlands.
416. Vargas CD, Sousa AO, Santos CM, Pereira A Jr, Bernardes RF, Rocha-Miranda CE, Volchan E (2001). Metabolic changes in the nucleus of the optic tract after monocular enucleation as revealed by cytochrome oxidase histochemistry. *J. Neurocytol*. 30(3): 219-30.
417. Vasalva AM (1707). *Imolensi, trajecti ad Rhenum* (cit: Breschet 1836).
418. Vasama JP, Makela JP (1997). Auditory cortical responses in humans

- with profound unilateral sensorineural hearing loss from early childhood. *Hear Res.* 104(1-2): 183-90.
419. Vaughan DW, Foundas S (1982). Synaptic proliferation in the auditory cortex of the young adult rat following callosal lesions. *J. Neurocytol.* 11: 29-51.
420. Vaughan DW (1983). Thalamic and callosal connections of the rat auditory cortex. *Brain Res.* 260: 181-189.
421. Vaughan DW, Peters A (1985). Proliferation of thalamic afferents in cerebral cortex altered by callosal deaf-ferentation. *J. Neurocytol.* 14: 705-716.
422. Vincent SR, Kimura H (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 46(4): 755-84.
423. Vischer MR, Häusler R, Rouiller EM (1994). Distribution of fos-like immunoreactivity in the auditory pathway of the Sprague-Dawley rat elicited by cochlear electrical stimulation. *Neurosci. Res.* 19: 175-185.
424. Waite PM, Taylor PK (1978). Removal of whiskers in young rats causes functional changes in cerebral cortex. *Nature* 274(5671): 600-2.
425. Wallace MN, Harper MS (1997). Callosal connections of the ferret primary auditory cortex. *Exp. Brain. Res.* 116(2): 367-74.
426. Warr, WB. (1966). Fiber degeneration following lesions in the anterior ventral cochlear nucleus of the cat. *Exp. Neurol.* 14: 453-474.
427. Weilbel ER (1957). Zur kenntnis der differenzierungsvorgänge im epithel des ductus cochlearis. *Acta. Anat.* 29: 53-90.
428. Wenthold RJ (1987). Evidence for a glycinergic pathway connecting the two cochlear nuclei: an immunocytochemical and retrograde transport study. *Brain Res.* 415: 183-187.
429. White EL (1989). *Cortical Circuits*, Birkhauser, MA, pp. 223.
430. Wiesel TN, Hubel DH (1963). Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cats lateral geniculate body. *J. Neurophysiol.* 26: 978-93.
431. Wiesel TN, Hubel DH (1974). Ordered arrangement of orientation columns in monkeys lacking visual experience. *J. Comp. Neurol.* 158(3): 307-318.
432. Willard FH, Ryugo D (1983). Anatomy of the central auditory system. In 'The auditory psychobiology of the mouse' (Willot, J. F., Ed.), pp: 201-304.
433. Winer JA, Diamond IT, Raczkowski D (1977). Subdivisions of the auditory cortex of the cat: the retrograde transport of horseradish peroxidase to the medial geniculate body and posterior thalamic nuclei. *J. Comp. Neurol.* 176: 387-418.
434. Winer JA, Morest DK (1983). The medial division of the medial geniculate body of the cat: implications for thalamic organization. *J. Neurosci* 3: 2629-2651.
435. Winer JA (1985). The medial geniculate body of the cat. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 86: 1-97.
436. Winer JA, Larue DT (1987). Patterns of reciprocity in auditory thalamocortical and corticothalamic connectios: Study with horseradish peroxidase and autoradiographic methods in the rat medial geniculate body. *J. Comp. Neurol.* 259: 282-315.
437. Winer JA (1992). The functional architecture of the medial geniculate body and the primary cortex. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR, editors. *Springer handbook of auditory research, volumen 1, the mammalian auditory pathway: neuroanatomy.* New York: Springer-Verlag. Pp: 222-409.
438. Winer JA, Kelly JB, Larue DT (1999b). Neural architecture of the rat medial geniculate body. *Hear. Res.* 130(1-2): 19-41.
439. Winer JA, Sally LS, Larue DT, Kelly (1999c). Origins of medial geniculate body proyections to physiologically defined zones of rat primary auditory cotex. *Hear. Res.* 130: 42-61.
440. Winsky L, Jacobowitz DM (1995). Effects of unilateral cochlea ablation on the distribution of calretinin mRNA and immunoreactivity in the guinea pig ventral cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 354(4): 564-82.

