

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Cirugía II  
(Otorrinolaringología)**



**LOS AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS EN LA  
PREVENCIÓN DE LA SORDERA EXPERIMENTAL  
INDUCIDA POR EL ÁCIDO KAÍNICO EN LA RATA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

Jesús San Román Carbajo

Bajo la dirección de los doctores

Pablo Gil Loyzaga

Joaquín Poch Broto

**Madrid, 2001**

**ISBN: 84-669-2084-6**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.  
FACULTAD DE MEDICINA.

**LOS AGONISTAS DOPAMINERGICOS EN LA  
PREVENCION DE LA SORDERA  
EXPERIMENTAL INDUCIDA POR ACIDO  
KAINICO EN LA RATA.**

**Memoria realizada para la obtención del grado de Doctor en Medicina  
por D. Jesús San Román Carbajo.**

Jesús San Román Carbajo

Vº. Bº. del Director

Vº. Bº. del Director

Prof. Dr. Pablo Gil Loyzaga

Prof. Dr. Joaquín Poch Broto

**Madrid, 2001**

Prof. Dr. Pablo Gil-Loyzaga

**CERTIFICA**

Prof. Dr. Joaquín Poch Broto

**CERTIFICA**

Esta memoria de Tesis Doctoral ha sido financiada por una Ayuda a la Investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (F.I.S. 98/0732)

## **AGRADECIMIENTOS**

Pido disculpas de antemano si alguien no se ve reflejado como lo mereciera, o piense que no están los que debieran estar, confío en que atribuya estos olvidos a pérdidas de memoria sin mala intención, y a pesar de ello espero no olvidarme de los que realmente fueron importantes para el inicio, desarrollo y conclusión de esta tesis.

Me empujó a la investigación el Prof. Poch Broto, que junto con el Prof. Gil Loyzaga intuyeron en mi capacidades científicas que yo desconocía. Comencé este trabajo cuando realizaba el segundo año de Residencia en la especialidad de Otorrinolaringología. Del Prof. Poch Broto tengo siempre el recuerdo de su impagable preocupación por mi futuro y por la finalización de mi tesis doctoral; a él le debo mi actual situación y a él le dedico un merecido recuerdo. Debo decir, en honor a lo que es verdad, que el Prof. Gil Loyzaga es la persona que más ha confiado en mi y que más oportunidades me ha dado a pesar de las idas y venidas por el laboratorio, después de finalizar mi especialidad; para él mi sincero agradecimiento, con la certeza de que me ayudará a resolver cualquier duda sobre el oído interno y su funcionamiento.

De las buenas relaciones con las profesoras Angeles Ibáñez y Mariví Bartolomé y la Dra. Angeles Vicente he sacado su preocupación por lo bien hecho, que sigan conservando cada una sus características, la Dra. Ibáñez su buen humor y revolucionando el laboratorio, la Dra. Bartolomé con su carácter, sus orientaciones, sus reprimendas y siendo el alma y el guardián del mismo y la Dra. Vicente con su sonrisa, su cuarto de HPLC y su buena disposición a ayudarme siempre y cuando por mi parte se lo demandé. Siempre estaré dispuesto a prestarles mi colaboración.

Del Dr. Francisco Carricondo poco puedo decir que los que le conocen no sepan, no es el que más sabe de la fisiología del oído interno en el mundo, pero sabe mucho; no es profesor y sin embargo da clases y las da muy bien, y además sabe arreglar enchufes y muchas más cosas. Su ausencia se nota en el laboratorio, así como su presencia; con él he compartido buenos y malos momentos, sobre todo en la pequeña sección de Electrofisiología, cuando éramos tres y cuatro personas, y cuando las relaciones allí dentro no eran lo buenas que son últimamente; para él es mi agradecimiento y mi amistad, con la seguridad de que ha de ser para mucho tiempo, y esperando que el tiempo le reconozca lo que por méritos propios le corresponde.

No me he de olvidar de las técnicas de laboratorio Teresa Rodríguez, Encarna Muñoz y Mabel Alonso, que en tantas ocasiones me han ayudado en todas aquellas

labores que yo desconocía dentro del laboratorio, agradezco su colaboración y su buena disposición, sabiendo que sin su ayuda parte de este trabajo nunca se podría haber completado.

Guardo también un buen recuerdo de las personas que se han ido incorporando recientemente al laboratorio Lorena Maestre, Sofía Martín-Serrano y Viki Moneo, y espero que lleguen a ser doctoras y que sigan siendo la alegría del laboratorio. Para ellas tres es mi recuerdo y mi agradecimiento por las buenas veladas y las risas que tuvimos, sobre todo a las horas de las comidas, y que sigan sin perder su buen humor.

Eduardo del Castillo, con él he tenido mayor contacto que con el resto de compañeros de la residencia y además me ha tocado trabajar con él en el laboratorio; se que es incondicional e incansable y espero seguir con esta buena relación en el futuro como otorrinolaringólogo o como investigador.

Agradezco la acogida que he tenido en los diferentes servicios de Otorrinolaringología por los que he pasado en Madrid, Albacete y Ponferrada; al Dr. Carlos Almodovar por su confianza en mi, a D. Manuel Tapia por su meditada decisión en mi favor y en especial a la Dra. Martín Villares, a quién debo mi actual situación y a la que siempre estaré agradecido.

También estoy agradecido a mis padres y hermanos, a quienes debo lo que soy, y de una manera muy especial a mi mujer, Carolina, que siempre me ha apoyado, que me aguanta y la que desde que comencé esta Tesis Doctoral ha sabido de las dificultades para realizarla y finalizarla; con ella vivo, junto a ella quisiera envejecer y a ella, y a quién esperábamos, dedico todo este trabajo.

## **INDICE**

## **INTRODUCCION**

<b>GENERALIDADES</b>	13
El sonido	14
<b><u>ANATOMIA DEL SISTEMA AUDITIVO</u></b>	
Oído externo	16
Oído medio	17
Oído interno	23
Laberinto anterior	
Cóclea ósea	24
Cóclea membranosa	26
Organo de Corti	29
Células ciliadas	31
<b>INERVACION DE LA COCLEA</b>	36
Sistema aferente	36
Sistema eferente	38
Inervación simpática	41
Sinapsis en el órgano de Corti	42
<b>VIA AUDITIVA ASCENDENTE</b>	46
<b><u>FISIOLOGIA DEL SISTEMA AUDITIVO</u></b>	48
<b>DEL OIDO EXTERNO</b>	48
<b>DEL OIDO MEDIO</b>	49
Fisiología de la trompa de Eustaquio	56
<b>DEL RECEPTOR AUDITIVO</b>	57
Mecánica del receptor auditivo	58
Micromecánica coclear	62
Transducción en las células ciliadas	65
<b><u>SUSTANCIAS NEUROACTIVAS DE LA COCLEA</u></b>	74
<b>NEUROTRANSMISORES DE LA CELULA CILIADA INTERNA</b>	74
Glutamato monosódico	75
Ciclo glutamato-glutamina	75
Receptores glutamatérgicos	78
Ionotrópicos	78
Metabotrópicos	83
Acido kaínico	87

<b>NEUROTRANSMISORES DE LA VIA EFERENTE</b>	90
Acetil-colina	92
Dopamina	94
Serotonina	98
Acido gamma-amino-butírico	100
Encefalinas y dinorfinas	102
Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)	104
<b>NEUROTRANSMISORES DE LA CELULA CILIADA EXTERNA</b>	105
<b><u>ACTIVIDAD ELECTRICA COCLEAR</u></b>	107
<b>POTENCIALES AUDITIVOS</b>	108
Potencial Endococlear	108
Potenciales Evocados	109
Electrococleografía	110
Potencial Microfónico Coclear (MC)	110
Potencial de Sumación (PS)	111
Potencial de Acción Compuesto (PAC)	112
Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral	115
<b><u>JUSTIFICACION</u></b>	117
<b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b>	
Animales de experimentación	121
Fármacos utilizados	121
Grupos de experimentación	123
Vía de administración de fármacos	126
Técnica de perfusión intracoclear	126
Anestesia	127
Perilinfia artificial	128
Equipo de electrofisiología	128
Estudio electrofisiológico	130
Material de estudio morfológico	132
Material histológico	132
Estudio morfológico	133

<b><u>RESULTADOS</u></b>	135
Del grupo control	137
Del grupo del ácido kaínico y de los agonistas de la dopamina	142
Bromocriptina	147
Apomorfina	149
SKF 77434	152
Del grupo control antes de perfundir perilinfa (Vehículos)	155
<b><u>DISCUSION</u></b>	165
Modelo experimental de sordera	166
Animales de experimentación	166
Efectos derivados de la administración de neurotóxicos	167
Modelo experimental de protección	173
Protección derivada de la administración de agonistas de la dopamina.	
Análisis de los resultados	178
<b><u>INTERES CLINICO-EXPERIMENTAL DE LOS RESULTADOS</u></b>	189
<b><u>APLICACIONES CLINICAS DEL ESTUDIO</u></b>	196
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	200
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	203

# **INTRODUCCION**

## **GENERALIDADES.**

El sentido del oído, o audición, es una capacidad sensorial que han desarrollado los insectos y los vertebrados. Todos los vertebrados presentan en su cabeza órganos sensoriales cuya misión es el mantenimiento del equilibrio, además los vertebrados superiores presentan un complemento de este laberinto destinado a la audición, la cóclea; desde el punto de vista evolutivo la función primitiva es el equilibrio y la función auditiva es mucho más moderna, filogénicamente. La audición y la visión son los sentidos fundamentales para la relación de los animales con su entorno físico, lo que les permite buscar alimento, escapar de los depredadores, buscar pareja y comunicarse socialmente.

El sentido del oído nos capacita a los humanos para el aprendizaje, la comprensión y el desarrollo del lenguaje, indispensable para la comunicación y para el progreso de nuestra propia cultura; debemos tener en cuenta que los conceptos y criterios que van conformando la personalidad y la formación cultural, llegan en su mayoría por vía auditiva. El hombre seguramente inventó la palabra en los albores de su evolución filogénica, y al tiempo que esta se producía aprendió a modular el aliento al espirar y a utilizar distintas modulaciones del sonido como símbolos establecidos de objetos materiales, de diferentes acciones y de conceptos abstractos. Así aprendió a codificar los sonidos modulados en señales audibles que podían ser traducidas a sus sonidos correspondientes.

La audición es el resultado funcional de la actividad del sistema auditivo, que posee una organización extremadamente compleja. Este sistema inicia su función mediante el órgano de Corti, captando las vibraciones de las moléculas en un rango determinado (sonidos), que se producen en el medio en el que se desenvuelve el sujeto, a continuación las analiza e integra con informaciones recibidas mediante la vía

auditiva. La integración con las informaciones recibidas por el resto de los sentidos se realiza en el nivel cortical, lo que permite elaborar un esquema general del entorno.

### **EL SONIDO.**

El sonido, que es el hecho fundamental de la audición, es un fenómeno ondulatorio (ondas sinusoidales), que se puede definir en función de unos parámetros como son su **frecuencia**, grave o aguda, medida en hertzios (Hz) y su **intensidad**, débil o fuerte, que se mide en decibelios (dB), y que se produce al modificarse las características del medio (presión, temperatura, campo eléctrico, campo magnético), o al producirse en este medio deformaciones elásticas, con lo que se genera un potencial interno elevado que sobrepasa la tendencia al equilibrio en dicho medio, originándose una perturbación que llega a desplazar a las partículas de esta situación de equilibrio. Superado este punto hay tendencia a recuperar de nuevo la situación de equilibrio, generándose de esta manera un movimiento armónico (Tonndorf, 1987). Cada partícula, al desplazarse, actúa sobre la vecina y esta sobre la siguiente, transmitiéndose el movimiento de cada partícula en una determinada dirección. Es imprescindible la existencia de partículas para que se pueda transmitir un sonido, de ahí que se propaguen por el aire (medio gaseoso), en el agua (medio líquido), y a través de los sólidos, pero no se pueden transmitir en el vacío.

En la naturaleza los sonidos habituales no son de frecuencias únicas, sino que se trata de sonidos complejos formados por la unión de múltiples frecuencias simples, que el sistema auditivo se encargará de descomponerlos en sus frecuencias únicas, a nivel del receptor auditivo, y de analizarlos en las vías de conducción central y en la corteza auditiva (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a).

La velocidad de transmisión del sonido varía según el medio del que se trate y así, en el aire, el sonido se transmite a una velocidad de 340 m/s, en el agua lo hace a una

velocidad de 1500 m/s y a través de los sólidos la propagación es a 3000 m/s.

Los sonidos que impresionan el oído son debidos al efecto de la vibración del aire, y esta vibración se debe a un desplazamiento local de las partículas que lo componen (átomos o moléculas) de una parte a otra de su posición media. Estas vibraciones son transformadas en energía mecánica en la membrana timpánica, que a través del complejo tímpano-oscicular llega a la ventana oval, provocando un movimiento de pistón en la platina del estribo, que se introduce hacia el vestíbulo del oído interno. Este movimiento de la platina del estribo (energía mecánica) va a ser transformado en onda de presión en los líquidos cocleares. En el receptor auditivo del laberinto anterior, u órgano de Corti, esta onda de presión es transformada en señal eléctrica y, como tal, va a ser transmitida a través de las neuronas de las diferentes estaciones de la vía auditiva central hasta la corteza cerebral, y en el área auditiva (área 22, 41 y 42 de Brodman) será interpretada según un significado frecuencial agudo o grave, una intensidad alta o baja, etc. (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). El área 41 se encargaría de la organización tonotópica, el área 42 de la atención auditiva y de la identificación de las palabras, y el área 22 sería la responsable del reconocimiento de lo que se oye, gnosia auditiva (Uziel, 1985).

El órgano de la audición del ser humano está adaptado para recibir sonidos de frecuencias que varían entre 20 hertzios (20 Hz) y 20.000 hertzios (20 kHz), aunque la mayoría de los sonidos que percibimos se hallan dentro de lo que se denomina “zona conversacional”, que incluye sonidos de frecuencias entre 250 y 4500 Hz y de intensidad entre 30 y 80 dB (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a). La mayoría de los mamíferos extienden su espectro de audición hacia las frecuencias relacionadas con el ambiente en el que viven; el topo extiende su espectro de frecuencias hacia los tonos graves (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a), la rata alcanza desde los 250 Hz hasta los

80 kHz, siendo su mejor rango de frecuencias entre 8 KHz y 31 kHz (Kelly and Masterton, 1977), las ballenas y los delfines tienen un espectro de audición que abarca desde los 20 Hz hasta los 100 kHz (Gould y Morgan, 1942).

Podemos distinguir en el aparato auditivo una parte periférica, compuesta por el oído externo, el oído medio y el oído interno, y una central, que incluiría el nervio auditivo, los núcleos cocleares, el complejo olivar superior, los tubérculos cuadrigéminos inferiores, el cuerpo geniculado medial y la corteza auditiva, área 22, 41 y 42 de Brodman (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

## **ANATOMIA DEL SISTEMA AUDITIVO.**

### **OIDO EXTERNO.**

Consta de pabellón auricular u oreja, que es la parte más visible del aparato auditivo, y el conducto auditivo externo (CAE), que pone en comunicación el pabellón auricular con la membrana timpánica.

El pabellón auricular deriva del 1º y 2º arcos branquiales, que darían lugar al esqueleto cartilaginoso de sus diferentes porciones; por invaginación de la 1ª hendidura branquial se formaría el conducto auditivo externo (Gil-Carcedo, 1995).

El pabellón auricular es una estructura adiposa y cartilaginosa recubierta de piel, que dibuja perfectamente los relieves del cartílago subyacente; la parte adiposa corresponde al lóbulo de la oreja. Este pabellón auricular es fijo o escasamente móvil en los humanos, pero existen mamíferos, cuyo espectro de audición se extiende hacia frecuencias agudas, en los que las orejas son móviles gracias a la acción de tres músculos extrínsecos, el auricular posterior, el auricular superior y el auricular anterior (Abelló y Traserra, 1992).

El conducto auditivo externo tiene forma de “S” itálica, con dos acodaduras; se

inicia en el meato auditivo externo y consta de una parte cartilaginosa externa, que es prolongación del cartílago de la concha del pabellón auricular, y una parte ósea interna formada por el hueso timpanal y el hueso escamoso del temporal. Ambas porciones están recubiertas por piel con pelo, glándulas ceruminosas y sebáceas, sobre todo en la porción más externa, y tienen funciones de defensa y limpieza.

La inervación motora de los músculos auriculares procede del VII par craneal, y en la inervación sensitiva del pabellón auricular y del conducto auditivo externo se implican ramas de diferentes nervios craneales, plexo cervical, V y VII pares craneales y más cerca del tímpano el X par craneal (Abelló y Traserra, 1992); la zona de inervación sensitiva del VII par craneal se denomina zona de Ramsay-Hunt (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a).

La vascularización del pabellón auricular y del conducto auditivo externo tiene varios orígenes, las arterias auriculares anteriores procedentes de la arteria temporal superficial, la arteria auricular profunda para el conducto procede de la arteria maxilar interna y la arteria auricular posterior es rama de la carótida externa (Spalteholz, 1947).

### **OIDO MEDIO.**

Dentro del oído medio podemos distinguir una caja timpánica, que contiene la cadena de huesecillos con los músculos y los ligamentos que los fijan, unas celdas neumáticas y la trompa de Eustaquio.

Las celdas neumáticas, la trompa de Eustaquio y el recubrimiento de la cavidad del oído medio tienen origen en la 1ª bolsa faríngea endodérmica. El martillo, el músculo del martillo y el yunque derivan del 1<sup>er</sup> arco branquial; el estribo, junto con el músculo del estribo, tiene su origen en el 2º arco branquial (Gil-Carcedo, 1995).

El oído medio se encuentra separado del oído externo por la membrana timpánica. Esta membrana consta de 3 capas en su pars tensa, una interna de origen en la 1ª bolsa

faríngea endodérmica que da lugar al epitelio mucoso, una externa que se origina a partir de la 1ª hendidura branquial o faríngea ectodérmica que da lugar al epitelio estratificado, y una capa media fibrosa de origen mesodérmico, que falta en la parte más superior del tímpano, llamada pars flácida o membrana de Schrapnell (Gil-Carcedo, 1995).

La caja timpánica o cavidad del oído medio puede dividirse en tres porciones, según su relación con la proyección del conducto auditivo externo en dirección medial, una superior, llamada epitímpano o ático, una media, mesotímpano o atrio y una inferior o hipotímpano. Para su estudio y para una mejor sistematización en las relaciones de las estructuras situadas en el oído medio, se pueden diferenciar seis caras, con sus correspondientes estructuras (Abelló y Traserra, 1992):

**Pared externa:** Se halla ocupada en su totalidad por la membrana timpánica con sus dos porciones, pars tensa (inferior) y pars flácida o membrana de Schrapnell (superior); es un claro límite entre el oído externo y el oído medio.

**Pared interna:** En esta destaca el promontorio, que corresponde a la impronta que deja la espira basal de la cóclea en la caja timpánica; la segunda porción del canal de Falopio, que envuelve la correspondiente porción del VII par craneal, también guarda relación con esta pared, así como la ventana oval, la ventana redonda y el proceso cocleariforme (pico de cuchara), que es donde emerge el tendón del músculo del martillo, y además se trata de una importante referencia para la cirugía otológica.

**Pared superior** o techo del ático, también llamado *tegmen tympani*, que se corresponde con el suelo de la fosa craneal media. En esta pared se insertan varios ligamentos que fijan la cabeza del martillo y el cuerpo del yunque, junto con la articulación entre ambos.

**Pared inferior,** que separa la caja timpánica del golfo de la yugular.

**Pared anterior**, donde se localiza el orificio tubárico, que comunica la caja timpánica con la trompa de Eustaquio.

**Pared posterior**, donde se localiza el *additus ad antrum*, en la parte superior, que es la entrada desde el ático hacia el antro mastoideo y las cavidades mastoideas. Otra importante relación en esta pared es la *foseta incudis*, hacia donde se proyecta la rama corta del yunque. El proceso piramidal, donde se fija el músculo del estribo y el acueducto de Falopio que contiene la 3ª porción del VII par craneal, son estructuras que también se localizan en la pared posterior de la caja timpánica.

Dentro de la caja timpánica se encuentran los huesecillos (martillo, yunque y estribo), los músculos (músculo del martillo y del estribo), los ligamentos que fijan los diferentes huesecillos y sus articulaciones a las paredes de la caja timpánica y la mucosa que tapiza las cavidades del oído medio (Sauvage y Vergnolles, 1992).

Los huesecillos (*ossicula auditus*) constituyen una cadena, y se disponen con un orden de lateral a medial, el martillo, el yunque y el estribo:

El martillo (*malleus*) es un hueso con forma de maza, que pesa entre 22 y 29 mg, y es el más largo, el más voluminoso y el más externo de todos los huesecillos del oído medio. Anatómicamente se puede diferenciar en este hueso la cabeza, el cuello, el mango y unas apófisis (Sauvage y Vergnolles, 1992).

Posee una cabeza redonda (*caput mallei*) que, en sus vertientes interna y posterior, está ocupada por una superficie articular en forma de silla, con la que se une al yunque a nivel del ático, articulación incudo-maleolar (es una diartrosis con sinovial y menisco, articulación en silla de montar o de encaje recíproco). El cuello del martillo (*collum mallei*) es una región más estrecha y aplanada entre la cabeza y el mango, donde se inserta el músculo del martillo. El mango del martillo (*manubrium mallei*) que tiene una dirección de arriba hacia abajo y hacia atrás, termina en una formación ovalada y

achatada que es la espátula, a nivel del *umbo* (la zona central y más deprimida de la membrana timpánica); se halla incluido en el espesor de la membrana timpánica, sobre todo en la parte más inferior (las fibras radiales del tímpano se fijan al periostio del mango del martillo). La apófisis corta o externa (*processus lateralis*), nace en la parte inferior y externa del cuello, mientras que la apófisis larga o anterior (*processus anterior*) se origina en la parte más anterior del cuello del martillo (Andrea, 1992; Sauvage y Vergnolles, 1992).

El yunque (*incus*) tiene una posición media entre los huesecillos de la caja timpánica y es el de mayor peso de estos huesecillos (25 mg). En este hueso se reconoce un cuerpo, una rama horizontal y una vertical. El cuerpo (*corpus incudis*) tiene forma cuboidea aplanada y en su parte anterior presenta una superficie cóncava, a través de la cual se articula con el martillo. La rama horizontal o corta (*crus breve*) que continúa el cuerpo hacia atrás, se proyecta hacia la *foseta incudis*. La rama vertical o larga (*crus longum*) se proyecta desde la parte inferior del cuerpo hacia el atrio, por detrás y paralela al mango del martillo; su extremidad distal, apófisis lenticular (*processus lenticularis*), se incurva en dirección medial para articularse con el estribo, formando la articulación incudo-estapediana, que es una enartrosis con sinovial y menisco (Andrea, 1992; Sauvage y Vergnolles, 1992).

El estribo (*stapes*) es el más medial y el más ligero de los huesecillos del oído medio; presenta una disposición casi horizontal y en su estructura se pueden diferenciar la cabeza, el cuello, dos ramas y una platina. La cabeza (*caput stapedis*) es de pequeño tamaño y en su parte superior presenta una superficie articular cóncava (*tacícula*) para articularse con la apófisis lenticular del yunque, formando una enartrosis. El cuello es la región estrecha existente entre la cabeza y las ramas, y en su cara posterior se inserta el músculo del estribo. Las ramas o cruras (*crus*) en número de dos, crura anterior y crura

posterior, se originan en la proximidad de los polos de la platina y forman un arco, llamado supraestructura del estribo, que termina en el cuello y cuya altura es de 4 mm. La platina (*basis stapedis*) es una pequeña lámina ósea, ovalada, que rellena y reproduce la forma de la ventana del vestíbulo y que cierra completamente gracias al ligamento anular, formando la articulación estapedio-vestibular (sindesmosis estapedio-vestibular); sus caras vestibular y periférica están recubiertas de cartílago (Andrea, 1992; Sauvage y Vergnolles, 1992).

La cadena osicular está anclada en sus extremos gracias a la membrana timpánica y al ligamento anular, pero también se fija a las paredes de la caja timpánica a través de diferentes ligamentos del martillo (ligamento superior o suspensor, ligamento externo y ligamento anterior) y del yunque (ligamento posterior y ligamento superior).

Los dos músculos que existen en el oído medio son el músculo del martillo y el músculo del estribo. El músculo del martillo (*musculus tensoris tympani*) tiene forma fusiforme, de unos dos centímetros de longitud y ocupa un canal que discurre paralelo a la trompa de Eustaquio, insertándose en la cara interna del cuello del martillo; al contraerse tracciona del martillo en dirección medial, tensando la membrana timpánica e introduciendo la platina del estribo en la ventana oval. Está inervado por una rama dorsal del nervio maxilar inferior del trigémino (V par craneal) llamada nervio del músculo del martillo - *nervus musculus tensoris tympani*- (Spalteholz, 1975).

El músculo del estribo (*musculus stapedius*) es el músculo más pequeño del esqueleto (7 mm) y se encuentra alojado en el canal de la pirámide, y desde esta se extiende hasta la cara posterior del cuello del estribo. Tiene una función antagónica a la del músculo del martillo, ya que bascula el estribo hacia afuera, sacando la platina del estribo de la ventana oval, a la vez que relaja la tensión de la membrana timpánica. Está inervado por el nervio del músculo del estribo (*nervus stapedius*) que es una rama del

nervio facial, VII par craneal (Spalteholz, 1975).

Habitualmente la acción de estos dos músculos se produce de manera conjunta, con lo que se consigue tensar la membrana timpánica y sacar la platina del estribo de la ventana oval, fijando la cadena de huesecillos, resultando en una disminución de la sensibilidad auditiva para algunas frecuencias y a ciertas intensidades (Palomar, 1992).

De las celdas neumáticas del oído medio, la más importante es el antro mastoideo (*antrum mastoideum*), que existe desde la infancia y que tiene un tamaño variable, alrededor de 1 cm<sup>3</sup>. Está en contacto con el ático, a través del *additus ad antrum*, y guarda importantes relaciones con las meninges a través del techo del antro (*tegmen antri*), con el nervio facial, por delante, a través del muro de Gellé, con el seno lateral por detrás, y con el laberinto posterior (canal semicircular externo), en profundidad. El resto de las celdas neumáticas mastoideas comunican con el antro, tienen menor tamaño, y se denominan según su localización en la mastoides, grupo anterior, grupo posterior y las de la punta mastoidea (Andrea, 1992; Sauvage y Vergnolles, 1992).

La trompa de Eustaquio (*tuba auditiva*) está constituida por dos conos alargados y unidos por sus vértices, quedando una zona más estrecha que se denomina istmo tubárico (*isthmus tubae auditiva*). Tiene una longitud de unos 37 mm, y consta de una porción cartilaginosa, medial y una porción ósea, lateral. Su desembocadura en la rinofaringe está rodeada de tejido linfoide, constituyendo lo que se denomina amígdala tubárica de Gerlach. Su superficie está recubierta de un epitelio mucoso ciliado, que tiene un movimiento en dirección hacia la rinofaringe. Esta trompa de Eustaquio es la única comunicación natural entre la caja timpánica, o el oído medio, con el medio exterior, y tiene como misión fundamental el equilibrado de las presiones existentes en ambos espacios; esto lo consigue gracias a la acción del aparato motor de la trompa, que se halla constituido por los músculos periestafilino interno o elevador del velo del

paladar (*musculus elevator veli palatini*) y periestafilino externo o tensor del velo del paladar (*musculus tensor veli palatini*). Por la acción combinada de ambos músculos, durante la deglución o el bostezo, se produce la apertura de la trompa, que en condiciones de reposo se halla colapsada (Andrea, 1992; Sauvage y Vergnolles, 1992).

### **OIDO INTERNO.**

El estudio de la anatomía del oído interno comienza con Eustachius (1510-1574) y Fallopio (1523-1562); posteriormente Valsalva (1666-1723) describió el modiollo y las linfas del oído interno, que Breschet (1784-1845) llamaría perilinfa y endolinfa. El estudio microscópico del receptor auditivo se debe a Alfonso de Corti (1822-1876), por lo que dicho receptor recibe desde entonces (1851) la denominación de órgano de Corti; más tarde Reissner y Reichert describirían los compartimentos cocleares y sus membranas. El conocimiento detallado de las células del órgano de Corti se debe, entre otros, al histólogo sueco Retzius (1842-1919), a Denis (1902), a Held (1909) y a Kolmer (1927). Los estudios de la vía aferente y de las neuronas bipolares del ganglio espiral se deben a Alexander (1901), Wittmaack (1904) y a Ramón y Cajal (1909), quién también observó la presencia de fibras nerviosas, independientes de las neuronas del ganglio espiral, que alcanzaban el receptor auditivo; sin embargo, fue Rasmussen en 1953 quien describió el fascículo de fibras que desde el complejo olivar superior llegan a la cóclea, constituyendo el denominado haz olivococlear de Rasmussen (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a).

El oído interno, también llamado laberinto, se divide en un laberinto anterior o cóclea, relacionado con la audición, y un laberinto posterior, que incluye los canales semicirculares y el vestíbulo, relacionados con el equilibrio, el tono muscular y la postura espacial. El oído interno se encuentra excavado en el interior del peñasco del hueso temporal, y está formado por numerosas cavidades, que unidas constituyen el

llamado laberinto óseo, que envuelve a modo de estuche al laberinto membranoso; este último incluye los canales semicirculares membranosos con sus dilataciones ampulares, el utrículo, el sáculo y la cóclea membranosa o canal coclear. Ambos laberintos, el óseo y el membranoso, se hallan separados por la perilinfa, mientras que el interior del laberinto membranoso se halla ocupado por la endolinfa.

### **LABERINTO ANTERIOR O COCLEA.**

La cóclea ósea se halla incluida en el espesor del peñasco del hueso temporal; tiene un origen mesodérmico y rodea en forma de envoltura a la cóclea membranosa, que tiene un origen ectodérmico a partir de la placoda auditiva (ótica). El mesodermo se transforma en cartílago y posteriormente en hueso (peñasco del temporal), aunque en la cóclea ósea la capa media permanece como hueso encondral (sin calcificar) durante toda la vida; la capa externa es de hueso compacto y la interna de hueso periostal (Gil-Carcedo, 1995).

La disposición de la cóclea ósea es la de un tubo arrollado en espiral sobre un eje central, de manera decreciente de abajo hacia arriba, de dos vueltas y media aproximadamente, que termina en fondo de saco y en la que se pueden diferenciar tres partes, columela, lamina espiral y lamina de los contornos. La orientación del eje central coclear la lleva a la oblicuidad en los tres ejes anatómicos del espacio, es decir, la cóclea es oblicua en sentido pósterio-anterior, súpero-inferior y látero-medial. Por lo tanto, el ápex, es inferior, medial y anterior respecto de la base, pero por convenio internacional para el estudio anatómico e histológico se considera que la base es inferior y el ápex es superior (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a)

El modiolo o columela de Breschet es el eje óseo del caracol, tiene forma de cono de base inferior y es de hueso poroso. En su interior se encuentra horadado el túnel de ROSENTHAL, que alojará al ganglio espiral de CORTI. Se halla perforado por

múltiples orificios, que van desde el túnel hacia la lámina espiral, donde se hallan alojadas las dendritas de las neuronas tipo I y II y desde el túnel a la base, donde se alojan los axones de las mismas neuronas, formando la criba espiroidea. En su base se formará el nervio coclear, por la unión de todos los axones de las neuronas tipo I y II procedentes del órgano de Corti (Gil-Carcedo, 1995).

El tabique espiral sirve de separación de dos espiras, se forma al unirse la base y el techo de dos espiras contiguas, y se continúa hacia afuera y hacia adentro con la lámina de los contornos; en esta lámina de los contornos se distingue una región periférica, a modo de caparazón de la cóclea, y una región medial o modiolar que se halla dividida en toda su longitud por la lámina espiral.

La lámina espiral es una estructura de tejido óseo, de disposición helicoidal, más ancha en la base y más estrecha en ápex, con un borde libre donde se fija la membrana basilar y un borde medial que se fija a la lámina de los contornos en su porción modiolar. Así la lámina espiral divide cada espira de la cóclea, de manera incompleta, en dos tubos o rampas, la rampa vestibular por encima y la rampa timpánica por debajo.

La perilinfa que baña estas dos rampas está en comunicación a través del helicotrema, que se localiza en la cúpula de la cóclea o ápex.

La rampa vestibular comienza en el vestíbulo y se relaciona con la caja timpánica a través de la ventana oval, cerrada por la platina del estribo y el ligamento anular; a su vez la rampa timpánica acaba en la región subvestibular y se relaciona con la caja timpánica a través de la ventana redonda, que está obturada por una membrana o tímpano secundario.

La lámina espiral está surcada por gran cantidad de canalículos que comunican su borde libre con el túnel de ROSENTHAL. Al conjunto de la desembocadura de estos canalículos en el borde libre de la lámina espiral se denomina *habénula perforata*.

### **LA COCLEA MEMBRANOSA. (Laberinto membranoso anterior).**

Se trata de una estructura separada por membranas del laberinto óseo, y que se adapta al interior del mismo. Se origina a partir de la placoda auditiva primitiva, comenzando su desarrollo a partir de la 6ª semana y completándolo alrededor de la 10ª semana. Tiene un origen ectodérmico a partir de la placoda ótica que, al emigrar en profundidad, da lugar a la vesícula auditiva, rellena de líquido de características intracelulares (endolinfa); de una proliferación celular de la cara inferior de esta vesícula se forma el ganglio de Corti. Esta vesícula auditiva, al emigrar medialmente, queda aislada en el mesodermo que da lugar al hueso temporal (Gil-Carcedo, 1995).

El desarrollo coclear se inicia en la región basal y termina por el ápex, completándose aproximadamente al llegar a la octava semana de desarrollo embrionario, mientras que los primeros signos de diferenciación del órgano de Corti aparecen dos semanas después; las células ciliadas internas comienzan a desarrollarse antes que las células ciliadas externas, y estas se desarrollan a la vez que la membrana tectoria. El desarrollo del sistema eferente es posterior al sistema aferente (Ciges, 1997).

A las veinte semanas de desarrollo intrauterino la cóclea está formada y adquiere propiedades funcionales, por lo que el feto podría oír en el útero a partir de entonces; sin embargo es en las primeras semanas de vida extrauterinas cuando adquiere una agudeza auditiva similar a la del adulto al completarse la mielinización del nervio auditivo (Ciges, 1997).

El laberinto membranoso es un sistema de cavidades unidas entre sí y rellenas de líquido endolinfático. Se diferencia un laberinto posterior, que incluye los tres canales semicirculares y el vestíbulo, conteniendo al utrículo y al sáculo, relacionados con el equilibrio y la postura espacial, y un laberinto anterior o canal coclear, que se relaciona con la audición.

El canal coclear tiene unos 30 mm. de longitud y una disposición en espiral, de dos espiras y media, decreciente desde la base hacia el ápex, localizada dentro de la cóclea ósea; gracias a la lámina espiral completa la división de la cóclea en tres rampas, la vestibular o superior, la media o coclear y la timpánica o inferior.

La rampa media o coclear muestra una sección triangular, delimitada por arriba por la membrana de REISSNER, por debajo por la membrana basilar y por fuera se localiza la estría vascular y el ligamento espiral.

La membrana de REISSNER se ancla entre el limbo espiral interno y el ligamento espiral, por encima de la estría vascular, separando la rampa vestibular de la rampa coclear. Es una doble capa celular, con una membrana basal en medio. Las células del lado coclear son de origen epitelial y de aspecto poligonal (están unidas entre sí mediante complejos de unión que sellan esta barrera, evitando el paso o la mezcla de perilinfa con endolinfa (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a)) y tienen una posible función de absorción, mientras que las células de la vertiente vestibular son irregulares y estrelladas y de origen conjuntivo, posiblemente fibroblastos (Abelló y Traserra, 1992).

La membrana basilar se extiende entre la lámina espiral ósea, bajo el surco espiral interno y el ligamento espiral, por debajo de la estría vascular, y separa la rampa coclear de la rampa vestibular; su anchura aumenta desde la base coclear hasta el ápex, mientras que su grosor y su rigidez son mayores en la espira basal que en el ápex coclear, lo que tiene su importancia para la transmisión de la onda de presión. Tiene una capa fibrosa y una capa de células conjuntivas en la vertiente de la rampa timpánica. Sobre esta membrana descansa el receptor auditivo u órgano de CORTI.

El ligamento espiral es el tejido conjuntivo que da aporte vascular a la estría vascular y la fija firmemente a la lámina de los contornos (Gil-Loyzaga y cols., 1987).

La estría vascular se localiza en la porción externa de la rampa coclear, bajo la

inserción de la membrana de REISSNER; presenta una capa celular epitelial, bajo la cual, y sin que las separe una membrana basal, existen varias capas de células epitelioides más claras, surcadas por numerosos capilares sanguíneos (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a). Es el único epitelio vascular del organismo y se le supone como principal función, por los numerosos datos experimentales, la producción de endolinfa así como el mantenimiento del potencial endococlear.

Las diferentes rampas de la cóclea están rellenas de líquidos con una composición electrolítica y proteica diferente. La perilinfa que ocupa el vestíbulo, la rampa vestibular y la rampa timpánica, tiene una composición similar a la de los líquidos extracelulares del resto del organismo y a la del líquido cefaloraquídeo (LCR), rica en  $\text{Na}^+$  (140-150 mEq/l) y  $\text{Cl}^-$  (110 mEq/l), pobre en  $\text{K}^+$  (3,5-7 mEq/l), siendo la concentración proteica de 1-1,5 gr/l; por el contrario, la endolinfa del canal coclear, de los canales semicirculares, del utrículo y del sáculo, tiene una composición similar a la de los líquidos intracelulares, pobre en  $\text{Na}^+$  (1-5 mEq/l), rica en  $\text{K}^+$  (110-145 mEq/l) y  $\text{Cl}^-$  (130 mEq/l), siendo la concentración proteica de 0,3-0,6 gr/l. Esta diferente composición en electrolitos y proteínas hace que la endolinfa sea hiperosmótica (330 mOsm/kg) en relación con la perilinfa (290 mOsm/kg), y posiblemente esta diferencia sea la responsable del mantenimiento del potencial endococlear (diferencia de potencial que existe entre la endolinfa y la perilinfa), que es de +80/+120 mV (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a).

El túnel de CORTI, que en un principio se consideró bañado de una linfa diferente, llamada cortilinf, se halla ocupado por un líquido cuya composición es similar al de la perilinfa (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

## **EL ORGANNO DE CORTI.**

Descrito por primera vez por Alfonso de Corti en 1851 es el receptor que se localiza en el interior de la rampa coclear, sobre la membrana basilar y que constituye el órgano neurosensorial de la audición. El órgano de Corti está formado por un epitelio ciliado, altamente especializado, junto con unos elementos de sostén y la membrana tectoria.

**Los elementos de sostén** incluyen a aquellas células que, gracias al desarrollo de su citoesqueleto, contribuyen al mantenimiento general de la estructura del órgano de Corti, y en particular al mantenimiento posicional de las células ciliadas.

**Células de los pilares.** Tienen forma piramidal, alargadas y aplanadas, y están dispuestas en dos pilares, pilar interno y pilar externo. Están unidas en su parte superior (cabeza) de manera estrecha, mediante un desmosoma, donde se anclan los microtúbulos del citoesqueleto (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999); dejan un espacio triangular entre los cuerpos celulares relleno de perilinfa, denominado túnel de Corti, y en su base (pie) vuelven a ensancharse y llegan a contactar sobre la membrana basilar. Estas células contienen unos microtúbulos que van desde la zona basal a la zona apical, atravesando el cuerpo celular y formando el citoesqueleto que da consistencia a estas células; el núcleo celular es de disposición basal.

Las células de los pilares permiten el paso entre ellas de las fibras nerviosas que inervarán a las células ciliadas externas y de las que formarán el plexo espiral del túnel de Corti.

**Células de DEITERS** o falángicas. Se disponen en cuatro o cinco hileras, para sustentar a las células ciliadas, una para las internas (aunque habitualmente no se las denomina como célula de Deiters) y tres o cuatro para las externas. Se fijan en la membrana basilar, dejando entre ellas los **espacios de Nuel**, y llegan hasta el polo basal

de las células ciliadas, abriéndose a modo de copa para albergarlas. Emiten una prolongación desde su zona apical que, llegando a nivel del ápex de células ciliadas externas, se ensancha y contribuye a formar la membrana reticular.

**Células de HENSEN.** Se sitúan por fuera de las células de DEITERS, tienen mayor altura que estas, aspecto globuloso y llegan a contactar con la lámina tectoria, descansando sobre la membrana basilar; contienen abundantes gránulos lipídicos (Merchán y cols.,1980).

Otras células que también se pueden encontrar en el órgano de Corti, pero que son menos conocidas, son las **células de CLAUDIUS y de BOETTCHER**, en el surco espiral externo y las células que tapizan el surco espiral interno.

**La membrana tectoria** es una estructura acelular y de composición glicoproteica, que se sitúa sobre el órgano de Corti; sus dimensiones varían a lo largo de la cóclea, siendo más estrecha en la base, y alcanzando doble anchura a nivel del ápex. Consta de una porción medial, anclada firmemente al limbo espiral y una porción lateral libre, que se sitúa sobre el órgano de Corti. Está compuesta por colágeno, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (Gil-Loyzaga, 1997; Gil-Loyzaga y Poch-Broto 2000-a).

Presenta una estructura con gran cantidad de fibrillas (Kronester y Frei, 1978; Steel, 1983), y en su cara basal se anclan los estereocilios de las células ciliadas externas, que dejan una impronta en la parte inferior de dicha membrana en forma de V o W.

La renovación de esta membrana ha dado lugar a fuertes controversias, considerándose en la actualidad que se trata de una estructura con un bajo índice de renovación, que podría llevarse a cabo mediante las células del limbo espiral (Gil-Loyzaga, 1997).

Como principal función de esta membrana tectoria es la de provocar mínimos

desplazamientos de los estereocilios de las células ciliadas externas, que conducen a la activación de las mismas. Además, parece funcionar como un reservorio iónico de  $K^+$ , que se halla en equilibrio con la endolinfa (Gil-Loyzaga, 1997).

**Epitelio ciliado.** Se denominan así a aquellas células del órgano de Corti que presentan en su polo apical varias filas de estereocilios de diferente longitud. Forman un epitelio altamente especializado, capaz de transformar las señales recibidas en forma de ondas de presión (energía mecánica) en impulsos eléctricos, capaces de ser transmitidos hacia el sistema nervioso central a través de la vía auditiva.

Dependiendo de su localización con respecto al túnel de Corti, distinguimos dos tipos de células ciliadas, las internas y las externas.

#### **CELULAS CILIADAS INTERNAS (CCI).**

Tienen una disposición medial con respecto al túnel de Corti, están más próximas al modiolo y constituyen las verdaderas células sensoriales de la cóclea, ya que son las responsables de la transformación de la energía mecánica (onda de presión en los líquidos cocleares) en energía eléctrica (expresada en diferencias de potencial), y de esta manera podrá transmitirse a través de las diferentes estaciones neuronales hasta la corteza cerebral auditiva.

En el hombre existen unas 3500 células ciliadas internas, habitualmente dispuestas en una única hilera sobre la membrana basilar, a lo largo de la espiral coclear. La densidad celular es aproximadamente de 100 células/mm (Bredberg, 1968), sin embargo la distribución no es homogénea, aumentando dicha densidad desde la base hasta el ápex (Spoendlin y cols, 1988).

Estas células tienen aspecto piriforme o globuloso, con una porción más estrecha superior (polo apical), donde se localiza la placa cuticular (Fig. 1. Pag. 66), que es de naturaleza glicoproteica y contiene filamentos contráctiles. A nivel de la placa cuticular

se implantan un centenar de estereocilios rígidos, alineados en 3 ó 4 filas crecientes a medida que hacen más externos, y dispuestos en empalizada incurvada; su longitud es tanto mayor cuanto mayor es la proximidad de las células ciliadas al ápex coclear, y su rigidez viene dada por la integración en su estructura de filamentos de actina (Lim, 1986; Corwin y cols, 1991; Pickles y Corey, 1992; Bargmann, 1994).