441. Winsky L, Kuznicki J (1996). Antibody recognition of calcium-binding proteins depends on their calcium-binding status. *J Neurochem.* 66(2): 764-71.
442. Wise SP, Jones EG (1976). The organization and postnatal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex. *J. Comp. Neurol.* 168: 313-344.
443. Wong RO, Meister M, Shatz CJ (1993). Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* 11: 923-938.
444. Wong-Riley MTT (1976). Endogenous peroxidatic activity in brain stem neurons as demonstrated by their staining with diaminobenzidine in normal squirrel monkey. *Brain Res.* 108: 257-77.
445. Wong-Riley MTT, Merzenich MM, Leake PA (1978). Changes in endogenous enzymatic reactivity to DAB induced by neuronal inactivity. *Brain Res.* 141: 185-92.
446. Wong-Riley M (1979). Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res.* 171: 11-28.
447. Wong-Riley MTT, Welt C (1980). Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2333-2338.
448. Wong-Riley M, Riley DA (1983). The effect of impulse blockage on cytochrome oxidase activity in the cat visual system. *Brain Res.* 261(2): 185-93.
449. Wong-Riley M, Carroll EW (1984). Effect of impulse blockage on cytochrome oxidase activity in monkey visual system. *Nature.* 307(5948): 262-4.
450. Wong-Riley MT, Norton TT (1988). Histochemical localization of cytochrome oxidase activity in the visual system of the tree shrew: normal patterns and the effect of retinal impulse blockage. *J. Comp. Neurol.* 272(4): 562-78.
451. Wong-Riley MT, Trusk TC, Tripathi SC, Hoppe DA (1989). Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-rich zones in the macaque striate cortex: II. Quantitative electron-microscopic (EM) analysis of neuropil. *Vis. Neurosci.* 2(5): 499-514.
452. Wong-Riley MT, Trusk TC, Kaboord W, Huang Z (1994). Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-poor interpuffs in the macaque striate cortex: quantitative EM analysis of neurons. *J. Neurocytol.* 23(9): 533-53.
453. Woolf NK, Sharp FR, Davidson TM, Ryan AF (1983). Cochlear and middle ear effects on metabolism in the central auditory pathway during silence: A 2-deoxyglucose study. *Brain Res.* 274: 119-127.
454. Wu SH, Kelly JB (1992). Binaural interaction in the lateral superior olive: time difference sensitivity studied in mouse brain slice. *J. Neurophysiol.* 68(4): 1151-9.
455. Yasui Y, Itoh K, Sugimoto T, Kaneko T, Mizuno N (1987). Thalamocortical and thalamo-amygdaloid projections from the parvicellular division of the posteromedial ventral nucleus in the cat. *J. Comp. Neurol.* 257: 253-268.
456. Yin TCT, Chan JCK (1990). Interaural time sensitivity in medial superior olive of cat. *J. Neurophysiol.* 64: 465-488.
457. Yip VS, Zhang WP, Woolsey TA, Lowry OH (1987). Quantitative histochemical and microchemical changes in the adult mouse central nervous system after section of the infraorbital and optic nerves. *Brain Res.* 406(1-2): 157-70.
458. Young ED, Brownell WE (1976). Responses to tones and noise of single cells in dorsal cochlear nucleus of unanesthetized cats. *J. Neurophysiol.* 39: 282-300.
459. Young ED, Schofner WP, White JA, Robert JM, Voigt HF (1988a). Response properties of cochlear nucleus neurons in relationship to physiological mechanisms. In "Auditory Function. Neurobiological Bases of Hearing" (Edelman GM, Gall WE, Cowan WM. Eds), pp. 277-312. Wiley, New York.

460. Zaborszky L, Wolff JR (1982). Distribution patterns e Individual variations of callosal connections in the albino rat. *Anat. Embryol.* 165: 213-232.
461. Zettel ML, Frisina RD, Haider SE, O'Neill WE (1997). Age-related changes in calbindin D-28k and calretinin immunoreactivity in the inferior colliculus of CBA/CaJ and C57Bl/6 mice. *J Comp Neurol.* 386(1): 92-110.
462. Zhang CH, Granstrom L, Wong-Riley M (1996). Deafferentation leads to a down-regulation of nitric oxide synthase in the rat visual system. *Neurosci. Lett.* 211(1): 61-4.
464. Zilles K, Zilles B, Schleicher A (1980). A quantitative approach to cytoarchitectonics. VI. The areal pattern of the cortex of the albino rat. *Anat. Embryol.* 159: 335-360.
465. Zilles K (1985). The cortex of the rat. A stereotaxic atlas. Springer-Verlag, Berlín, New York.
466. Zilles K, Wree A (1985). A real and laminar structure of the rat cortex. En *The rat Nervous system*, de Paxinos (ed). Vol. 1. Academic Press. Sydney, New York, pp: 375-415.