Estos estereocilios (Fig. 1. Pag. 66) están unidos entre sí con los de la misma hilera y con los de hileras contiguas (Osborne y cols, 1984; Pickles y cols, 1984; Comis y cols, 1985), mediante puentes fibrilares que se extienden entre las caras laterales y a nivel de polos apicales (tip links), consiguiendo que todos se desplacen al unísono en el proceso de excitación celular (Flock y cols, 1977). Estos puentes fibrilares son de naturaleza glicoproteica (Gil-Loyzaga, 1997; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Incluidas en la placa cuticular se han identificado diferentes proteínas contráctiles (actina, miosina, tropomiosina...) que servirían para dar movilidad a los cilios (Flock, 1983; Nielsen y Slepecky, 1986).

Estas células tienen un núcleo de disposición central y un citoplasma con abundantes organelas. En la zona de la base se localizan los contactos sinápticos con las terminaciones dendríticas de las fibras aferentes tipo I del nervio auditivo. Cada célula ciliada interna contacta con una media de entre 10 y 20 fibras, que corresponden a 10-20 neuronas tipo I, ya que la conexión se realiza de forma radial y sin ramificación, entre una neurona aferente tipo I y una única célula ciliada interna (sinapsis excitadora asimétrica Gray tipo I); este número de conexiones disminuye en la base y en el ápex coclear (Spoendlin, 1985). Cada fibra aferente tipo I contacta con una única célula ciliada interna (King y Cols, 1982; Berglund y Ryugo, 1987) y la localización de dicha sinapsis varía en función de grosor y de la frecuencia de descarga de la fibra aferente tipo I (Lieberman, 1982; Lieberman y Oliver, 1984). Las fibras más gruesas y las de

frecuencia de descarga espontánea elevada, son las más numerosas y contactan con la porción basal y lateral de la célula ciliada interna, mientras que las fibras más delgadas y de frecuencia de descarga espontánea baja contactan con la porción basal y medial (modiolar) de las mismas células.

### **CELULAS CILIADAS EXTERNAS (CCE).**

Seguramente son un elemento clave de la fisiología coclear, ya que participan en los fenómenos de micromecánica coclear y se encargan de modular la intensidad del sonido que alcanza la superficie del receptor auditivo. Su localización es lateral respecto al túnel de Corti y se disponen en tres hileras paralelas a lo largo de todo el órgano de Corti, pudiendo llegar a cuatro hileras a nivel del ápex, donde la anchura de la membrana basilar es mayor (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a). El número de células ciliadas externas es alrededor de 13.400 y su densidad se incrementa desde la base hasta el ápex, variando desde 300 células/mm en la base, hasta 500 células/mm a nivel del ápex coclear (Bredberg, 1968).

Tienen forma cilíndrica y su longitud varía según se trate del ápex o de la región basal, siendo de un tamaño similar a la célula ciliada interna en la base y llegando a doblar su longitud en el ápex coclear. Están dispuestas entre la lámina tectoria y las células de Deiters que, desde su polo basal, las fijan a la membrana basilar; cualquier movimiento de esta membrana se transmite a las células de Deiters y desde estas a las células ciliadas externas y a la lámina tectoria, y viceversa, movimientos de las células ciliada externa repercutirían en la membrana basilar. Los cilios más largos de las células ciliadas externas están implantados en la cara inferior de la lámina tectoria (Gil-Loyzaga y cols., 1985; Gil-Loyzaga, 1997; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a).

Sus caras apicales forman, junto con las células de los pilares y las prolongaciones de las células de Deiters, una especie de mosaico llamado **lámina reticular**, que separa

dos espacios dentro de la rampa coclear, uno superior bañado por endolinfa y uno inferior bañado por perilinfa-cortilnfa, que incluye el túnel de Corti, y los espacios de Nuel situados entre las células ciliadas y las células de Deiters. La cara apical de las células ciliadas externas, donde se localizan los estereocilios, está bañada por endolinfa, a diferencia de sus caras laterales, que se encuentran bañadas por perilinfa.

Las caras laterales de estas células están libres, ya que las células de Deiters solo ocupan el polo basal (a diferencia de lo que ocurre con las células ciliadas internas), lo que permite una buena superficie de intercambio con la perilinfa y una mayor libertad para los movimientos.

En su polo apical se encuentra igualmente la placa cuticular, en la que se implantan los estereocilios, que se disponen en hileras (en número de 3 en el cobaya y en la rata y entre 5 y 7 en los humanos), con los más largos en posición externa y una distribución en forma de V o W, con el vértice señalando hacia el surco espiral externo. Los cilios son tanto más cortos cuanto más próximos a la base de la cóclea se hallen, siendo los del ápex cuatro veces más largos que los de la base (Wright, 1984); por el contrario, la rigidez de los cilios tiene una relación inversa a su longitud, los más rígidos están en la base y de ello se deriva que su frecuencia de resonancia decrezca de la base al ápex, lo que habla a favor de la selectividad de frecuencia de la cóclea. Al igual que en las células ciliadas internas, los estereocilios de las células ciliadas externas están unidos con otros estereocilios de la misma hilera o de hileras contiguas mediante filamentos glicoproteicos de gran importancia funcional (Gil-Loyzaga, 1997; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Estos estereocilios poseen un citoesqueleto formado por microtúbulos y microfilamentos de actina (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a), y a pesar de ello, solamente pueden realizar movimientos pasivos, careciendo de movimientos activos.

En la zona de sus caras laterales, entre la placa cuticular y el polo basal, se encuentran las cisternas laminares, que se trata de unas estructuras de retículo endoplásmico liso, situadas bajo la membrana celular (Saito, 1983; Prieto y cols., 1986; Gil-Loyzaga y Brownell, 1988; Slepecky, 1997), que parecen tener implicaciones en los mecanismos de contracción rápida y lenta de las células ciliadas externas. Estas cisternas están conectadas, por pilares proteicos, a la membrana celular, donde se relacionan con filamentos de actina, espectrina y miosina (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a). Asociados a las cisternas laminares, se observan unos materiales electrodensos (Prieto y Cols, 1986), compuestos por glicoconjugados, posiblemente implicados en los fenómenos de movilidad celular (Gil-Loyzaga y Brownell, 1988). También existen gran cantidad de mitocondrias, dispuestas en hilera y próximas a estas cisternas, a lo largo del soma celular.

En la base, la morfología de la célula ciliada externa es algo diferente a la de la célula ciliada interna, hace sinapsis con fibras aferentes tipo II y, a diferencia de las células ciliadas internas, con fibras del sistema eferente (Pujol y Lenoir, 1986; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). El número de sinapsis con la vía aferente es menor que en el caso de la célula ciliada interna; la sinapsis (sinapsis asimétrica Gray tipo II, con botones aferentes pequeños) se hace con la dendrita de la fibra espiral de la neurona tipo II del ganglio espiral. Cada neurona aferente tipo II recibe aferencias de entre 10 y 20 células ciliadas externas (Brown, 1987).

La sinapsis con la vía eferente se realiza entre la terminación axónica de la vía eferente y el soma de la célula ciliada externa (axosomática); son de tamaño mayor que las de la vía aferente y son las que principalmente ocupan el polo sináptico de la célula ciliada externa.

El límite del componente aferente, preferentemente apical, y del eferente,

preferentemente basal, varía de unas especies a otras, y así, en la rata, en el gato y en el ratón, el componente basal eferente se extiende más hacia ápex y en el hombre el componente apical aferente se extiende más hacia la base (Pujol y Sans, 1986). El núcleo tiene una disposición basal en estas células.

### **INERVACION DE LA COCLEA.**

Dentro de la cóclea se han reconocido tres tipos de fibras nerviosas, las **aferentes** y las **eferentes**, que inervan las células ciliadas internas y externas, y las fibras procedentes del **sistema nervioso autónomo simpático**, que desde el ganglio cervical superior tienen una distribución perivascular en la cóclea. Estos tres tipos de fibras nerviosas se agrupan en sistemas y así tendríamos un sistema aferente, un sistema eferente y un sistema simpático (Spoendlin, 1984; Eybalin, 1993).

### **SISTEMA AFERENTE.**

Este sistema transmite el mensaje sonoro desde las células ciliadas hacia centros superiores del sistema nervioso central. El órgano de Corti está inervado por fibras nerviosas aferentes y eferentes, la mayoría de las fibras son aferentes que inervan las células ciliadas internas (95%). El cuerpo celular de estas fibras aferentes se localiza en el ganglio espiral o de Corti, junto con el cuerpo celular de las aferentes que inervan las células ciliadas externas (Dannhoff y Bruns, 1993). El ganglio espiral se halla incluido en el canal espiral o de Rosenthal, que tiene una disposición helicoidal, alrededor del modiolo, con una longitud media de unos 12 m/m (Otte y cols., 1978), bastante más corta que la longitud del órgano de Corti (unos 34 m/m).

El número total de células ganglionares varía según los autores, alrededor de unas 37.000 en sujetos jóvenes (Otte y cols., 1978), entre 40.000 y 50.000 (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a); según sus características morfológicas se pueden agrupar en dos poblaciones diferentes, las tipo I, bipolares, grandes y mielinizadas y las tipo II,

pseudomonopolares, pequeñas y amielínicas (Nomura, 1976; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Ambos tipos celulares emiten prolongaciones centrales, hacia los núcleos cocleares del tronco cerebral, y periféricas, hacia las células ciliadas internas o externas (Benson y Ryugo, 1987; Brown, 1987-b).

Las fibras aferentes tipo I constituyen entre el 90 y 95% de la población del ganglio espiral, y sus prolongaciones periféricas (dendritas) son grandes, no se ramifican y están mielinizadas hasta la *habénula perforata* (Spoendlin, 1971; Kiang y cols., 1982; Brown, 1987-b; Dannhof y Bruns, 1993). Estas prolongaciones periféricas tienen una disposición radial y cada una de ellas inerva única y exclusivamente una sola célula ciliada interna, haciendo contacto mediante una sinapsis excitadora y asimétrica tipo I de Gray, en la que se observan cuerpos presinápticos rodeados de vesículas. El conjunto de todas estas ramificaciones periféricas constituye el **plexo espiral interno**, que se localiza próximo a la base de las células ciliadas internas.

Por el contrario las neuronas aferentes tipo II constituyen entre el 5 y el 10% de la población del ganglio espiral; se trata de neuronas pseudomonopolares con prolongaciones periféricas amielínicas que, tras salir por la *habénula perforata*, tienen un pequeño trayecto en el haz espiral interno para luego cruzar el túnel de Corti por su porción basal, fibras basales del túnel (Brown, 1987-b; Simmons y Liberman, 1988-a y b; Dannhof y Bruns, 1993) y recorrer, de manera espiral, aproximadamente 0,7 m/m en el **haz espiral externo**, antes de dar ramificaciones para inervar entre 10 y 20 células ciliadas externas de las tres filas en el espacio de 1 m/m (Spoendlin, 1972; Bredberg, 1977).

Cada célula ciliada interna recibe la inervación de unas 10 a 20 fibras aferentes tipo I (mielinizadas y grandes); las células ciliadas externas reciben inervación de una o dos ramas de fibras aferentes tipo II (amielínicas y pequeñas), y a su vez cada una de

estas inerva entre 10 y 20 células ciliadas externas.

La prolongación central de las neuronas aferentes tipo I y II (axones) se dirigen hacia el modiolos de la cóclea desde el canal de Rosenthal, formando el nervio coclear y a través del conducto auditivo interno llegarían a los núcleos cocleares, situados en el tronco cerebral.

Dentro del nervio coclear las fibras nerviosas tendrían una distribución tonotópica, ello es debido a la disposición helicoidal del ganglio de Corti. Los axones de las neuronas aferentes del ápex tienen una disposición central en el modiolos y en el nervio coclear, llevando la información de frecuencias graves, mientras que los axones de las neuronas aferentes de la espira basal de la cóclea tienen una disposición más periférica en el nervio coclear, llevando información de frecuencias agudas (Sando 1964). El número de fibras aferentes que contiene el nervio coclear es variable según el autor consultado y según la especie animal de la que se trate; para los humanos se ha calculado alrededor de 31.000, entre 23.000 y 40.000 (Rasmussen, 1940) y entre 40.000 y 50.000 (Gil-Lozaga y Poch-Broto, 2000-a).

La distribución de las fibras aferentes para las células ciliadas internas de la cóclea no es homogénea, es máxima en la zona central y media y desde aquí decrece hacia el ápex y hacia la base. Para las células ciliadas externas la máxima concentración de fibras aferentes se localiza en la espira media alta, contigua al ápex, siendo menor en la base y en el ápex.

#### **SISTEMA EFERENTE.**

En este sistema, que se encargaría de la modulación del mensaje sonoro, la transmisión del impulso nervioso ocurriría desde el tronco cerebral (SNC) hacia el órgano de Corti, y en concreto hasta las células ciliadas externas y hasta las fibras aferentes, bajo las células ciliadas internas (Warr y cols., 1986). El cuerpo de las

neuronas de la vía eferente se localiza en el complejo olivar superior y sus axones se reúnen constituyendo el llamado **haz olivococlear de Rasmussen** (Rasmussen, 1942 y 1946). Este tiene su origen en el núcleo olivar accesorio contralateral (Rasmussen, 1946), en el núcleo olivar superior principal homolateral (Rasmussen, 1960) y en la formación reticular (Rossi y Cortesina, 1962).

Se han identificado dos fascículos de fibras nerviosas en este sistema que, dependiendo de su origen, de su tamaño y de si son o no cruzadas, llamamos fascículo eferente medial y fascículo eferente lateral.

El sistema **eferente medial** tiene su origen en la parte más medial del complejo olivar superior (núcleo olivar superior medial o en cuerpo trapezoides), y establecería contacto sináptico con el polo basal de las células ciliadas externas mediante la sinapsis asimétrica excitatoria Gray tipo I, con botones sinápticos muy grandes y electrodensos que contienen gran cantidad de vesículas sinápticas; también podrían hacer sinapsis con las fibras aferentes tipo II, o con regiones medias o altas del cuerpo celular, en el ápex coclear (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a). La mayoría de estas fibras (70%) y en la mayoría de las especies animales, incluido el hombre, tienen un origen contralateral (Pujol, 1994).

El sistema **eferente lateral** se origina en la porción lateral del complejo olivar superior (núcleo olivar superior lateral) y terminaría bajo las células ciliadas internas, haciendo sinapsis (Gray tipo II, con botones sinápticos pequeños y electrodensos) con las dendritas de las neuronas aferentes tipo I, dentro del plexo espiral interno (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a); sólo un 14% de estas tendrían un origen contralateral.

Este haz olivococlear abandona el tronco cerebral junto con el nervio vestibular y por el conducto auditivo interno llega hasta la cóclea; a través de la **anastomosis de Oort** llega al nervio coclear (anastomosis vestíbulo-coclear), y con este llega hasta el

órgano de Corti.

Se pueden distinguir, por su tamaño y por sus características microscópicas, dos tipos de fibras eferentes en el sistema olivococlear medial (Bernhard y cols., 1993). Las fibras eferentes tipo I son relativamente grandes, con un diámetro de 1,2  $\mu\text{m}$ ; contienen mitocondrias grandes, neurofilamentos, y los neurotúbulos son escasos; su densidad de distribución dentro de la cóclea muestra un patrón decreciente desde la base hasta el ápex. Por el contrario, las fibras eferentes tipo II del haz olivococlear medial son más pequeñas que las del tipo I, con un diámetro aproximado de 0,5  $\mu\text{m}$ ; contienen abundantes neurotúbulos y escasos neurofilamentos y mitocondrias. La distribución de estas fibras en la cóclea muestra dos zonas de máxima densidad una en la base y otra en ápex.

Ambos tipos de fibras eferentes están mielinizadas hasta llegar a la *habénula perforata*, donde pierden su vaina de mielina, desde aquí se dirigen hacia el haz espiral interno (Lieberman y Brown, 1986), y tras un corto trayecto en dirección espiral y algunas ramificaciones, todas las fibras cruzan el túnel de Corti en dirección radial a media altura, hasta llegar a las células externas de los pilares del túnel de Corti, donde adquieren de nuevo una dirección espiral hacia la base o hacia el ápex, ramificándose e innervando entre 20 y 50 células ciliadas externas (Robertson y Gummer, 1985).

Las fibras aferentes tipo II y las eferentes del sistema olivococlear medial, cruzan el túnel de Corti a diferente altura, tal y como demostró Brown en cócleas de cobaya (Brown, 1987-a). En las preparaciones de cócleas mediante sección longitudinal del túnel de Corti, se observa la diferente situación de las fibras aferentes y eferentes; las fibras eferentes cruzan el túnel de Corti por la mitad superior del mismo, mientras que las fibras aferentes tipo II lo cruzan por la porción más inferior del mismo (Lieberman, 1980-b).

## **INERVACION SIMPATICA.**

Se conoce su existencia desde hace más de cien años, aunque su función en la cóclea no ha sido aclarada completamente (Spoendlin, 1984). Se ha supuesto su participación en la homeostasis de los fluidos y en la nutrición del órgano de Corti (Arnold, 1951), aunque su papel funcional aún es objeto de discusión.

Dependiendo del origen de esta inervación simpática se pueden distinguir dos componentes (Spoendlin y Lichtensteiger, 1966 y 1967), uno mayoritario, se origina en el ganglio cervical superior (Gil-Loyzaga y cols., 1997; Gil-Loyzaga y cols., 1998), donde se halla el cuerpo neuronal, formando un manguito perivascular para la carótida interna (Pérez-Casas y Bengoechea 1977); sus fibras amielínicas se distribuyen por el modiollo, ganglio espiral y lámina espiral ósea, sin llegar a penetrar en el órgano de Corti (Spoendlin y Lichtensteiger, 1966; Densert, 1974) y sin relación con la trama vascular. Parecen estar relacionadas estas fibras simpáticas con la generación del potencial de acción (Spoendlin y Lichtensteiger, 1966), aunque otros autores han apreciado una disminución de la amplitud del mismo tras la simpatectomía cervical (Hultcrantz y cols., 1982) y un aumento en la latencia del potencial de acción al estimular dicho ganglio cervical. Sin embargo, para otros autores, no se observan importantes variaciones con la manipulación de este ganglio cervical (Baust y cols, 1964; Pickles, 1979).

El otro componente simpático es el que procede del ganglio cervical inferior o ganglio estrellado (Spoendlin, 1984), que también tiene una disposición periarterial, alrededor de la arteria vertebral (Pérez-Casas y Bengoechea, 1977); menos importante que el anterior, tiene una distribución perivascular de sus fibras, sin llegar a la estría vascular o a los capilares cocleares (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-a). Se le atribuye un efecto regulador en el flujo sanguíneo de la estría vascular mediante adrenoceptores

de tipo  $\alpha$  vasculares; estos receptores serían los responsables de una vasoconstricción al ser estimulados (Terayama y cols, 1968; Carrasco y cols, 1990).

### **SINAPSIS EN EL ÓRGANO DE CORTI.**

Dentro del órgano de Corti y de acuerdo con los elementos implicados, se podrían diferenciar cuatro tipos de sinapsis: sinapsis entre la célula ciliada interna y las dendritas de neuronas aferentes tipo I, sinapsis entre la célula ciliada externa y las dendritas de neuronas aferentes tipo II, sinapsis entre el sistema eferente lateral y las dendritas de fibras aferentes tipo I y sinapsis entre sistema eferente medial y las células ciliadas externas.

#### **I.- Sinapsis entre célula ciliada interna y aferente tipo I (sinapsis Gray tipo I).**

Esta sinapsis se establece entre el polo basal de las células ciliadas internas y las dendritas de las neuronas aferentes tipo I. Estas dendritas tienen una disposición radial desde la *habénula perforata*, diferenciándose dos tipos, según que la zona de contacto con la célula ciliada interna sea modiolar (medial) o lateral (Lieberman, 1980 a y b). Las dendritas suelen estar ramificadas en el hombre y en el cobaya (Fernández, 1951; Nadol, 1983 a y b) y no suelen estar ramificadas en el gato (Spoendlin, 1969).

Estas sinapsis Gray tipo I son asimétricas y se caracterizan por una mayor densidad de la membrana postsináptica y por la existencia, en la región presináptica, de cuerpos sinápticos rodeados de microvesículas de contenido claro (Lenoir y cols, 1980). En algunas ocasiones se localizan las vesículas sin cuerpo sináptico, hecho que puede estar relacionado con el plano de sección de la preparación. En la mayoría de las especies existe un único cuerpo sináptico por cada sinapsis; la existencia de varios cuerpos sinápticos se ha asociado a inmadurez o a mala función de las células ciliadas internas (Pujol y Lenoir, 1986). La hendidura sináptica es un espacio estrecho, variable según las especies, con un material granular denso.

Está aceptada la naturaleza química de esta sinapsis y se atribuye al glutamato el papel de principal neurotransmisor de la célula ciliada interna y responsable de la transmisión del mensaje auditivo hacia el sistema nervioso central (Eybalin y cols., 1983; Eybalin y Pujol, 1983; Ryan y Schwartz, 1984); también podría participar el aspartato como neurotransmisor, así como otras sustancias (Eybalin, 1993).

**II.- Sinapsis entre sistema eferente lateral y fibras aferentes tipo I** (sinapsis Gray tipo II).

El contacto sináptico se produce entre las terminaciones axónicas del sistema eferente lateral y las dendritas de las fibras aferentes tipo I, dentro del plexo espiral interno, bajo las células ciliadas internas -sinapsis axodendríticas- (Lieberman, 1980-b). Cada fibra eferente hace sinapsis con más de una dendrita aferente radial y cada dendrita recibe al menos una sinapsis de las fibras eferentes.

La mayoría de estas sinapsis axodendríticas son “en passant” y se hacen en una zona de la dendrita que no muestra especialización; sin embargo, las varicosidades de la fibra eferente están repletas de dos tipos de vesículas, unas claras y pequeñas y otras densas y grandes (Pujol y Lenoir, 1986).

También pueden demostrarse otros dos subtipos de sinapsis, una directa axosomática entre las fibras eferentes y el cuerpo celular de las células ciliadas internas, y el otro subtipo es una sinapsis “en passant” eferente-eferente (Lieberman, 1980-b), entre el sistema eferente medial y el lateral, posiblemente entre neuronas del mismo sistema eferente, pero conteniendo diferentes neurotransmisores o neuromoduladores (Pujol y Lenoir, 1986).

Los neurotransmisores identificados en las terminales nerviosas eferentes de estas sinapsis son acetil-colina, GABA, dopamina y serotonina, y entre los neuromoduladores se incluyen los péptidos opioides, encefalinas y dinorfinas, y el péptido relacionado con

el gen de la calcitonina (CGRP) (Gil-Loyzaga y cols., 1997; Vicente-Torres y cols., 1998; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

### **III.- Sinapsis entre células ciliadas externas y fibras aferentes tipo II.**

Las fibras de las neuronas aferentes tipo II carecen de mielina, cruzan el túnel de Corti por su parte basal y siguen una distribución en espiral entre las células de Deiters hasta llegar a las células ciliadas externas. Esta sinapsis es de tipo asimétrico y está constituida por la membrana de la célula ciliada externa y pequeños botones sinápticos de las dendritas de las fibras aferentes tipo II, que en algunas ocasiones labran una cavidad en la membrana de la célula ciliada.

Existe escasa cantidad de vesículas presinápticas de contenido claro, carecen de cuerpo sináptico, aunque esta es una variación entre diferentes especies y pueden aparecer en estadios precoces de la sinaptogénesis para luego ir disminuyendo y desaparecer a medida que las fibras eferentes se van haciendo más numerosas a nivel de la célula ciliada externa, y las aferentes más escasas (Lenoir y cols., 1980; Pujol, 1985). Este cuerpo presináptico también ha sido descrito en el hombre (Nadol, 1983-a).

Diferentes experimentos en los que se ha empleado el ácido kaínico, han puesto de evidencia que las células ciliadas externas, en estadios precoces del desarrollo, estarían inervadas por fibras aferentes tipo I y II, radiales y espirales respectivamente, pero posteriormente a medida que se desarrolla el sistema eferente medial, el aferente radial se va retrayendo (Pujol y cols, 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b).

También se ha puesto de manifiesto que en la parte basal de la cóclea donde la inervación eferente medial está más desarrollada, la inervación aferente radial no existe o es muy escasa, a diferencia de lo que ocurre en la región apical, donde la inervación eferente medial es más escasa y la inervación aferente radial está presente (Pujol y Lenoir, 1986). Se desconoce el neurotransmisor de la sinapsis entre célula ciliada

externa y la aferente tipo II.

**IV.- Sinapsis entre células ciliadas externas y fibras eferentes mediales**  
(sinapsis Gray tipo I).

Las neuronas eferentes de esta sinapsis pertenecen al sistema eferente medial, cuyo origen está mayoritariamente en el cuerpo trapezoides contralateral (Warr, 1975; Warr y Guinan, 1979); son fibras que están mielinizadas hasta la *habénula perforata* y tienen un trayecto en el haz espiral interno bajo las células ciliadas internas, cruzan el túnel de Corti por su mitad superior y llegan a la base de la célula ciliada externa de forma radial, contactando con su región basal mediante sinapsis axosomáticas de gran tamaño (Engström 1960; Iurato, 1962; Nadol, 1983-a). Cada fibra eferente contactaría con unas 10 células ciliadas externas (Pujol y Lenoir, 1986).

En la porción presináptica se localizan abundantes microvesículas de contenido claro y de tamaño homogéneo, que a veces aparecen asociadas en racimos; más próximas al núcleo se encuentran abundantes mitocondrias (Pujol y cols., 1979; Pujol y Lenoir, 1986), lo que indica un recambio metabólico elevado a este nivel.

En la porción postsináptica se han identificado cisternas reticulares, próximas a la membrana de la célula ciliada externa, que son diferentes de las cisternas laminares que se hallan próximas a la membrana celular de las zonas no sinápticas (Pujol y cols, 1986).

Los neurotransmisores identificados en esta sinapsis son acetil-colina (Klinke y Galley, 1974; Eybalin y Pujol, 1984), la proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP), y en el segmento más apical, se ha identificado GABA (Drescher y cols., 1983; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999) y recientemente, también se ha identificado serotonina a este nivel y bajo las células ciliadas internas (Gil-Loyzaga y cols., 1997; Vicente-Torres y cols., 1998).

### **VIA AUDITIVA ASCENDENTE.**

Las neuronas aferentes tipo I y II del ganglio espiral de Corti, emiten unas prolongaciones periféricas llamadas dendritas que llegan hasta las células ciliadas, y una prolongación central, axón, que llega hasta los núcleos cocleares; los axones de las diferentes neuronas aferentes se reúnen a nivel de la criba espiroidea de la cóclea para formar el nervio coclear, que a través del conducto auditivo interno llega al tronco cerebral o bulbo raquídeo y, a nivel de los núcleos cocleares, harían sinapsis con la segunda neurona de esta vía auditiva.

El estudio y el conocimiento fundado de los núcleos cocleares se inició con Cajal (1909), pero el mayor impulso se debió a los trabajos de Lorente de No (1933). Dentro de la estructura compleja de los núcleos cocleares se puede diferenciar un núcleo coclear dorsal (NCD) y uno ventral (NCV), que a su vez se divide en anteroventral (NCAV) y posteroventral (NCPV). Una vez dentro de los núcleos cocleares, los axones de las neuronas del nervio coclear tomarán una doble dirección, una anterior y ascendente hacia el núcleo anteroventral (NCAV) y otra posterior y descendente que se proyecta en el núcleo coclear posteroventral, terminando en el núcleo coclear dorsal (NCD) (Gil-Loyzaga y Pujol,1999).

Se ha observado una **distribución tonotópica** de las neuronas dentro de los núcleos cocleares, y así la zona basal de la cóclea, que se corresponde con las fibras más periféricas del nervio coclear, proyectaría sobre la región más profunda de los núcleos cocleares; a su vez la zona apical correspondiente a frecuencias graves, con localización en la zona central del nervio coclear, proyectaría sobre las zonas más superficiales de los núcleos cocleares (Lorente de No, 1933).

La mayoría de las fibras nerviosas procedentes de los núcleos cocleares se decusan antes de llegar a la siguiente estación de la vía auditiva, formando parte de las

estrías acústicas:

- **Dorsal de Von Monakow:** Proceden del núcleo coclear dorsal y llegan al colículo inferior y al núcleo del lemnisco lateral.
- **Intermedia de Held:** Procedente de la región posterior del núcleo coclear ventral anterior, llegan a los núcleos periolivares.
- **Ventral o fascículo del cuerpo trapezoides de Flechsig:** Se originan en la región anterior del núcleo coclear ventral anterior, llegando a los núcleos del complejo olivar superior y al colículo inferior o tubérculo cuadrigémino inferior.

Las fibras procedentes de los núcleos cocleares harían sinapsis con las neuronas existentes en el denominado complejo olivar superior (la oliva lateral, la oliva medial superior y el cuerpo trapezoide).

Desde aquí las neuronas del complejo olivar superior junto con las procedentes de los núcleos cocleares que no hacen sinapsis en el complejo olivar, se unirían para formar el fascículo del lemnisco lateral. Parte de las fibras cruzan al lado contralateral por la **comisura de Probs** y la mayoría harían sinapsis en el tubérculo cuadrigémino inferior o colículo inferior y, posteriormente, contactan con las neuronas del cuerpo geniculado medial (del tálamo homolateral), que se proyectaría hacia la corteza auditiva, localizada en la circunvolución temporal, por debajo de la cisura de Silvio (áreas 22, 41 y 42 de Brodman). Existe entrecruzamiento de fibras de una corteza auditiva a otra a través del cuerpo caloso, son las conexiones cortico-corticales (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

## **FISIOLOGIA DEL SISTEMA AUDITIVO.**

La audición de sonidos es un hecho extremadamente complejo cuando se analizan con detalle los procesos que intervienen en el mismo y cuando se valora la participación de cada uno de los elementos del sistema auditivo, el oído externo, el oído medio o el oído interno y las vías de conducción centrales. El sonido producido en el entorno del individuo es captado por el oído externo y es transmitido, con ciertos matices, hacia el oído interno por las estructuras del oído medio; en el oído interno se transforma en otro tipo de señal apta para ser conducida por las diferentes estaciones de las vías auditivas de conducción central hasta la corteza auditiva, donde será interpretada. Cada elemento de esta vía contribuye a la audición de manera diferente.

### **FISIOLOGÍA DEL OÍDO EXTERNO.**

El oído externo tiene como función la captación de sonidos, que son percibidos como ondas de presión de intensidad variable según la frecuencia y la amplitud de las mismas, y transmitirlos hasta la membrana timpánica.

La función del pabellón auricular es la de actuar de pantalla captadora de ondas y de hacerlas converger hacia el conducto auditivo externo (CAE) y a través de este hacia la membrana timpánica (Dancer, 1979). En la mayoría de los mamíferos que perciben altas frecuencias el pabellón auricular es móvil, permitiendo con ello la localización de la fuente sonora; en el ser humano la musculatura del pabellón auricular es casi atrófica y por lo tanto éste es escasamente móvil, aunque también se ha demostrado que puede intervenir en la localización del sonido mediante el análisis de las diferencias de intensidad y de tiempo en la señal percibida por ambos oídos (Pickles, 1988). Von Békésy demostró que gracias al pabellón auricular se consigue un aumento de 5 a 10 dB (SPL) en la intensidad de la onda de sonido (Von Békésy, 1932), aunque sólo para las frecuencias agudas de alrededor de 5 kHz (Shaw, 1974). Estudios más recientes

(Palomar, 1992; Durrant y Lovrinic, 1995) han demostrado una mayor contribución a la audición por parte del oído externo, que suponen ganancias de hasta 15 dB.

Por su parte el conducto auditivo externo tiene como funciones el conducir las ondas desde el exterior hasta la membrana timpánica, la de proteger las estructuras del oído medio y también interviene en la amplificación de la intensidad del sonido entre 5 y 10 dB (SPL) en un rango de frecuencias alrededor de los 2,5 kHz (Shaw, 1979) y entre los 8 y 12 kHz, sin notarse diferencias para las frecuencias graves (Durrant y Lovrinic, 1995). Considerado como elemento conductor, el conducto auditivo externo permite modificar la presión del sonido entre el exterior y la membrana timpánica (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b), comportándose como un adaptador de impedancias entre el medio aéreo y el tímpano (Durrant y Lovrinic, 1995).

La protección del oído medio se consigue gracias a su disposición en “S” itálica, con varios pliegues en su trayecto que evitan los traumatismos directos sobre el oído medio; también posee glándulas sebáceas formando parte de un folículo pilosebáceo y glándulas ceruminosas que producen cera, donde quedarán depositadas partículas de polvo que posteriormente serán arrastradas hacia la concha del pabellón auditivo con la cera y gracias a los desplazamientos del epitelio del conducto.

Todas estas estructuras del conducto auditivo contribuyen a igualar la temperatura a ambos lados de la membrana timpánica (temperatura corporal), con lo que se evitaban los movimientos brownianos de las moléculas del aire, que a su vez producirían movimientos en la membrana timpánica que interferirían con el proceso normal de la audición (Harris, 1968).

### **FISIOLOGIA DEL OIDO MEDIO.**

La principal vía de llegada del sonido desde el oído externo al oído interno es a través de la cadena tímpano-osicular del oído medio, aunque esta no es la única vía de

transmisión del sonido, ya que también se pueden transmitir a través del medio aéreo de la caja timpánica o empleando la transmisión ósea de los huesos del cráneo. Cuando la transmisión es a través de la cadena tímpano-osicular o a través del medio aéreo de la caja timpánica, el sonido hace vibrar las membranas de la ventana oval o redonda y esta vibración se transmite a la perilinfa. Cuando la transmisión es por vía ósea, la vibración de los huesos del cráneo se transmite hasta el hueso que recubre la cóclea y de éste a la perilinfa (Uziel, 1985).

Von Békésy estableció la existencia de diferentes patrones de transmisión ósea según se trate de frecuencias agudas o graves; para frecuencias graves el cráneo vibra como si se tratara de un cuerpo rígido, mientras que en el caso de frecuencias agudas vibra como si se tratara de un cuerpo flexible (Kirikae, 1959); sin embargo para que un sonido pueda ser transmitido por esta vía ósea, debe alcanzar al menos los 50 dB de intensidad (Gil-Carcedo, 1995).

En el oído medio vamos a referirnos a la vía de transmisión tímpano-osicular, teniendo en cuenta los diferentes elementos que influyen en esta transmisión como son las membranas timpánica, la ventana oval, los huesecillos (martillo, yunque, estribo, con sus articulaciones, ligamentos y músculos correspondientes), la trompa de Eustaquio y las cavidades aéreas del oído medio (antro y celdillas mastoideas). Este sistema se ha ido desarrollando con la evolución, siendo más simple en los insectos y en los anfibios y más complejo en los mamíferos terrestres.

Se pueden destacar tres funciones en el oído medio, la transmisión de las ondas sonoras desde el oído externo hasta el oído interno, la adaptación de impedancias entre el medio aéreo (oído externo) y el medio líquido (oído interno), la protección del oído interno frente a lesiones producidas por exceso de energía sonora externa, mediante el reflejo estapedial (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

El complejo tímpano-osicular tiene como principal misión la de **transformar las ondas acústicas en desplazamientos mecánicos** y estos desplazamientos en ondas de presión en los líquidos del oído interno; debido a la incompresibilidad de los líquidos, estas ondas de presión se pueden originar gracias a la existencia de las ventanas redonda y oval en la cóclea y a que estas se desplazan en sentido contrario cuando llega el sonido, vibran en fases opuestas.

El tímpano es una membrana elástica y tensa que se desplaza con ondas de presión muy débiles; la tensión y la elasticidad se deben a la disposición radial y circular de sus fibras, y la amplitud del desplazamiento depende de la frecuencia y de la intensidad de la señal sonora. Todas las mediciones indican que el desplazamiento mínimo del tímpano, para producir sensación sonora, es de alrededor de  $10^{-12}$  metros, lo que se consigue con una variación de presión de alrededor de  $2 \times 10^{-5}$  pascales (Cazals, 1985).

Los estudios de la membrana timpánica y de sus desplazamientos los comenzó Helmholtz (Helmholtz, 1868), quién consideraba que existían en la membrana timpánica dos zonas de vibración que se localizaban por delante y por detrás del mango del martillo y donde la amplitud del desplazamiento era máxima. Esta teoría se mantuvo hasta los trabajos de Békésy (Békésy, 1941) que consideraba al tímpano como una membrana rígida, con un eje de desplazamiento a nivel del cuello del martillo perpendicular al eje del mismo, y con un máximo desplazamiento en cuadrantes inferiores, entre el ombligo y el marco timpanal. Posteriormente y con técnicas de estudio más exactas, como es la holografía LASER (Tonndorf y Khana, 1972), se ha llegado a demostrar que la hipótesis de Helmholtz era la más cercana a la realidad, observando que la zona de máximo desplazamiento, para frecuencias graves, está en el cuadrante posterosuperior de la membrana timpánica (Uziel, 1985).

La articulación entre las cabezas del martillo y del yunque (articulación incudo-maleolar) es del tipo de encaje recíproco, es poco móvil debido a la fijación del martillo en el espesor del tímpano, ayudado por el músculo del martillo y a la fijación de la cabeza del martillo y del yunque por los ligamentos; ambos huesos se desplazan en bloque, y en algunos animales (roedores) estos dos huesos aparecen fusionados (columela).

En los movimientos de la cadena tímpano-oticular podemos diferenciar tres ejes de rotación, uno tímpano-maleo-incudal, uno incudo-estapedial y el estapedio-vestibular. El principal eje de rotación de la articulación tímpano-maleo-incudal es horizontal y va desde la fosa incudis hasta el ligamento maleolar anterior, y coincide con el eje de oscilación del tímpano. El centro de este eje coincide con el centro de gravedad de la cadena de huesecillos. Debido a la escasa movilidad de la articulación incudo-maleolar, los movimientos de este complejo (tímpano-maleolo-incudal) se transmiten en bloque hacia el estribo a través de la articulación incudo-estapedial.

El eje de rotación de la articulación incudo-estapedial permite movimientos de rotación del estribo en dos planos del espacio, el horizontal y el vertical. A bajas intensidades de estímulo, el eje de rotación es vertical y por lo tanto el desplazamiento del estribo se hace en un plano horizontal; a altas intensidades de estímulo (por encima de 120 dB SPL) el eje de rotación es horizontal y por lo tanto los desplazamientos del estribo se hacen en un plano vertical, con lo que se consigue que los líquidos laberínticos se desplacen mínimamente, evitando lesiones en la cóclea (Uziel, 1985).

La articulación estapedio-vestibular tiene un movimiento de pistón, pero es asimétrico debido a la diferente longitud del ligamento anular que es más laxo y de fibras más largas en su parte anterior. La vibración de la platina del estribo se transmite a la perilinfa de la cóclea, iniciándose una onda de presión en la rampa vestibular que a

través del helicotrema llega a la rampa timpánica y, a lo largo de ella, a la ventana redonda. Esta onda de presión se origina gracias al juego de ventanas, con un movimiento de las membranas que las cierran, en sentido contrario.

La segunda misión destacada del oído medio es la de funcionar como un sistema **adaptador de impedancias** entre el medio aéreo del oído externo y el medio líquido del oído interno. El medio líquido presenta una impedancia 40-50 veces superior a la del medio aéreo, por lo que la mayoría de las ondas que alcanzaran directamente el oído interno serían reflejadas, de no existir el oído medio (Gil-Carcedo, 1995), lo que se traduciría en una pérdida de energía de la onda sonora de aproximadamente 30 dB.

Este sistema de adaptación de impedancias se consigue gracias a dos medios de amplificación, uno es el mecanismo de palanca de los huesecillos y el otro es la relación de superficies entre el tímpano y la ventana oval. El mecanismo de palanca permite amplificar 1,3 veces la energía sonora entre la membrana timpánica y la ventana oval, que es la relación existente entre mango del martillo (1,3)/apófisis larga del yunque (1). El tamaño real de la membrana timpánica es de 85 mm<sup>2</sup>, pero la superficie que realmente interviene en la vibración y en la transmisión del sonido se ha calculado en 55 mm<sup>2</sup>; la superficie de la platina del estribo es de 3,2 mm<sup>2</sup>; por lo tanto, la relación de superficies es de 55/3,2 o lo que es lo mismo 17/1, que sería el coeficiente de amplificación debida a la relación de superficies de tímpano/platina del estribo. Teniendo en cuenta los dos mecanismos, se puede concluir que la presión que ejerce la platina del estribo sobre la perilinfa es 22 (17 X 1,3) veces mayor que la ejercida por la onda sonora sobre la membrana timpánica. Esta amplificación supone una ganancia aproximada de 27 dB, lo que permite compensar la pérdida debida a la interfase aire/líquido (Uziel, 1985).

La efectividad de este sistema tímpano-osicular para la transmisión de sonidos y

para adaptar impedancias es del 46% en los humanos, claramente en desventaja con respecto a otros mamíferos como en el gato cuya efectividad es del 74% y en el cobaya que es del 82% (Zwislocki, 1975).

En el estudio de la transmisión del sonido y de la adaptación de impedancias hemos de tener en cuenta las características del estímulo sonoro (frecuencia, intensidad, etc.) y las propiedades físicas del sistema de transmisión, como son la masa y la elasticidad (o lo que es lo mismo la resistencia o su opuesto la impedancia) del sistema tímpano-oscicular y del oído medio. La masa depende del sistema de los huesecillos y la elasticidad va a depender de la membrana timpánica, del ligamento anular, de los ligamentos suspensorios de los huesecillos, de los tendones, de las articulaciones interosiculares y sobre todo de las cavidades del oído medio (celdas mastoideas, caja timpánica y antro mastoideo). Todos estos elementos aumentan las resistencias del sistema, se oponen al paso de energía sonora y por lo tanto disminuyen la impedancia.

La tercera función reconocida del oído medio es la de **proteger al oído interno de altas intensidades de energía sonora**, lo que se consigue gracias al reflejo acústico-facial. En éste intervienen los músculos del estribo y del martillo, sin embargo la contracción del músculo del martillo solamente se produce a intensidades sonoras muy altas (Holst y cols, 1962), de ahí que el principal componente del reflejo acústico sea debido a la contracción del músculo del estribo, lo que explica que a este reflejo se le denomine como **reflejo estapedial**. Este reflejo fue estudiado por primera vez por Lüscher (Lüscher, 1929) mediante examen directo a través de una perforación timpánica, y posteriormente se hicieron estudios electromiográficos del músculo del estribo (Fisch y Von Schulthess, 1963).

Se trata de un reflejo bilateral aunque la estimulación haya sido unilateral y puede ser desencadenado por estímulos no acústicos, eléctricos o táctiles (Djupestrand y cols.,

1967); se trata de un reflejo polisináptico en el que intervendrían al menos cuatro neuronas (Borg, 1972 y 1973). La vía aferente estaría formada por las fibras del nervio coclear, como primer escalón, que llegarían a los núcleos cocleares ventrales, la segunda neurona llegaría desde los núcleos cocleares hasta el complejo olivar superior ipsi y contralateral, el tercer escalón serían las neuronas que unen el complejo olivar superior con el núcleo motor del nervio facial. La vía eferente estaría formada por las neuronas procedentes del núcleo motor del nervio facial y destinadas al músculo del estribo, que siguiendo el trayecto del nervio facial, abandonan el conducto de Falopio en su tercera porción, llegando hasta el músculo del estribo (Gersdorff, 1978; Uziel, 1985).

Del reflejo estapedial se estudian una serie de parámetros como son el umbral, el tiempo de latencia y la amplitud de la respuesta. El umbral del reflejo estapedial está comprendido entre 70 y 90 dB (HL) por encima del umbral auditivo (Möller, 1961; Jerger, 1970; Chivellars y cols, 1973) y este se puede ver modificado por una serie de factores como son:

- la edad del sujeto, más elevado en niños y ancianos.
- el oído estimulado, cuando la estimulación es ipsilateral el umbral es más bajo (Reken, 1977).
- la duración del estímulo sonoro, el umbral es más elevado en el caso de estímulos breves.
- el tipo de estímulo empleado, es más alto el umbral cuando se emplean estímulos de tonos puros agudos (Chiveralls y Fitz Simons, 1973).

El tiempo de latencia mínimo desde que se estimula el oído y se contrae el músculo del estribo, medido por electromiografía, es de 10 milisegundos, aunque depende de la frecuencia y de la intensidad del estímulo y puede llegar a 150 milisegundos cuando el estímulo es poco intenso; esta latencia tan alta del reflejo

acústico-facial no sirve para proteger al receptor auditivo frente sonidos bruscos, aunque si lo hace frente a sonidos intensos y mantenidos. La amplitud de la respuesta refleja aumenta al aumentar la intensidad del estímulo hasta llegar a 30 dB por encima del umbral reflejo, donde se estabiliza (Gersdorff, 1978).

El papel funcional del reflejo estapedial es triple, por una parte aumenta el campo dinámico de la audición ya que con la contracción del músculo del estribo se conseguiría que aumentos importantes de la intensidad del estímulo no se tradujeran en aumentos tan importantes en la intensidad de la señal que llega a la cóclea (Borg, 1972), este reflejo sería eficaz para sonidos de larga duración y frecuencias graves; por otra parte disminuye el efecto de enmascaramiento, los sonidos graves enmascararían los sonidos agudos y al contraerse el músculo del estribo se reduciría la zona de frecuencias graves; en tercer lugar modificaría la adaptación auditiva, sería capaz de disminuir la respuesta del sistema auditivo a una estimulación sonora (Uziel, 1985).

### **Fisiología de la trompa de Eustaquio.**

La trompa de Eustaquio es la única comunicación natural entre el oído medio y el medio exterior, representado por la nasofaringe; a su través se equilibran las presiones entre ambas regiones, protegiendo al órgano auditivo de variaciones bruscas de presión. En condiciones normales permanece cerrada, abriéndose brevemente con la deglución o con las maniobras de Valsalva, durante 0,5 seg. aproximadamente.

Los músculos que intervienen en la apertura de la trompa son el periestafilino externo o tensor del velo del paladar y el periestafilino interno o elevador del velo del paladar; ambos están inervados por ramas del V par craneal (Nervio trigémino) y tienen una acción conjunta, se contraen simultáneamente. Estos músculos guardan relación con el músculo del martillo o tensor del tímpano, y se ha demostrado que su acción es sincrónica con la acción de los dos anteriores, al producirse la apertura de la trompa se

contrae el tensor del tímpano y se reduce el volumen de la caja timpánica, expulsándose el aire hacia la trompa y hacia la rinofaringe.

Cuando la trompa permanece cerrada largo tiempo (cuadros catarrales), la presión del oído medio se negativiza, debido fundamentalmente a la reabsorción del oxígeno de la cavidad por los capilares de la mucosa, lo que conlleva una retracción de la membrana timpánica y, si esta situación se mantiene, se producirá un trasudado a la cavidad procedente de los vasos de la mucosa, lo que provoca un aumento de la resistencia y una disminución de la impedancia del oído medio.

La trompa de Eustaquio contribuye a facilitar la transmisión del sonido en el oído medio manteniendo un buen equilibrio de presiones, con lo que se consigue una buena impedancia del sistema tímpano-osicular y por lo tanto una disminución de la resistencia del mismo.

### **FISIOLOGIA DEL RECEPTOR AUDITIVO.**

Solamente en las primeras semanas de la vida la cóclea adquiere una agudeza similar a la del adulto, mientras se completa la mielinización del nervio auditivo.

La fisiología coclear comprende todos los fenómenos que ocurren dentro de la cóclea desde que llega un sonido y hace vibrar la platina del estribo hasta que se produce un potencial de acción en las fibras aferentes tipo I del ganglio espiral. Dentro de las funciones auditivas y de los procesos que ocurren dentro de la cóclea podemos distinguir una mecánica del receptor, una micromecánica coclear y una transducción mecano-eléctrica. La mecánica coclear interpreta la cóclea como un sistema dinámico y analiza los movimientos de los líquidos (perilinfia y endolinfia) y de las membranas; la micromecánica coclear describe el funcionamiento del órgano de Corti, las células ciliadas y la membrana tectoria; la transducción mecano-eléctrica describe la transformación de un fenómeno físico, el movimiento de la membrana basilar, en

eléctrico, el potencial de acción compuesto, que se produce a nivel de las células ciliadas internas y de las fibras aferentes tipo I.

### **MECANICA EN EL RECEPTOR AUDITIVO.**

Las vibraciones moleculares de las ondas del sonido se transmiten al complejo tímpano-oscicular y, en forma de energía mecánica (desplazamientos), son conducidas hasta la platina del estribo; los desplazamientos de la platina del estribo originan una onda de presión en los líquidos de la cóclea (perilinfia), favorecido por la existencia de la ventana redonda que realiza un desplazamiento en fase opuesta a la platina del estribo. De no existir esta membrana elástica que cierra la ventana redonda no se podría generar una onda de presión dentro de una cavidad rígida rellena de líquido, como es la cóclea (Aran y Harrison, 1985). Esta onda de presión produce un desplazamiento de la membrana basilar y por lo tanto del órgano de Corti, iniciándose los fenómenos de micromecánica coclear.

Existen dos teorías para interpretar que zona de la membrana basilar se desplaza dependiendo de la frecuencia y de la intensidad del estímulo recibido, como son la de Helmholtz (Helmholtz, 1868 y 1885), que describió la teoría de los resonadores y la de Békésy (Békésy, 1960) conocida como la teoría de la onda viajera.

Según la teoría de los **resonadores** (Helmholtz, 1885) la membrana basilar de la cóclea estaría dividida en unidades independientes entre sí, dispuestas de manera similar a las teclas de un piano, y cada una de estas unidades se activaría con una única frecuencia, llamada **frecuencia característica**. Esta teoría solamente atribuye papeles pasivos a la membrana basilar, sin intervención de fenómenos activos, a los que hoy en día se les está dando mayor preponderancia.

La segunda gran teoría es la de la **onda viajera** (Békésy, 1960) y se basa en observaciones directas de la membrana basilar; Von Békésy fue el primero en describir

las características de elasticidad de la membrana basilar, y para ello empleó iluminación estroboscópica sincrónica, lo que le permitió captar el movimiento de la membrana basilar. La onda viajera se iniciaría en la ventana oval y se transmitiría longitudinalmente a lo largo de toda la membrana basilar (Zwislocki, 1986), desde la base de la cóclea hasta el helicotrema, originando un desplazamiento vertical de esta membrana que va aumentando de amplitud, haciéndose máximo en un lugar concreto para cada frecuencia y disminuyendo bruscamente una vez alcanzado este máximo (Berlin, 1984; Aran y cols., 1988; Durrant y Lovrinic, 1995). Von Békésy observó que para frecuencias agudas, la máxima amplitud del desplazamiento estaría situada más próxima a la base, y al contrario, en las frecuencias graves (hasta 200 Hz) la zona del máximo desplazamiento basilar se situaría próxima al ápex coclear; frecuencias menores de 200 Hz hacen vibrar a toda la membrana basilar, sin encontrar un máximo en una región concreta (Aran y Harrison, 1985). Por lo tanto, para Von Békésy, la membrana basilar se comportaría como un analizador del sonido que realiza el papel de un filtro acústico frecuencial (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b).

Con posterioridad a los trabajos de Von Békésy, realizados en cadáveres, se han desarrollado otros estudios más sensibles que miden los desplazamientos de la membrana basilar en animales vivos. Uno de ellos emplea **sondas de capacitancia** situadas próximas a la membrana basilar, que registran la capacitancia eléctrica existente entre la sonda y la membrana basilar y que es inversamente proporcional a la distancia, con lo cual se pueden conocer los desplazamientos de dicha membrana (Wilson, 1973); las conclusiones son similares a las obtenidas por Von Békésy.

Otro método de estudio empleado es el **efecto Mössbauer** (Johnstone y Boyle, 1967; Rhode, 1971), que registra las vibraciones de la membrana basilar mediante una fuente radiactiva colocada sobre la misma; según este método la curva de respuesta

mecánica de la membrana basilar es más puntiaguda cuando la estimulación sonora es más débil (Aran y Harrison, 1985), dato que apunta hacia una selectividad frecuencial de la cóclea, que se hace mucho mayor cuando la intensidad de la estimulación está más próxima al umbral.

De estas dos teorías y de los diferentes métodos de estudio de los desplazamientos de la membrana basilar, se puede concluir que el primer análisis frecuencial de los sonidos se realiza en esta membrana y que se corresponde con una localización concreta para cada frecuencia, que coincide con la zona de máxima vibración de la membrana basilar (**tonotopía frecuencial coclear o cocleotopía**).

Estas dos teorías adjudicarían a la cóclea, y en concreto a la membrana basilar, un papel pasivo en la percepción de los sonidos; sin embargo, los trabajos de Kemp (Kemp, 1978) pusieron de evidencia la existencia de mecanismos activos cocleares, que provocarían unas vibraciones activas inducidas sobre la membrana basilar, produciendo un sonido registrable en el conducto auditivo externo mediante un micrófono de alta sensibilidad (otoemisiones). Únicamente este reconocido proceso activo podría proporcionar una explicación coherente para el problema fundamental de la alta selectividad frecuencial de la cóclea.

El estudio de la actividad eléctrica de las fibras aisladas del nervio auditivo, al estimular la cóclea con frecuencias puras a intensidades medias y bajas, indica que solamente un pequeño grupo de estas fibras nerviosas aferentes presentan un potencial de acción tras la estimulación (Kiang y cols., 1982). Dichas fibras se corresponderían con las zonas de máximo desplazamiento de la membrana basilar, observadas por Von Békésy, lo que sugiere que entre el “primer filtro” frecuencial de la membrana basilar y la actividad neuronal debería existir un “segundo filtro” que ajustaría las curvas de desplazamiento basilar a las de sintonía neural (Durrant y Lovrinic, 1995). Diferentes

estudios electrofisiológicos sobre la actividad de las células ciliadas internas demuestran que tienen idéntica selectividad frecuencial que las fibras nerviosas aferentes (Russell y Sellick, 1978 y 1983), por lo que habría que suponer que el mecanismo responsable de esta alta selectividad frecuencial debe encontrarse entre la membrana basilar y las células ciliadas internas (Durrant y Lovrinic, 1995).

Todas las investigaciones apuntarían hacia las células ciliadas externas como las principales responsables del proceso coclear activo, ya que se ha demostrado que tienen propiedades contráctiles (Brownell, 1983); también se ha podido observar que la lesión de las células ciliadas internas se acompaña de una moderada pérdida de selectividad frecuencial, mientras que la lesión de las células ciliadas externas se acompaña de una pérdida total de dicha propiedad y de un aumento en el umbral auditivo correspondiente a la región afectada. Por lo tanto, actualmente se considera que las células ciliadas externas participarían como mecanismo activo en la selectividad frecuencial del receptor auditivo y se comportarían como elementos amplificadores cocleares que se encargarían de reducir el umbral auditivo, en especial para los sonidos de intensidad media o moderada (Durrant y Lovrinic, 1995; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b).

Davis propuso un modelo coclear incluyendo un papel de amplificador para las células ciliadas externas, de acuerdo con la mayoría de las observaciones anatómicas y fisiológicas (**“teoría de la modulación de las resistencias”** de Davis), y pondría de manifiesto la existencia de una fase activa y una pasiva en el mecanismo coclear de la audición, haciendo una correspondencia con las curvas de sintonía de las fibras auditivas del nervio coclear (Davis, 1983). Los mecanismos activos sólo serían eficaces para sonidos de intensidad débil o moderada, puesto que para las altas intensidades la fase pasiva del tiempo coclear enmascararía la fase activa (Berlin, 1984; Aran y cols.,

1988; Durrant y Lovrinic, 1995; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

### **MICROMECHANICA COCLEAR.**

Está constatado que a nivel de las células ciliadas externas existe un escaso desarrollo del sistema aferente (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999) y los contactos sinápticos parecen escasos en comparación con los existentes a nivel de las células ciliadas internas (Kimura, 1975); para algunos investigadores es posible que una neurona aferente tan estrecha no esté conectada con el sistema nervioso central (Spendlin, 1979), aunque estudios más recientes demuestran la proyección central de estas fibras (Leake-Jones y Snyder, 1982); en contraste, el aporte eferente a estas células ciliadas está especialmente desarrollado (Kimura y Wersall, 1962). Todos estos datos apuntan hacia un posible papel efector, más que receptor, por parte de las células ciliadas externas (Siegel y Kim, 1982).

La evidencia más relevante sobre el posible papel efector de estas células la ha dado Brownell (Brownell, 1983; Brownell y cols, 1985), quien demostró cierto tipo de motilidad en células ciliadas externas aisladas, “in vitro”; estas modifican su longitud en respuesta a estimulaciones eléctricas intra y extracelulares, así como con la aplicación tópica de acetil-colina, uno de los neurotransmisores identificados en el sistema eferente medial que contacta con las células ciliadas externas. La base morfológica de esta motilidad podría ser el sistema de proteínas contráctiles que se localiza dentro de la célula ciliada externa (Nuttall, 1986).

La comprobación “in vitro” de las propiedades contráctiles en las células ciliadas externas proporciona una posible base para la evidencia creciente de que estas tienen un papel activo en la micromecánica del órgano de Corti (Brownell, 1983; Nuttall, 1986), y podrían estar relacionadas con la vulnerabilidad de las células ciliadas y la sintonía neural (Brown y cols., 1983), con el origen de las otoemisiones acústicas (Kemp, 1978),

y con el control eferente de la sintonía de las células ciliadas internas (Brown y Nuttall, 1984). Aunque se ha demostrado “in vitro” la contractilidad de las células ciliadas externas aisladas y no se ha podido demostrar “in vivo”, se acepta la existencia de dos tipos de contracciones, rápidas y lentas, sin conocerse claramente cuales son los estímulos que las desencadenan, ni la función clara de cada una de ellas. En cualquier caso, con la contracción lo que ocurriría sería un acortamiento longitudinal de la célula ciliada externa y un desplazamiento de los cilios que traccionarían de la membrana tectoria, produciéndose un cambio en una región reducida del órgano de Corti.

Las **contracciones rápidas** se mantienen durante pocos microsegundos, son de escasa amplitud, aproximadamente un 4% de la longitud total de la célula (Ashmore, 1987), y posiblemente guarden relación con las “cisternas laminadas” que existen en las zonas laterales de la célula, por dentro de la membrana. Se desconoce el estímulo que las desencadena (puede ser eléctrico), así como el mecanismo íntimo de la misma, aunque pudiera ser un mecanismo electro-osmótico (movimiento de fluidos inducido por un campo eléctrico próximo a una superficie cargada eléctricamente (Gil-Loyzaga y Brownell, 1988), por presencia de cationes) o por un proceso de transferencia de cargas a través de la membrana celular. En cualquiera de los dos casos (movimiento de fluidos o de cargas) se crean fuerzas longitudinales en las cisternas laminares, que acaban produciendo elongaciones y acortamientos de las células ciliadas y por lo tanto aproximación o separación de la membrana tectoria a la membrana basilar.

Estas contracciones rápidas tendrían su importancia fisiológica y se consideran la base del mecanismo activo coclear de audición, siendo fundamental para la amplificación de la vibración (40 ó 50 dB de ganancia) a bajas intensidades de estimulación, fundamental para sintonizar frecuencias (alta selectividad frecuencial) por parte del órgano de Corti (Brown y Nuttall, 1984; Brownell y cols., 1985) y

fundamental también en la génesis de las otoemisiones acústicas (Kemp, 1978).

Las **contracciones lentas**, de milisegundos de duración y de gran amplitud ya que pueden llegar a contraerse hasta el 90% de su longitud normal (Zenner y cols., 1985), tienen unas características que son superponibles a aquellas que se producen en las fibras musculares y su base fisiológica es similar, con la existencia de proteínas contráctiles (actina y miosina) en las caras laterales de las células (Drenckhahn y cols., 1982) y depósitos de  $\text{Ca}^{+2}$  almacenado en las “cisternas laminares”. Este tipo de contracciones podrían estar implicadas en el mantenimiento de un tono basal en el órgano de Corti, y dicho tono basal estaría regulado por el sistema eferente medial, que hace contactos sinápticos sobre las células ciliadas externas. La mayoría de estas sinapsis son de tipo colinérgico, lo que refuerza la analogía con la fibra muscular, y de tipo CGRP - proteína relacionada con el gen de la calcitonina- (Merchán-Pérez y cols., 1990-a; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

Este sistema eferente medial regularía las contracciones lentas de las células ciliadas externas y por lo tanto atenuaría las contracciones rápidas, realizando funciones de adaptación al ruido y protección frente a ruidos intensos (sobrestimulación). De ahí que recientemente se haya considerado a este sistema eferente medial como incluido en un sistema reflejo a nivel coclear, análogo al reflejo estapedial existente en el oído medio. También se ha observado que al activarse este sistema eferente medial se produce un incremento en los potenciales microfónicos cocleares, de ahí que se piense que las contracciones lentas de las células ciliadas externas guardan relación con dichos potenciales microfónicos.

De cualquier manera, aunque no ha podido ser demostrada “in vivo” la capacidad contráctil de las células ciliadas externas, esta tendría una gran importancia ya que estaría implicada en las interacciones mecánicas entre la membrana basilar y la

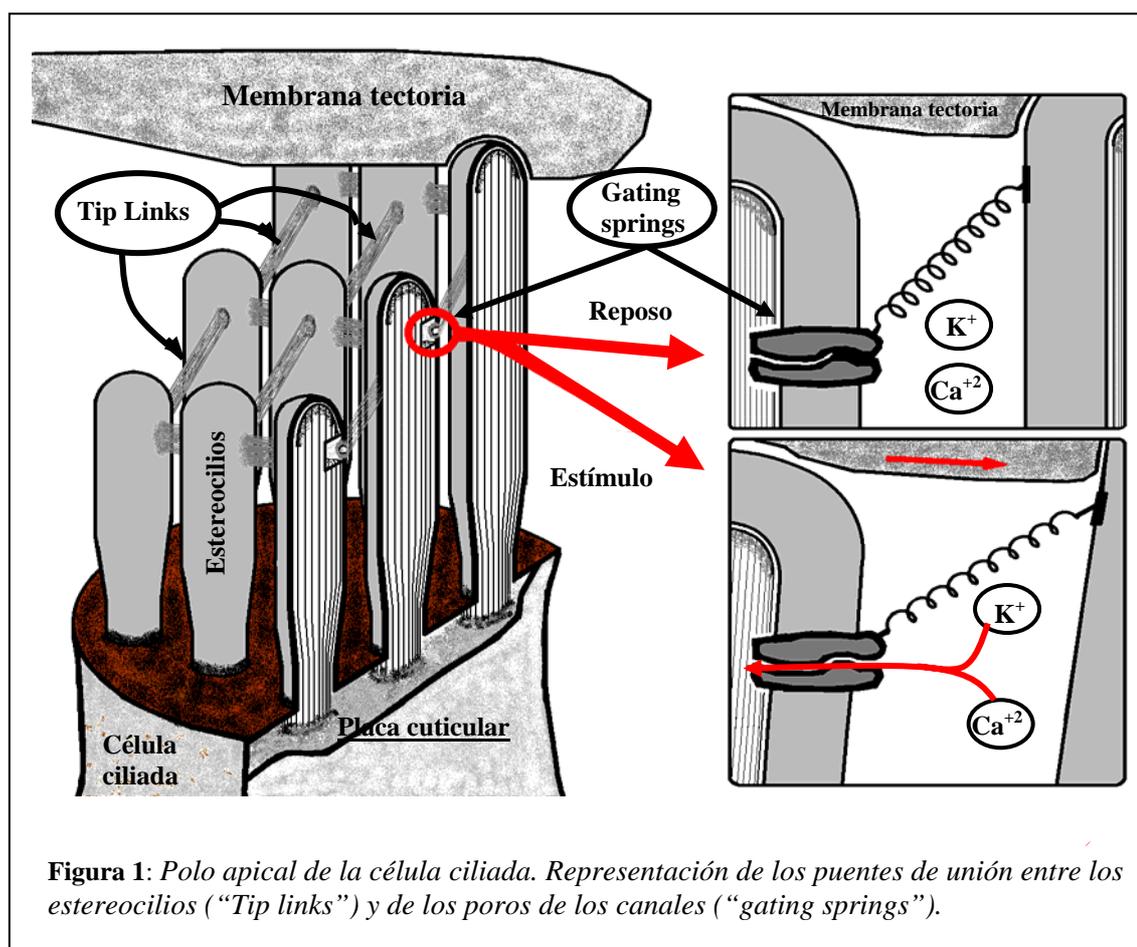
membrana tectoria, facilitando la transferencia del estímulo hacia las células ciliadas internas (contracciones rápidas) o bloqueándola (contracciones lentas) (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b).

### **TRANSDUCCION EN LAS CELULAS CILIADAS.**

Las células ciliadas del órgano de Corti son el asiento del fenómeno de transducción sensorio-neural (o mecano-eléctrica) que ocurrirá cuando los estereocilios que poseen en su cara apical en número de algunos cientos, sean desplazados lateralmente por los movimientos radiales de la membrana tectoria sobre la membrana reticular (Rusell, 1987). La membrana tectoria se desplaza cuando la onda sonora llega a la platina del estribo y con su vibración provoca una onda de presión, que acabará por desplazar a la membrana basilar (Fig. 2. Pag 70); con los movimientos de la membrana basilar se desplazan las estructuras que descansan sobre ella (las células de Deiters y las células ciliadas externas e internas). Con los desplazamientos relativos de las células ciliadas externas con respecto a la membrana tectoria, se conseguiría una deflexión de los cilios más largos en sentido lateral, arrastrando consigo a los cilios más cortos, esto provocaría una activación-despolarización de la célula ciliada externa, y acabaría con una contracción de la misma. Con esta contracción se conseguiría un desplazamiento radial de la membrana tectoria, al ser traccionada sobre la lámina reticular por las células ciliadas externas que se fijan en su cara inferior, desplazando los cilios de las células ciliadas internas en dirección lateral y provocaría una despolarización de dichas células (Fig. 1. Pag. 66).

Si los cilios son desplazados radialmente en la dirección de los estereocilios más largos (hacia la estría vascular), ocurriría una apertura de los canales y la despolarización consecuente de la célula ciliada. Si los desplazamientos de los cilios son en sentido contrario ocurriría una hiperpolarización celular (Hudspeth y Corey, 1977).

Los fenómenos eléctricos dentro de la célula ciliada ocurren en un periodo de tiempo breve, lo que hace pensar que los canales se abrirían directamente por estímulo mecánico (canales mecanosensitivos). Estos canales parecen estar situados al final de los estereocilios, próximos a los “tip links” (Hudspeth, 1985), que son uniones existentes entre los estereocilios de diferentes hileras de la misma célula ciliada (Fig. 1), que hacen que todos los estereocilios se desplacen al unísono (Hudspeth, 1982; Pickles, Comis y Osborne, 1984; Pickles, 1985; Howard y Hudspeth, 1987). Estas uniones podrían estar directamente relacionadas con el sistema mecano-sensorial de transducción. Suelen existir uno o dos canales por estereocilio y unos centenares por cada célula ciliada (Bargmann, 1994).



El poro de estos canales mecanosensitivos funcionaría como una puerta de muelle (“gating springs”), con un alto grado de selectividad direccional, que se abriría cuando

los estereocilios fueran desplazados en la dirección apropiada (Hudspeth, 1989). Se considera un estímulo activador cuando el desplazamiento de los estereocilios se dirige desde el modiolo hacia la estría vascular. Los estereocilios más largos tiran de los más cortos, permitiendo la entrada a través de los canales de los estereocilios de  $K^+$ , preferentemente, y de  $Ca^{2+}$  (Pickles y Corey, 1992), que se hallan en la endolinfa a una alta concentración, produciéndose una despolarización-activación celular; cuando el desplazamiento es en sentido contrario los “tip links” pierden tensión, suponiendo el cierre de los canales y ocurriendo una hiperpolarización celular (Corey y Hudspeth, 1983; Howard y Hudspeth, 1988). Este tipo de despolarización es excepcional y solamente se produce en las células ciliadas, auditivas y vestibulares, ya que en el resto de las células del organismo se activan únicamente por la entrada de  $Na^+$  (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b). La producción de un potencial de acción en las células ciliadas podría conducir a la liberación de un neurotransmisor en la zona basal de la célula ciliada interna o a la producción de una contracción rápida por parte de la célula ciliada externa, aproximando la membrana basilar a la lámina tectoria y dando como resultado la activación de las células ciliadas internas.

La composición de los líquidos que bañan las células ciliadas tiene importancia para entender y conocer el intercambio iónico que ocurre en las células ciliadas en el fenómeno de transducción; conviene destacar la alta concentración de  $K^+$  en la endolinfa (110-145 meq/l) y la alta concentración de  $Na^+$  en la perilinfa (140-150 meq/l). La cara basal y las laterales de las células ciliadas están bañadas por perilinfa, mientras que el polo apical y los estereocilios están bañados por la endolinfa (rica en  $K^+$ ). El potencial de reposo de las células ciliadas externas es de -70 mV, mientras que el de las células ciliadas internas es de -45 mV; por otra parte el potencial endococlear, diferencia de potencial existente entre la endolinfa y la perilinfa, es de +80 mV, y este

sería mantenido gracias al aporte de  $K^+$  que hacen las células de la estría vascular a la endolinfa. En la pared lateral de estas células existe una bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa, que atraparía  $K^+$  de los vasos y lo metería en la célula (con consumo de energía) y de esta pasaría a la endolinfa, gracias a un gradiente eléctrico (sin consumo de energía), debido a que el potencial de reposo de la célula de la estría vascular es de +90 mV. Estos parámetros son la base de la teoría de la modulación de las resistencias de Davis para la transducción (Davis, 1958).

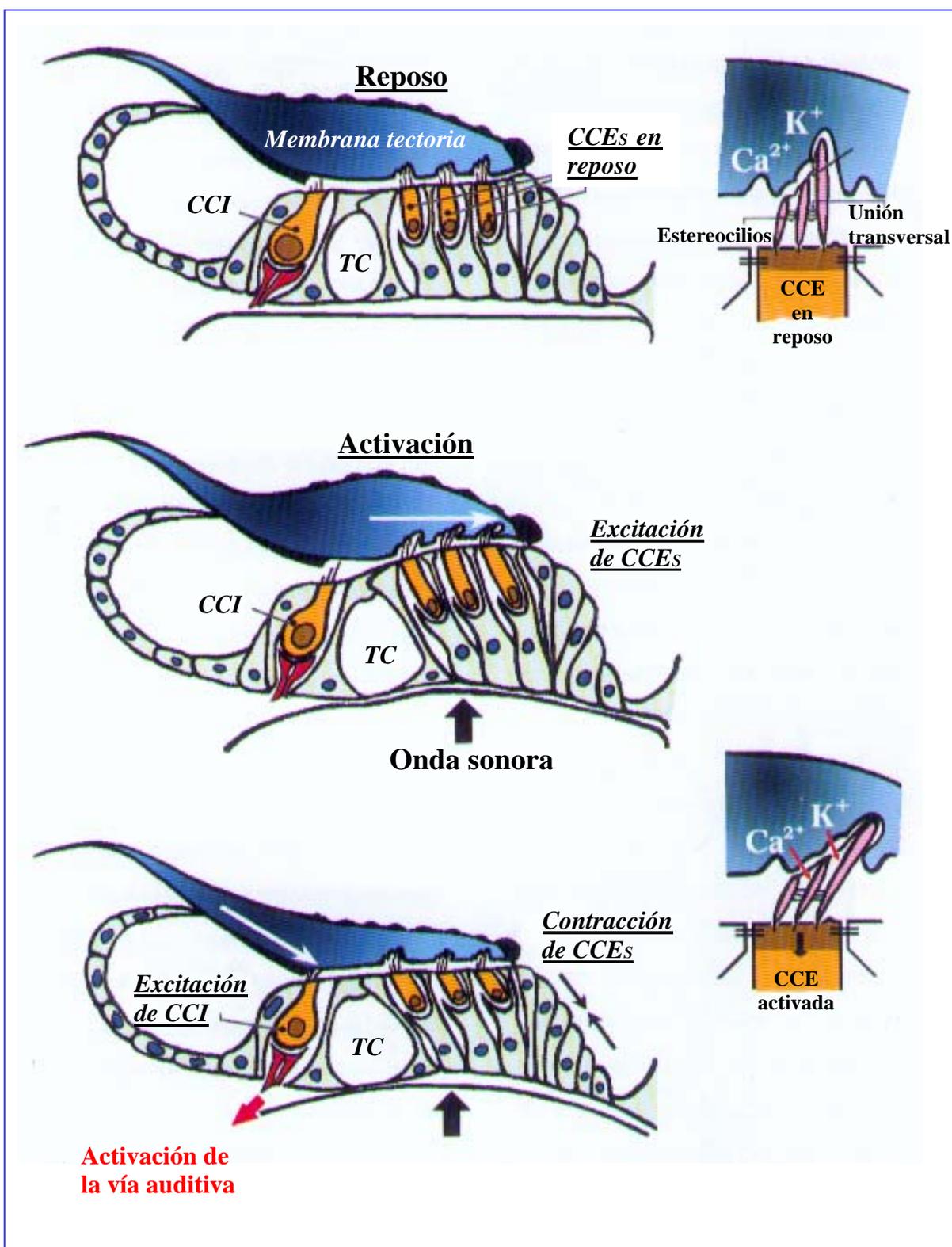
La deflexión de los estereocilios en dirección lateral produciría un aumento en la conductividad de los canales existentes a en los “tip links” de la zona apical de los mismos, lo que unido a la diferencia de potencial existente entre la endolinfa y el interior de las células ciliadas, provocaría una corriente masiva de  $K^+$  al interior de las células ciliadas a través de los poros iónicos, modificando el potencial de reposo y alcanzando un valor umbral (potencial umbral) más positivo, produciéndose una despolarización rápida que terminaría al alcanzarse el potencial invertido, a partir del cual se produciría una repolarización, recuperándose de nuevo la situación de potencial de reposo (López-Barneo, 1992).

Recientemente se empiezan a conocer las características físicas y bioquímicas de la membrana tectoria (Steel, 1983; Gil-Loyzaga y cols., 1985; Richardson y cols, 1987; Gil-Loyzaga, 1997) y ambas características son sensibles a los cambios en la composición iónica de la endolinfa (Kronester-Frei, 1979). En cualquier caso, la membrana tectoria tiene diversos papeles que harían de ella un elemento insustituible en la transducción coclear, y debido a su composición en proteínas y glicoconjugados, podría participar como reservorio iónico de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  en equilibrio con la endolinfa que la circunda (Gil-Loyzaga, 1997). Así pues podría ser esta membrana el elemento metabólicamente más sensible de los que intervienen en el fenómeno de la transducción

en la cóclea y de igual modo la endolinfa y el potencial endococlear tendrían la función de mantener un medio adecuado para esta membrana tectoria, como ha sugerido Davis (Davis, 1968).

Los fenómenos que ocurrirían en la cóclea con la llegada del sonido a la platina del estribo seguirían una secuencia (Fig. 2. Pag. 70), que podría ser como se detalla (Pujol, 1989; Gil-Lozaga y Pujol, 1999):

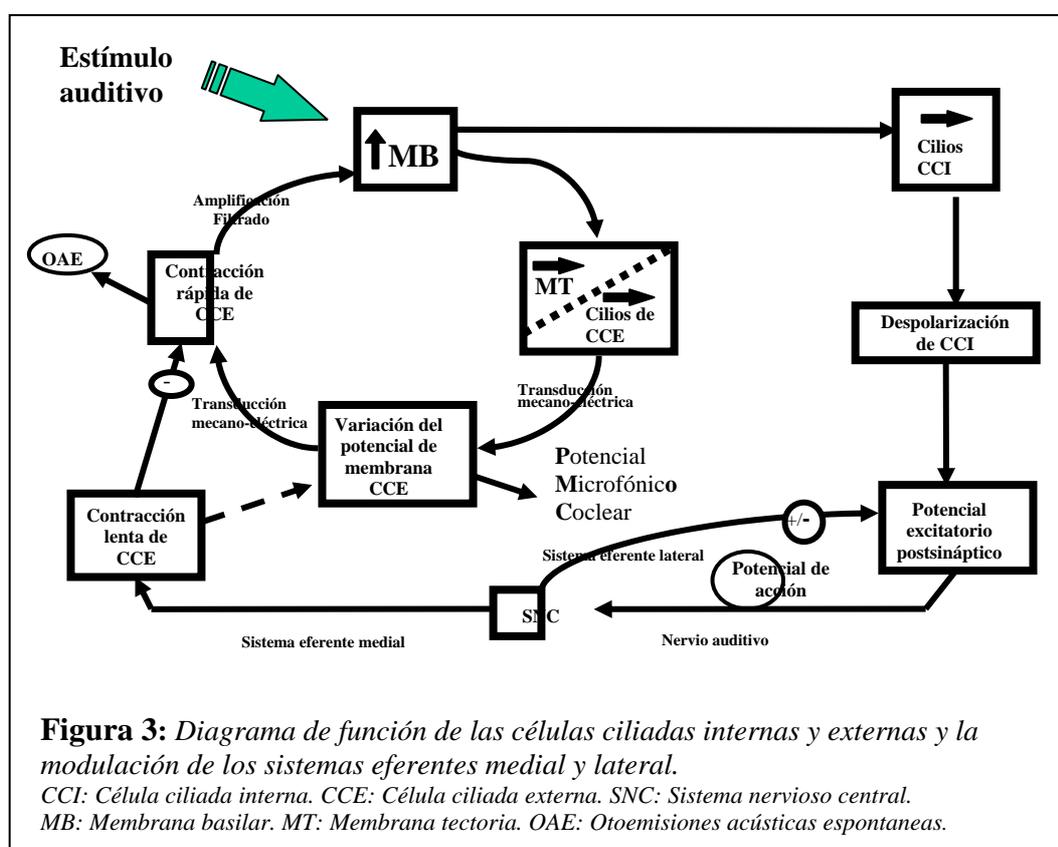
- 1.- La vibración de la platina del estribo se transmitiría a la perilinfa, originando una onda de presión debido a las características elásticas de la membrana basilar; esta onda provocaría desplazamientos en la misma, siendo máximos en una zona concreta, más cercana a la base si se trata de sonidos agudos o al ápex si son graves, lo que implicaría una tonotopía grosera a nivel coclear.
- 2.- Los desplazamientos de la membrana basilar son en sentido vertical, junto con los elementos que se sitúan sobre ella, túnel de Corti, células ciliadas internas y externas. Los movimientos verticales de la membrana basilar desplazarían el órgano de Corti contra la membrana tectoria, y así los cilios más largos de las células ciliadas externas se verían sometidos a un movimiento de cizalla en la dirección de la estría vascular (excitación), ocurriendo la despolarización de la célula ciliada externa.
- 3.- Una vez activada la célula ciliada externa, ocurriría una contracción rápida de las mismas (mecanismo activo), en fase con la frecuencia del estímulo. Las contracciones provocarían un acoplamiento entre las membranas basilar y tectoria, dando como resultado una amplificación de la vibración en una zona muy restringida de la espiral coclear. Se produciría un efecto de amplificación selectiva o filtro de sonido (tonotopía fina), que únicamente ocurriría para sonidos de baja intensidad, ya que en sonidos superiores a 70 dB la participación de las células ciliadas externas en la micromecánica coclear es menor.



**Figura 2: Efecto de la onda sonora sobre el receptor auditivo** (Según Prof. Gil-Loyzaga). La onda sonora desplaza la membrana basilar y todo el receptor auditivo hacia arriba, así los estereocilios de las células ciliadas externas (*CCEs*) son desplazados en sentido lateral, lo que supone la activación de estas células, que se contraerán atrayendo la membrana tectoria sobre las células ciliadas internas (*CCIs*). La activación de las células ciliadas internas inicia la transmisión del mensaje auditivo hacia el sistema nervioso central. *TC*: Túnel de Corti.

En la zona reducida de la cóclea sobre la cual se enfoca la energía liberada por la contracción de las células ciliadas externas, un pequeño número o incluso una sola célula ciliada interna sería activada con máxima sensibilidad; esta célula ciliada interna se excitaría cuando sus cilios se desplazaran en la dirección adecuada (hacia la estría vascular), y el desplazamiento ocurriría cuando la membrana tectoria fuera traccionada hacia la membrana basilar por las contracciones de las células ciliadas externas.

4.- La célula ciliada interna se despolarizaría dando como resultado la liberación de un neurotransmisor, que activaría las fibras aferentes tipo I transmitiendo el impulso nervioso hacia los núcleos cocleares y hacia el sistema nervioso central. La selectividad frecuencial debida a las células ciliadas externas permite que dos células ciliadas internas contiguas codifiquen y envíen mensajes ligeramente diferentes.



5.- Este sistema aferente estaría regulado por un sistema eferente, el medial y el lateral (Fig. 3. Pag. 71); el medial atenuaría los mecanismos activos de las células ciliadas externas, al estimular las contracciones lentas; el lateral cerraría un sistema de control que regularía los mensajes que circulen por las fibras de las neuronas aferentes tipo I. De las sustancias neuroactivas descritas en este sistema eferente, unas tendrían función facilitadora y otras inhibidora del mensaje auditivo.

El resultado final de la actividad coclear sería la liberación de uno o varios neurotransmisores por parte de la célula ciliada interna, tras la despolarización de la misma, haciendo sinapsis con receptores localizados en las neuronas aferentes tipo I, despolarizándolas y originando un potencial de acción en dicha fibra y continuando la transmisión del impulso nervioso hacia el sistema nervioso central. La primera estación se situaría en los núcleos cocleares, donde se encuentra neuronas de respuesta frecuencial específica similar a las del ganglio espiral, otras responden únicamente al inicio, al final, o durante el período que dura el estímulo, o en función de la intensidad del sonido. Se ha sugerido la existencia de una correlación morfofuncional en las neuronas de los núcleos cocleares, que parecen ser el primer centro de integración del mensaje auditivo (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

Hemos destacado la existencia de tonotopía coclear, también existe distribución tonotópica en las fibras del nervio coclear, así como en los núcleos cocleares. Las fibras aferentes primarias procedentes de la base coclear (frecuencias agudas), y que tienen una distribución más periférica en el nervio coclear, se proyectarían hacia la región más profunda (dorsomedial) de los núcleos, mientras que las procedentes del ápex coclear (frecuencias graves), y de distribución más central en el nervio coclear, se proyectarían a la región más superficial de los núcleos cocleares (ventrolateral). Entre estas dos regiones se distribuirían el resto de las fibras que se activan con frecuencias intermedias.

La distribución tonotópica de las neuronas se mantendrá en toda la vía hasta la corteza auditiva.

En resumen, la interpretación del mensaje auditivo se realizaría de manera progresiva en las diferentes estaciones, desde los análisis más simples a nivel de la cóclea y de los núcleos cocleares (intensidad, duración y frecuencia), pasando por la localización espacial de la fuente sonora que se realizaría en el complejo olivar superior y en los tubérculos cuadrigéminos inferiores (gracias a las conexiones ipsi y contralaterales, se realizaría un análisis de las diferencias temporales y de intensidad, permitiendo situar el sonido con relación a la cabeza) y finalmente el cuerpo geniculado medial y la corteza cerebral se encargarían de los análisis más complejos, la interpretación, la comparación y la integración sensorio-motora para responder a este estímulo auditivo (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

## **SUSTANCIAS NEUROACTIVAS DE LA COCLEA.**

Son aquellas sustancias neurotransmisoras o neuromoduladoras que han sido identificadas en la cóclea de diferentes mamíferos, pertenecientes al sistema aferente o al eferente, y que posiblemente juegan un papel neurotransmisor o neuromodulador en el órgano de Corti (Eybalin, 1993; Puel, 1995). Estas sustancias son el glutamato, la acetil-colina, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP), la dopamina, las encefalinas y dinorfinas y la serotonina (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b).

### **NEUROTRANSMISORES DE LA CELULA CILIADA INTERNA.**

El flujo masivo de  $K^+$  al interior de la célula ciliada interna, a través de los canales de los estereocilios, provocaría la despolarización-activación de esta célula, lo que conllevaría la apertura de los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , canales voltaje-dependientes (Fuchs, 1992), permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ . Este catión activará a una proteincinasa, calmodulina, que acabaría por fosforilar a dos proteínas que fijan las vesículas presinápticas al citoesqueleto (la sinapsina Ia y Ib y la sinaptofisina), permitiendo su liberación y fusión con la membrana presináptica. Finalmente, por exocitosis, se libera el neurotransmisor a la hendidura sináptica (Rehm y cols., 1986; Gil-Loyzaga y Pujol, 1988; Bartolomé y cols., 1993; Gil-Loyzaga y cols., 1998)

La mayoría de las evidencias señalan a un aminoácido excitador, llamado glutamato, como el más probable neurotransmisor entre las células ciliadas internas y las dendritas de las neuronas aferentes tipo I, aunque no está suficientemente probado que las células ciliadas internas utilicen solo un neurotransmisor, y por lo tanto, pueden existir otros neurotransmisores (aspartato) o cotransmisores (Merchán-Pérez y cols., 1990; Eybalin, 1993; Puel, 1995).

## **EL GLUTAMATO.**

Fue el primer aminoácido excitador detectado en el sistema nervioso central (Curtis y Watkins, 1963) y posiblemente más del 90% de las sinapsis cerebrales usan el glutamato como neurotransmisor excitador.

La primera evidencia de que este aminoácido podría ser el principal neurotransmisor en la cóclea se debe a Godfrey (Godfrey y cols, 1976), quién demostró la existencia de una alta concentración de glutamato y aspartato en muestras que contenían células ciliadas internas y externas, a diferencia de aquellas muestras que contenían otras porciones de la cóclea (membrana basilar y de Reissner, estría vascular). Posteriormente vinieron las pruebas electrofisiológicas que mostraban que el glutamato y el aspartato reproducen el efecto de la estimulación acústica, aumentando la frecuencia de los disparos espontáneos de las neuronas auditivas primarias (Bobbin y cols, 1978; Bobbin, 1979; Comis y cols, 1979).

Otros experimentos, empleando técnicas de autoradiografía (Eybalin y cols, 1983) y de inmunocitoquímica (Altschuler y cols., 1989; Merchán-Pérez y cols., 1990-b), trataban de demostrar la localización del neurotransmisor en la cóclea y el lugar donde se sintetiza y se inactiva. Más recientemente (Eybalin y cols., 1990 y 1991) se han realizado estudios con microscopía electrónica de inmuno-marcaje de glutamato con oro, obteniéndose señales mucho mayores de marcaje en la célula ciliada interna que en cualquier otra estructura del órgano de Corti.

**Ciclo de Glutamato-Glutamina** (Fig. 4. Pag. 79): Basándose en estudios autoradiográficos “in vitro”, se ha propuesto un posible ciclo que explicaría la inactivación y la resíntesis del glutamato en la cóclea (Eybalin, 1993). Este ciclo permitiría la limpieza del exceso del glutamato extracelular de la hendidura sináptica, y la repleción de los depósitos de glutamato intracelular. El glutamato liberado a la

hendidura sináptica sería captado rápidamente por las células gliales (Eybalin y Pujol, 1983), mediante un mecanismo de captación de alta afinidad (Eybalin, 1993), tal y como ocurre en el tejido nervioso con los astrocitos (Schon y Kelly, 1974; De Barry y cols., 1982; Fonnum, 1991). En las células gliales se transformaría en glutamina gracias a la acción de una enzima glial, glutamina sintetasa; una vez liberada de la célula glial, la glutamina sería captada por la terminal glutamatérgica (célula ciliada interna), donde se transformaría en glutamato, actuando como enzima la glutaminasa, y quedando almacenado en las vesículas presinápticas (Yudkoff y cols., 1988; Eybalin, 1993).

Aunque este ciclo de glutamato-glutamina parece ser el que con mayor probabilidad se produciría dentro del órgano de Corti, y que además nos ayudaría a explicar la neurotransmisión, sin embargo existe cierta dificultad para identificar con seguridad el mecanismo por el cual se sintetiza glutamato a partir de glutamina en la célula ciliada interna (Eybalin, 1993). Lo que sí parece claro es que este ciclo actuaría como un mecanismo de protección contra los efectos neurotóxicos debidos a un exceso de glutamato extracelular (Choi y Rothman, 1990).

También ha sido propuesto como posible neurotransmisor a nivel de células ciliadas internas el aspartato (Wenthold y cols, 1986), basándose en experimentos de inmunofluorescencia, mediante el empleo de anticuerpos anti-aspartato-aminotransferasa (Fex y cols, 1982), enzima empleado en la interconversión de aspartato a oxalacetato y de  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato.

Ambos neurotransmisores, el aspartato y el glutamato, podrían ser captados por las fibras eferentes del haz espiral interno y del haz espiral del túnel (Gulley y cols., 1979; Schwartz y cols., 1986), lo que ha sido interpretado como un mecanismo de protección frente a los efectos neurotóxicos producidos por el exceso de glutamato y aspartato en la hendidura sináptica (Altschuler y cols., 1989); sin embargo existe otra

posible explicación a esta captación, relacionada con una vía metabólica de síntesis de GABA (ácido gamma-aminobutírico), ya que el aspartato y el glutamato podrían ser precursores en la síntesis de este neurotransmisor inhibitorio empleado por el sistema eferente (Merchán-Pérez y cols., 1990-c; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995).

Con anterioridad nos hemos referido a los experimentos electrofisiológicos que muestran que el glutamato y el aspartato reproducen el efecto de la estimulación acústica (Bobbin y cols, 1978; Comis y cols, 1979), incrementando la frecuencia de los disparos espontáneos de las neuronas auditivas primarias; también se ha demostrado que la neurotransmisión es inhibida por aminoácidos excitadores, antagonistas competitivos (Bobbin y Kisiel, 1981; Bobbin y cols., 1984; Puel y cols., 1989) y no competitivos del glutamato (Cousillas y cols., 1988); por último, los experimentos electrofisiológicos de Klinke y Oertel (Klinke y Oertel, 1977) demuestran que el glutamato y el aspartato, cuando son empleados a altas concentraciones ( $10^{-2}$ M), reducen la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC), posiblemente debido a que inducen una descarga asincrónica de las neuronas auditivas primarias, haciéndolas menos sensibles a los estímulos sonoros (Bobbin y Thompson, 1978; Klinke, 1981), sin afectar al potencial microfónico coclear (MC).

Todos estos trabajos apuntan hacia el glutamato y el aspartato como los principales candidatos para la función de neurotransmisión entre la célula ciliada interna y la neurona aferente tipo I del órgano de Corti (Eybalin y Pujol, 1989; Ehrenberger y Felix, 1991).

Existen una serie de criterios que deben cumplir cualquier sustancia para ser considerada neurotransmisora (Rebillard y Bryant, 1989), como son el tener una farmacología apropiada e imitar una determinada acción cuando es empleada, la existencia de un proceso de eliminación para finalizar la acción, la existencia de un

proceso de síntesis y liberación tras una estimulación adecuada y la presencia de dicha sustancia en la sinapsis. La mayoría de estos criterios han sido probados para el glutamato con resultados positivos.

### **RECEPTORES GLUTAMATERGICOS.**

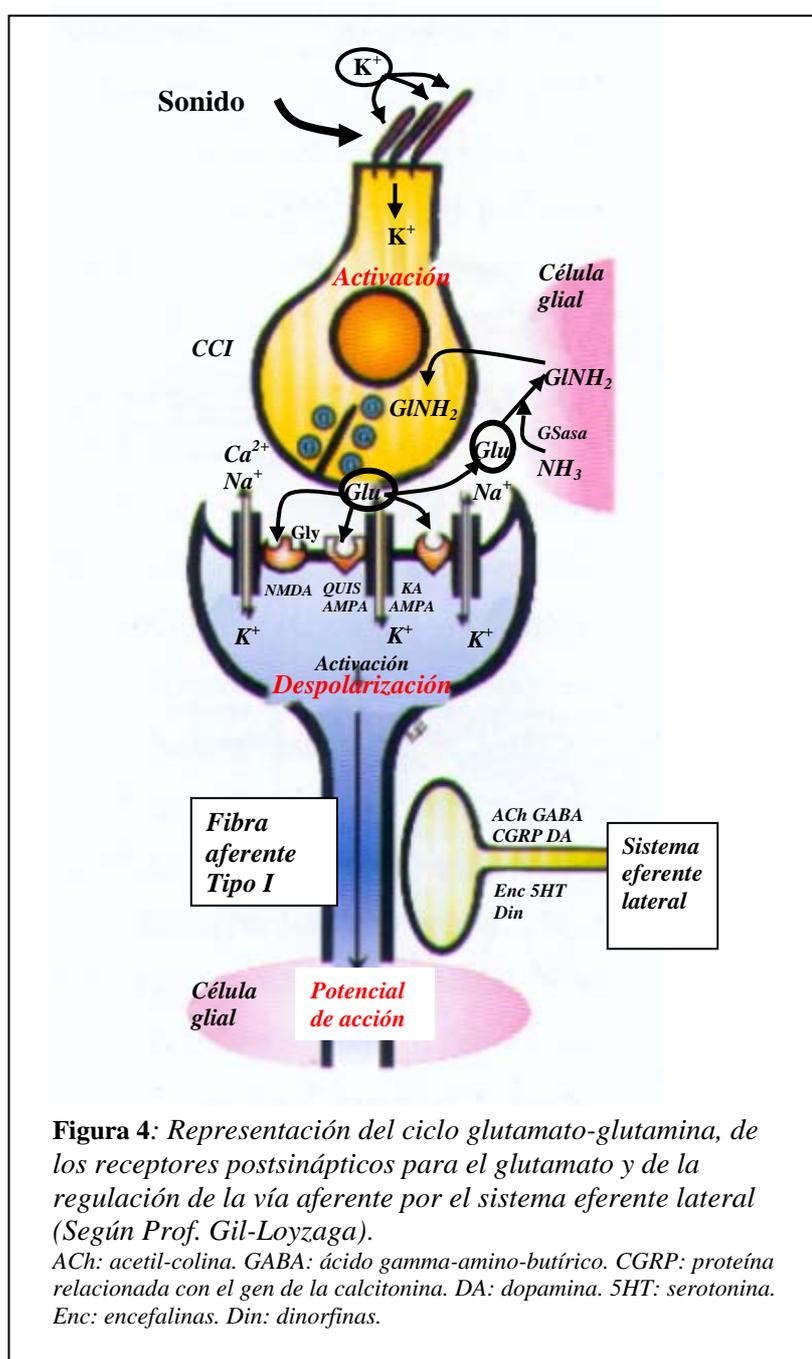
Aceptando la hipótesis del glutamato como principal neurotransmisor de la vía aferente y una vez liberado a la hendidura sináptica, su acción vendría mediada al fijarse a dos tipos de receptores, los ionotrópicos, ligados a un canal iónico y que serían los responsables de la activación neuronal rápida, característica de la transmisión glutamatérgica, y los metabotrópicos, asociados a proteínas de membrana (proteína G), conectados con segundos mensajeros intracelulares, que mediarían respuestas neuronales más lentas (Puel, 1995).

### **RECEPTORES IONOTROPICOS.**

Estos receptores se localizarían en las dendritas de las neuronas aferentes tipo I de la vía auditiva, suelen ser de naturaleza proteica y contienen un poro hidrofílico en toda su longitud (Fig. 5. Pag. 81), que comunicaría el medio extracelular con el intracelular y a través del cual pasarían los iones (canal iónico); atraviesan completamente la bicapa lipídica de la membrana celular y se trataría de proteínas oligoméricas con varias subunidades (proteína transmembranaria). Estos canales iónicos se podrían activar por campos eléctricos (canales dependientes de potencial) ó por la unión de ligandos a sitios específicos (canales dependientes de ligandos), como ocurriría en el caso del glutamato (Geijo, 1992).

Cuando se activan estos receptores ionotrópicos, se producirá una apertura de los canales iónicos, permitiendo el paso de iones a través de la membrana postsináptica hacia el interior o hacia el exterior de la célula, modificándose el potencial de membrana (potencial de reposo) de dicha célula. Este potencial de membrana en reposo

puede hacerse más negativo y se habla de hiperpolarización-inhibición o menos negativo y entonces se habla de despolarización-excitación, hasta que se supera un umbral, generándose un potencial de acción en dicha célula (López-Barneo, 1992). Los trabajos de Hodgkin y Huxley (1952) en Gran Bretaña y de Cole (1968) en Estados Unidos, han podido demostrar que el potencial de acción se produciría por modificaciones en la permeabilidad iónica de membrana para los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Geijo, 1992).



**Figura 4:** Representación del ciclo glutamato-glutamina, de los receptores postsinápticos para el glutamato y de la regulación de la vía aferente por el sistema eferente lateral (Según Prof. Gil-Loyzaga).

*ACh:* acetil-colina. *GABA:* ácido gamma-amino-butírico. *CGRP:* proteína relacionada con el gen de la calcitonina. *DA:* dopamina. *5HT:* serotonina. *Enc:* encefalinas. *Din:* dinorfinas.

Dentro de los receptores ionotrópicos del glutamato se pueden diferenciar al menos tres tipos diferentes (Fig. 4. Pag. 79), el N-metil-D-aspartato (**NMDA**), el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico (**AMPA**) y el **kainato** (Nakanishi y Masu, 1994; Steinhäuser y Gallo, 1996); todos estos receptores serían estimulados por el glutamato y tienen mayor afinidad por éste que por el aspartato. Los receptores **NMDA** al igual que los **no-NMDA** (**AMPA** y **kainato**) estarían formados por varias subunidades (Fig. 5. Pag. 81), que se pueden combinar formando complejos heteroméricos (Hollman y cols., 1989; Keinanen y cols., 1990).

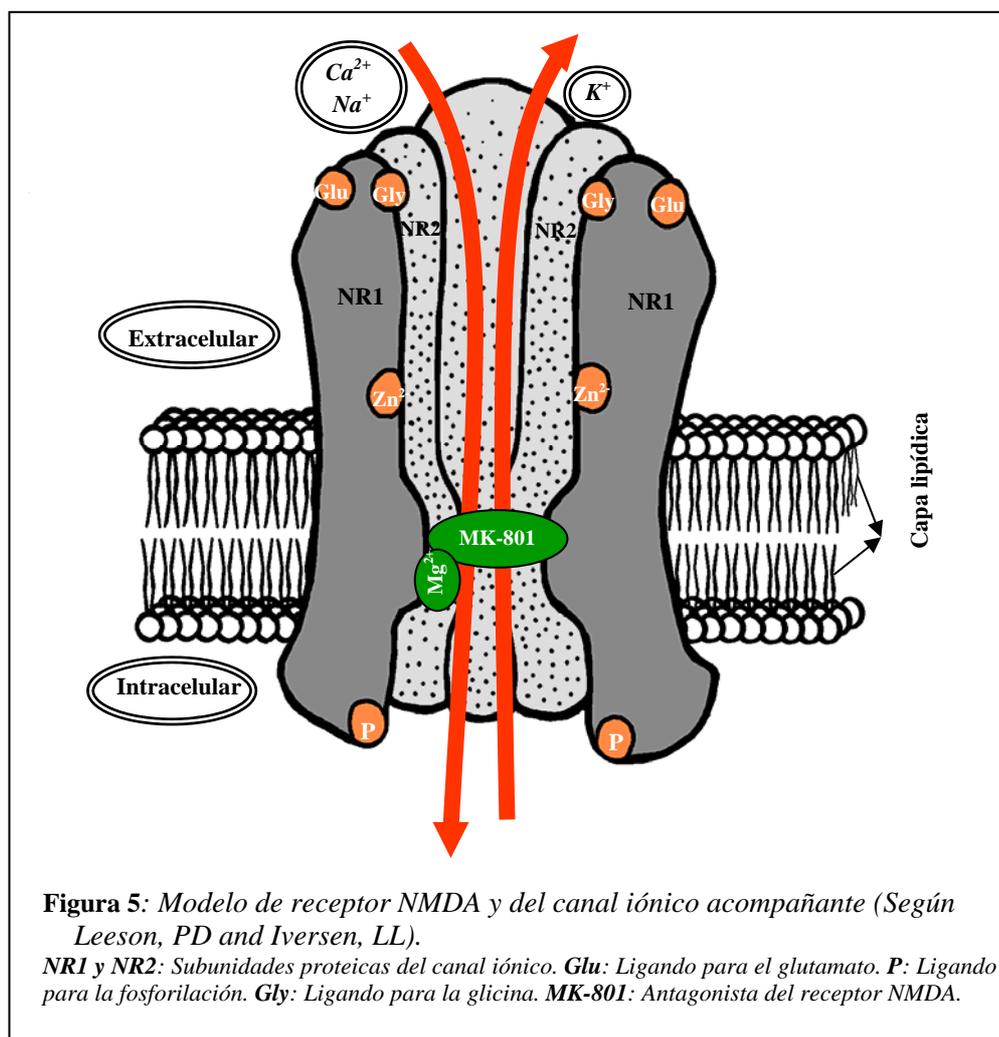
Con el empleo de diferentes técnicas de biología molecular (reacción en cadena de la polimerasa, hibridación “in situ”, inmunocitoquímica, ...) aplicadas al estudio de los receptores de glutamato, han permitido diferenciar varios subtipos de receptores NMDA, el NR1, el NR2A, el NR2B, el NR2C y el NR2D; de los receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) se distinguen los subtipos GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4 y de los receptores del ácido kaínico (kainato) los subtipos GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2 (Safieddine y Eybalin, 1992; Kuriyama y cols., 1993; Niedzielski y Wenthold, 1995).

Los receptores no-NMDA generarán respuestas de despolarización rápida, mientras que las respuestas de los receptores NMDA serían más largas en duración y se acompañarían de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior celular (Ehrenberger y Felix, 1991).

### **RECEPTORES NMDA.**

Estos receptores podrían ser estimulados por el glutamato y por el N-metil-D-aspartato, pero también serían activados por estímulos sonoros de alta intensidad, en la cóclea, y por despolarizaciones neuronales intensas y repetidas, como ocurre en el sistema nervioso central, donde se han identificado estos receptores (Collingridge y cols., 1988).

Este receptor estaría ligado a un canal iónico (catiónico) y podría estar formado al menos por dos subunidades proteicas conocidas como NR1 (R1 o NMDA<sub>1</sub>) y NR2 (R2 o NMDA<sub>2</sub>). El receptor NR1 se hallaría combinado en siete isoformas diferentes; también se han aislado cuatro genes distintos que codifican variantes del NR2 (NR2A, NR2B, NR2C y NR2D). No se sabe con seguridad cuántas subunidades de NR1 y de NR2 existen en cada receptor NMDA (Puel, 1995; Steinhäuser y Gallo, 1996).



Se ha comentado previamente que los receptores ionotrópicos se podrían activar por campos eléctricos o por la unión de ligandos a sitios específicos. En el caso de los receptores NMDA los lugares para el reconocimiento de los ligandos serían múltiples (Iversen, 1994):

- **L-glutamato** y agonistas relacionados, que favorecerían la apertura de canales de alta conductancia, que permitirían la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula.

- **Glicina**, para que el L-glutamato pueda realizar su función, el lugar de reconocimiento de la glicina debería estar ocupado.

- El  $\text{Mg}^{2+}$  actuaría bloqueando el canal iónico a pesar del L-glutamato y de la glicina, y no permite la apertura del poro iónico hasta que es removido del canal, y esto ocurriría cuando la célula fuera parcialmente activada por otros influjos iónicos (receptores no-NMDA).

La activación de este receptor permitiría la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal iónico al interior de la célula (neurona).

### **RECEPTORES No-NMDA.**

**Receptor AMPA** (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico): anteriormente denominado receptor del **quisqualato** (Puel y cols., 1991), es un receptor de acción rápida, ya que produciría respuestas de despolarización rápidas en la neurona postsináptica, al permitir la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior celular; es de naturaleza proteica, con varias subunidades GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4, asociado a un poro iónico (Steinhäuser y Gallo, 1996), con una proteína moduladora y un lugar para el reconocimiento del ligando, AMPA o quisqualato (Young y Fagg, 1990).

La presencia de subunidades GluR2 se relacionaría con la baja permeabilidad para el ion  $\text{Ca}^{2+}$ ; por el contrario, las subunidades GluR1, GluR3 y GluR4 se relacionarían con corrientes de alta permeabilidad para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Steinhäuser y Gallo, 1996).

**Receptor de Kainato:** Algunos investigadores han considerado que los efectos neurofisiológicos del ácido kaínico podrían estar mediados a través del receptor AMPA. También es de naturaleza proteica, con varias subunidades que dan lugar a la identificación de varios subtipos de receptores, GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2

(Steinhäuser y Gallo, 1996).

El glutamato y el kainato no solamente aumentarían la conductancia del receptor para el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Na}^+$  sino que reducirían significativamente la corriente rectificadora de salida de  $\text{K}^+$ . El aumento de calcio intracelular se debería al flujo de entrada y también a la liberación del mismo de los depósitos intracelulares (Steinhäuser y Gallo, 1996).

Se considera a los receptores AMPA y a los receptores kainato como los responsables de la transferencia rápida de información sensorial hacia el nervio coclear, mientras que los receptores NMDA solo serían funcionales cuando la membrana postsináptica está previamente despolarizada por la actividad de otros receptores ionotrópicos; así, los receptores no-NMDA (AMPA y kainato) serían activados en primer lugar, pudiendo ser los responsables de las transmisiones sinápticas a bajas o moderadas intensidades de estimulación, mientras que los receptores NMDA se activarían en segundo lugar, siempre y cuando el estímulo sea de alta intensidad (Cull-Candy y Usowicz, 1987; Bekkers y Stevens, 1989; Puel, 1995).

### **RECEPTORES METABOTROPICOS.**

Estos receptores están ligados a una proteína transmembranaria con siete dominios (proteína G), de la que se han descrito ocho subtipos, de mGlu1 a mGlu8 (Steinhäuser y Gallo, 1996). Dependiendo del mecanismo al que estén asociados, se pueden dividir en dos grupos de receptores, los relacionados con el 1,4,5-trifosfato-inositol y la cascada del  $\text{Ca}^{2+}$ , como son el mGlu1 y el mGlu5, y los relacionados con la inhibición de la adenilato-ciclasa como son los mGlu2, mGlu3, mGlu4, mGlu6 y mGlu8 (Steinhäuser y Gallo, 1996).

La activación de receptores metabotrópicos del glutamato (mGlu) produciría un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y reducción en las corrientes de  $\text{K}^+$  (Porter y McCarthy, 1995), tal y como ocurre con la activación de los receptores ionotrópicos del glutamato

(iGlu), pero el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se debería a la liberación del mismo de los depósitos intracelulares y no al paso del mismo a través de la membrana celular (Steinhäuser y Gallo, 1996).

Para conocer el efecto que cada uno de los receptores glutamatérgicos enumerados anteriormente tiene sobre la neurotransmisión, se han empleado compuestos agonistas y antagonistas de estos mismos receptores (Young y Fagg, 1990; Puel, 1995).

Para los receptores ionotrópicos NMDA se han empleado como agonistas el propio **N-metil-D-aspartato**, el **glutamato** y el **ibotenato** y como antagonistas el **aminodipato** y el **2-amino-5-fosfonovalerato** (APV), también llamado **2-amino-5-fosfonopentanoato** (AP5); como agonistas de los receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) se han empleado el propio **AMPA**, el **quísqualato** o el **glutamato**, y como antagonistas se emplean dos sustancias de la familia de las **quinoxalino-dionas**, la 6-ciano-7-nitroquinoxalino-2,3-diona (CNQX) y la 6-7-dinitroquinoxalino-2,3-diona (DNQX). Los receptores kainato también tienen unos agonistas que son **kainato**, **domoato** y **glutamato** y unos antagonistas, que son los mismos que para los receptores AMPA, de la familia de las **quinoxalino-dionas** (Eybalin, 1993; Puel, 1995).

El ácido **kinurénico** antagoniza la acción de receptores ionotrópicos NMDA y no-NMDA (Wickesberg y Oertel, 1989).

Para los receptores metabotrópicos se emplean como agonistas el ácido (1S-3R)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico (**1S-3R-ACPD**), el L-2-amino-4-fosfonobutirato (**L-AP4**), el **quísqualato** (Schoepp y Johnson, 1989) y el **glutamato**; no se han descrito antagonistas competitivos para este receptor, aunque el **AP4** (2-amino-4-fosfonobutirato) puede ser considerado un antagonista indirecto (Schoepp y Johnson, 1989).

Con el empleo de esta batería de productos, agonistas y antagonistas, se ha podido entender cuál es la función de los diferentes receptores glutamatérgicos en la neurotransmisión; se piensa que los receptores metabotrópicos tendrían escasa influencia en la misma, ya que al ser un proceso relativamente recortado en el tiempo, no admite ser explicado por la activación de vías metabólicas más prolongadas (Inositol trifosfato o adenilato-ciclasa/AMPC). Al activarse los receptores ionotrópicos se produciría una apertura del canal iónico asociado, ocurriendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  al interior de la célula y la consiguiente salida de  $\text{K}^+$ , lo que provocaría una despolarización celular.

La secuencia sería de la siguiente manera, el glutamato actuaría sobre los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y no-NMDA, pero los únicos que se activarían serían los no-NMDA, ya que los canales iónicos de los NMDA están bloqueados por el  $\text{Mg}^{2+}$ , los canales iónicos de los receptores no-NMDA permitirían la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , activándose parcialmente la célula (neurona), siendo ahora cuando el  $\text{Mg}^{2+}$  es liberado del canal iónico de los NMDA, quedando activados estos receptores y permitiendo la entrada de más  $\text{Na}^+$  y más  $\text{Ca}^{2+}$ , acabando por despolarizar la neurona y generándose un potencial de acción (Cull-Candy y Usowicz, 1987; Bekkers y Stevens, 1989; Young y Fagg, 1990; Puel, 1995).

Se ha supuesto que a bajas y medias intensidades de estimulación solo se activarían los receptores no-NMDA (Puel y cols., 1991), mientras que a altas intensidades de estimulación se activarían primero los no-NMDA y luego, una vez activada parcialmente la célula, se activarían los receptores NMDA (Ehrenberger y Felix, 1991; Pujol y cols., 1993).

Se sabe que el receptor NMDA está asociado a un canal iónico (Fig. 5. Pag. 81) que sería altamente permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  (MacDermott y cols.,1986), y podría estar

relacionado con la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en la neurona, y con la pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  que ocurre en situaciones de excitotoxicidad (Olney, 1978). Las lesiones que ocurren en las neuronas por la exposición prolongada al glutamato extracelular (neurotoxicidad) fueron descritas hace más de cuarenta años en la retina (Lucas y Newhouse, 1957) y hace unos treinta años en el cerebro (Olney y Sharp, 1969). Posteriormente Olney demostró que esta neurotoxicidad, que llamó **excitotoxicidad**, es una propiedad general de los aminoácidos excitadores cuando actúan en exceso sobre las neuronas (Olney, 1978).

Con el empleo de agonistas y antagonistas glutamatérgicos se van conociendo las repercusiones que sobre la **actividad eléctrica neuronal** de la vía auditiva pueden tener la estimulación o inhibición de los receptores glutamatérgicos. El empleo de agonistas o de antagonistas de los receptores ionotrópicos produce una reducción de la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC) y un aumento de la latencia de la onda N1, sin apreciarse repercusión sobre el potencial de sumación (PS) o sobre el potencial microfónico coclear (MC) (Puel, 1995). Esta acción se ejercería de diferente manera, o bien bloqueando la neurotransmisión en el caso de los antagonistas, o bien produciendo lesiones en la neurona aferente tipo I y haciendo que aumenten de manera espontánea las descargas asincrónicas en la fibra aferente tipo I, en el caso de los agonistas (Puel, 1995). Cuando se emplean agonistas de receptores metabotrópicos en perfusión intracoclear se ha comprobado que no tienen repercusiones sobre el potencial de acción compuesto (PAC), dando por hecho que no tienen un papel directo en la neurotransmisión (Puel, 1995). Únicamente el ácido kaínico y el AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) suprimirían el potencial de acción compuesto (PAC).

En preparaciones de **microscopía electrónica** se han observado lesiones,

vacuolizaciones, en las dendritas de las neuronas aferentes tipo I cuando se emplea kainato (Pujol y cols., 1985; Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990-a y b; Gil-Loyzaga y cols., 1999-a), AMPA y glutamato en perfusión intracocular, pero no cuando se emplea NMDA (N-metil-D-aspartato) (Eybalin, 1993; Puel, 1995).

### **ACIDO KAINICO.**

Es un agonista, análogo sintético, del glutamato que actuaría sobre receptores glutamatérgicos de alta afinidad para el ácido kaínico (receptores no-NMDA del tipo kainato), y que estarían asociados a un canal iónico -ionotrópicos-. Es un aminoácido excitador neurotóxico (excitotóxico), con gran potencia de acción aunque menor que la del quisqualato y AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) (Eybalin, 1993); junto con el AMPA sería el único aminoácido excitotóxico capaz de suprimir el potencial de acción compuesto -PAC- (Eybalin, 1993).

El efecto neurotóxico del ácido kaínico podría ocurrir al ejercer su acción sobre receptores no-NMDA, localizados en la región postsináptica, a nivel de las dendritas de las neuronas aferentes tipo I (Fig. 4. Pag. 79) que se hallan situadas alrededor de la base de las células ciliadas internas (Coyle, 1983; Rothman, 1985), o bien al actuar sobre receptores presinápticos (autorreceptores) localizados en la célula ciliada interna (CCI), que mediante un sistema de autorregulación controlarían los niveles del neurotransmisor que es liberado a la hendidura sináptica, y en el caso del ácido kaínico se produciría una liberación excesiva y mantenida de glutamato que sería el responsable de la acción tóxica sobre las fibras aferentes tipo I (Ferkany y cols., 1982; Coyle, 1983; Collins y cols., 1983).

Los trabajos de Gil-Loyzaga y Pujol (Gil-Loyzaga y Pujol, 1989) parecen aclarar esta duda ya que comprueban que durante el periodo gestacional (día 17 de gestación), cuando las fibras aferentes aun no han contactado con las células ciliadas internas o

externas y por lo tanto no existen sinapsis, el ácido kaínico inyectado intraperitonealmente a la madre gestante, provocaría lesiones en la mayoría de las fibras aferentes (concretamente en aquellas zonas de las fibras aferentes no recubiertas de mielina que se corresponde con la zona más distal de las dendritas). Cuando la administración de ácido kaínico se realiza en el día postnatal 1, se aprecian lesiones en las fibras aferentes tipo I que contactan con las células ciliadas internas (95% de las fibras aferentes), mientras que las fibras aferentes tipo II se hallan indemnes.

Con este trabajo se demuestra que la acción del ácido kaínico se ejercería antes de que las fibras aferentes lleguen a contactar con las células ciliadas, lo que supone que su acción se realizaría de manera independiente de estas células, posiblemente al actuar sobre receptores postsinápticos; también queda claro que la acción se ejercería sobre las fibras aferentes tipo I, que se sitúan bajo las células ciliadas internas y, en periodos precoces del desarrollo y de la sinaptogénesis, bajo las células ciliadas externas del ápex coclear, ya que serían las únicas que tendrían receptores para el ácido kaínico, receptores glutamatérgicos (Gil-Loyzaga y Pujol, 1989).

Para algunos investigadores la acción tóxica del ácido kaínico no se ejercería en la mayoría de las fibras aferentes tipo I, sino solamente en un 34% de las mismas (en aquellas que tienen mayor número de receptores kainato, o en las que tienen mayor sensibilidad al ácido kaínico), y en el resto de las fibras las lesiones producidas se deberían a la manipulación (descompresión perilinfática, perfusión intracoclear, extracción y fijación de las cócleas, etc.) y por lo tanto se trataría de lesiones reversibles, a diferencia de las producidas por el ácido kaínico, que aparecerían al cabo de diez días del tratamiento y se trataría de lesiones irreversibles (Juiz y cols., 1988 y 1989; Pujol y cols., 1991; Gil-Loyzaga y cols., 1999-a).

Desde el punto de vista microscópico, las lesiones que aparecen en las neuronas

aferentes tipo I serían una **edematización aguda** de las terminales postsinápticas que se hallan por debajo de las células ciliadas internas (CCI), primero las de la porción modiolar, que contienen una menor cantidad de mitocondrias, una menor actividad espontánea de descarga y umbrales más altos para los sonidos estimuladores (Lieberman y Oliver, 1984) y luego las de la porción de los pilares (Pujol y cols., 1993); también aparecerían **roturas en la membrana citoplásmica, vacuolizaciones citoplásmicas** y un **edema en las mitocondrias** de estas mismas neuronas, que acabarían por provocar la muerte celular (Coyle, 1983; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y cols., 1999-a).

En las células ciliadas internas y externas, en el sistema aferente espiral tipo II, así como en el sistema eferente medial y lateral no se apreciarían lesiones debidas al uso del ácido kaínico (Pujol y cols., 1985; Eybalin, 1993). Se ha comprobado que estas lesiones son similares a las que ocurren en la cóclea en situaciones de hipoxia/isquemia aguda (Billet y cols., 1989; Pujol y cols., 1992-a) y de trauma acústico (Spendlin, 1976; Choi, 1990; Pujol, 1991; Pujol y cols., 1993), por lo que se sospecha que el mecanismo fisiopatológico podría ser el mismo, y más cuando se ha comprobado que las lesiones provocadas por el AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-metil-4-isoxazol propiónico) y por la isquemia podrían ser evitadas con la perfusión previa de un antagonista competitivo de los receptores AMPA, como es la 6-7-dinitroquinoxalino-2,3-diona (DNQX) (Puel y cols., 1991; Pujol y cols., 1992-b; Puel y cols., 1994).

Las lesiones descritas en las terminales postsinápticas parecen estar relacionadas con la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  y sobre todo de  $\text{Ca}^{2+}$ , acompañado de agua (Rothman, 1985; Choi, 1987; Mayer y Westbrook, 1987), hacia el interior de la célula a través de los canales iónicos asociados al receptor no-NMDA, con la correspondiente pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Choi, 1990; Lefebvre y cols., 1991) y la degeneración neuronal subsecuente (Pujol y cols., 1993).

Estas lesiones, a un nivel microscópico, se traducirán en alteraciones electrofisiológicas en los registros del potencial de acción compuesto (PAC) de la electrococcleografía, ocurriendo una disminución de la amplitud de la onda N1 de dicho potencial y un aumento de la latencia de esta misma onda, sin mostrar repercusión en el potencial de sumación (PS), ni en el potencial microfónico coclear (Eybalin, 1993). Estas alteraciones en los registros serían debidas o bien a una desincronización de los impulsos de descarga de las fibras o bien al daño anatómico producido en las dendritas aferentes tipo I (Puel, 1995).

#### **NEUROTRANSMISORES DE LA VIA OLIVOCOCLEAR EFERENTE.**

Aunque Ramón y Cajal en 1900 y 1909 observó la presencia de fibras nerviosas que alcanzaban el receptor auditivo, y que eran independientes de las neuronas del ganglio espiral, la inervación eferente de la cóclea fue descrita por primera vez por Rasmussen (Rasmussen, 1942 y 1946), quién identificó los haces olivo-cocleares cruzado y no cruzado; hoy en día la denominación es diferente y se habla de sistema eferente olivococlear medial y lateral (Warr y Guinan, 1979; Warr, 1992; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b). El sistema lateral se originaría en el núcleo olivar superior lateral y sus neuronas se proyectarían principalmente (85%) a la cóclea homolateral, los axones sin mielinizar acaban por debajo de la célula ciliada interna (CCI), haciendo sinapsis con las dendritas de las neuronas aferentes radiales tipo I, -sinapsis axodendríticas-. El sistema medial se originaría en el núcleo olivar superior medial o en el cuerpo trapezoides y las neuronas enviarían los axones o bien a la cóclea contralateral (60%) o a la homolateral (30%), terminando por hacer sinapsis con el polo basal de la célula ciliada externa (CCE) -sinapsis axosomática-.

La proyección de este sistema eferente olivococlear en la cóclea tiene una distribución tonotópica (Guinan y cols., 1983 y 1984; Robertson y cols., 1987); esta

tonotopía se ha comprobado mediante la inyección de una sustancia marcadora neuronal de transporte anterógrado, la S-metionina, en el tronco cerebral y se han estudiado las zonas por donde se distribuye en la cóclea (Guinan y cols., 1984); el marcaje retrógrado con la peroxidasa (HRP) se ha utilizado para identificar positivamente las células neuronales que dan origen al haz olivococlear (Warr, 1975).

La distribución de este sistema eferente y su relación con las células ciliadas internas (CCI) y externas (CCE) parece indicar que constituye un sistema de regulación y control sobre las células ciliadas; el sistema eferente lateral realizaría un control postsináptico (Fig. 4. Pag. 79) de la actividad de las células ciliadas internas (CCI) mediante las sinapsis axodendríticas, regulando y siendo regulado por la actividad de descarga (frecuencia de disparos) de las neuronas aferentes tipo I (Warr, 1992; Eybalin, 1993); el sistema medial, gracias a las sinapsis axosomáticas, regularía la motilidad de las células ciliadas externas (contracciones lentas), alterando los mecanismos activos de la transducción mecano-eléctrica (Pujol, 1994).

Esta regulación se llevaría a cabo mediante el empleo de diferentes neurotransmisores y neuromoduladores que han sido identificados por diferentes técnicas de inmunocitoquímica y de hibridación “in situ”; en el sistema lateral (Fig. 4. Pag. 79) se han identificado algunos neurotransmisores como la acetil-colina (ACh), la dopamina, el ácido gamma-amino-butírico (GABA), la serotonina y también algunos neuromoduladores como la proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP), las encefalinas y las dinorfinas; en el sistema medial las sustancias identificadas son más escasas, la acetil-colina (ACh), la proteína relacionada con el gen de la calcitonina (CGRP) y el ácido gamma-amino-butírico (GABA) únicamente en el ápex coclear (Eybalin, 1993; Pujol, 1994; Gil-Loyzaga, 1995; Puel, 1995; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000-b).

Cada neurona de este sistema eferente tendría capacidad para producir cada uno de los neurotransmisores o neuropéptidos, sin embargo no los produciría todos a la vez sino que los sintetizaría y liberaría en función de diferentes condiciones fisiológicas o patológicas (Pujol, 1994).

#### **ACETIL-COLINA.**

Descrita por primera vez en la cóclea por Schuknecht (Schuknecht y cols., 1959), su existencia ha sido demostrada por experimentos bioquímicos y de inmunocitoquímica, mediante la determinación la acetil-colin-transferasa, que es su enzima de síntesis a partir de acetil-coenzima A y colina (Altschuler y cols., 1985; Eybalin y Pujol, 1987; Merchán-Pérez y cols., 1994).

Su acción se ejercería fundamentalmente a nivel de la célula ciliada externa, aunque también se ha identificado en el sistema eferente lateral, atribuyéndosele una función facilitadora de la actividad de descarga espontanea o inducida por el glutamato, a nivel de las fibras aferentes radiales situadas bajo las células ciliadas internas (Felix y Ehrenberger, 1992).

Una vez liberada a la hendidura sináptica actuaría sobre receptores nicotínicos y muscarínicos; los receptores nicotínicos tienen localización postsináptica, en el polo basal de las células ciliadas externas (CCE) (Plinkert y cols., 1991; Kujawa y cols., 1993), mientras que los muscarínicos, posiblemente del subtipo  $M_3$ , se localizarían en ambas células ciliadas y también presinápticamente ( $M_1$ ) (Kakehata y cols., 1993; Bartolami y cols., 1993-a y b).

El receptor nicotínico es ionotrópico, está asociado a un canal iónico permeable al  $K^+$ , y su activación desencadenaría corrientes de salida de este ion hacia el exterior de la célula ciliada externa (CCE), con la consiguiente hiperpolarización de la misma (Housley y Ashmore, 1991; Kakehata, y cols., 1993; Erostequi y cols., 1994).

El receptor muscarínico es metabotrópico, está acoplado a la proteína G y a un segundo mensajero (Sargent, 1993), y al activarse por la unión con la acetil-colina actuaría sobre la proteína G, posibilitándose varias vías metabólicas: inhibición de la adenilato-ciclasa (disminuyendo la producción de AMP cíclico), hidrólisis de fosfolípidos de membrana (cascada del fosfoinositol, que acabaría removiendo los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular) o activación de un canal de  $\text{K}^+$  (Alonso-Solís, 1992). De este receptor se han aislado tres subtipos, el  $\text{M}_1$  que cierra un canal de  $\text{K}^+$  provocando una despolarización celular, el  $\text{M}_2$  que aumenta la conductancia al  $\text{K}^+$  a través de un canal específico, hiperpolarizando la célula (Alonso-Solís, 1992), y el  $\text{M}_3$  que tendría unas características intermedias entre los nicotínicos y los muscarínicos (Housley y Ashmore, 1991), lo que explicaría la inusual farmacología colinérgica de estos receptores, especialmente la sensibilidad a la estricnina (Pujol, 1994).

La acetil-colina tendría una función protectora sobre el sistema de micromecánica coclear, formando parte del llamado **reflejo coclear**, y sobre la actividad del nervio coclear, ya que reduce la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC); produce alteraciones en las otoemisiones acústicas actuando sobre los mecanismos activos de la célula ciliada externa (contracciones rápidas), reduciéndolos (Wiederhold, 1986; Kujawa y cols., 1993); también produce un incremento en los potenciales microfónicos cocleares (Klinke y Galley, 1974; Wiederhold, 1986) al favorecer las contracciones lentas de las células ciliadas externas.

Posiblemente la acetil-colina de este sistema eferente medial potencie el efecto tóxico de los aminoglucósidos en la cóclea, por posible interferencia con las reacciones metabólicas que ocurren a nivel del receptor metabotrópico para la acetil-colina, en la célula ciliada externa (Kakehata y cols., 1993; Puel, 1995). También se sospecha que una disfunción en el control del sistema eferente medial sobre las células ciliadas

externas (CCE) podría ser el mecanismo responsable de los tinnitus (Eggermont, 1983; Puel, 1995).

### **DOPAMINA.**

La dopamina fue inicialmente excluida como neurotransmisor del órgano de Corti debido a la escasa repercusión que parecía tener sobre el potencial de acción compuesto (PAC) (Bobbin y Thompson, 1978). Este neurotransmisor fue detectado por primera vez en la cóclea de la rata usando técnicas de cromatografía líquida de alta presión o resolución (HPLC) acoplada a detección electroquímica (Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, 1986 y 1989). La inmunolocalización de tirosina-hidroxilasa (enzima necesaria para la síntesis de catecolaminas), con microscopía óptica primero (Jones y cols., 1987), y con microscopía electrónica más tarde (Charachon y Eybalin, 1990; Eybalin y cols., 1993), sirvió para sospechar la existencia de catecolaminas en la cóclea; la ausencia de enzimas que intervienen en la síntesis de adrenalina y noradrenalina a partir de la dopamina (dopamina- $\beta$ -hidroxilasa -DBH- y feniletanolamina-N-metil transferasa -PNMT-), junto con diferentes ensayos bioquímicos (Gil-Loyzaga y cols., 1989) confirmaron que la catecolamina que se identificaba en la cóclea era la dopamina, y se la relaciona con el sistema eferente lateral (Vicente-Torres y cols., 1993; Gil-Loyzaga, 1995). Tanto la tirosina-hidroxilasa (TH) como la DOPA-decarboxilasa han sido identificadas en las varicosidades del sistema eferente lateral que hacen sinapsis con las dendritas del sistema aferente radial, a nivel del haz espiral interno (Eybalin y cols., 1993).

Posiblemente el sistema eferente lateral que produce dopamina tenga efectos protectores contra la neurotoxicidad producida por la excesiva acción de los neurotransmisores sobre la fibra aferente tipo I (por exceso de liberación o bien por defecto de metabolización), que ocurriría en situaciones de ruido intenso y mantenido -trauma acústico- (Gil-Loyzaga y cols., 1994-a) o en condiciones de hipoxia/isquemia

(Pujol y cols., 1992-a; D'Aldin y cols., 1995); así, se ha comprobado que las lesiones producidas en las dendritas de fibras aferentes tipo I, debidas a la exposición a un ruido intenso, se evitarían con el uso de un agonista de dopamina (piribedil) antes de la exposición; de igual manera, el uso de este agonista de dopamina evitaría las lesiones producida por la isquemia severa en las dendritas localizadas bajo las células ciliadas internas (Pujol, 1993; D'Aldin y cols., 1995).

La acción del piribedil se ejercería sobre receptores metabotrópicos tipo D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>; mediante hibridación "in situ" se ha comprobado que la localización de receptores D<sub>2</sub> sería postsináptica, en las neuronas del ganglio espiral, y presináptica, en las neuronas del sistema eferente lateral (Safieddine y cols., 1994). Sin embargo no se conoce exactamente el mecanismo por el cual los agonistas D<sub>2</sub> de la dopamina mantienen el balance osmótico en la dendrita de la fibra aferente tipo I, protegiéndola contra la excitotoxicidad que habitualmente ocurren en el trauma acústico y en la isquemia.

A nivel celular y bioquímico, se ha comprobado que la dopamina tiene un amplio espectro de acciones, que se producen al interaccionar la dopamina con sus proteínas receptoras específicas (Gingrich y Caron, 1993), y que irían desde la inhibición o estimulación de la adenilato-ciclasa (Stoof y Keblarian, 1984), la activación de los canales iónicos del K<sup>+</sup> (Sasaki y Sato, 1987), alteraciones del fosfatidil-inositol (Mahan y cols., 1990), alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico (Kanterman y cols., 1991), cambios en la frecuencia de descarga neuronal (Walters y cols., 1987) y alteraciones de la expresión genómica (Gerfen y cols., 1990).

Tradicionalmente se ha aceptado la existencia de dos tipos de receptores dopaminérgicos, los D<sub>1</sub> y los D<sub>2</sub>, que son receptores metabotrópicos con unas determinadas funciones (Alonso-Solís, 1992); la unión de la dopamina a un **receptor D<sub>1</sub>**, de localización postsináptica, llevaría consigo la activación de la adenilato-ciclasa a

través de la proteína G, mientras que la activación de un **receptor D<sub>2</sub>**, o bien no tendría efecto o bien produciría una inhibición de la adenilato-ciclasa (Kebabian y Calne, 1979), una activación de los canales de K<sup>+</sup> e inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> con disminución de los niveles de Ca<sup>2+</sup> libre intracelular (Todd y O'Malley, 1993), y una disminución del recambio del inositol-trifosfato (Vallar y Meldolesi, 1989; Karadaghy y cols., 1997).

Sin embargo, con el empleo de nuevas técnicas (recombinación de ADN y clonación molecular) se ha ampliado el campo de los receptores dopaminérgicos, en el sistema nervioso central, identificándose varios subtipos para cada receptor (Gingrich y Caron, 1993; Todd y O'Malley, 1993; Karadaghy y cols., 1997); del receptor D<sub>1</sub> se han aislado dos subtipos, conocidos como D<sub>1</sub>-like, que son el D<sub>1A</sub> y el D<sub>5</sub> (en humanos) o D<sub>1B</sub> (en ratas) y del receptor D<sub>2</sub> se han aislado tres subtipos, conocidos como D<sub>2</sub>-like, que son el D<sub>2</sub> (D<sub>2S</sub>-corto y D<sub>2L</sub>-largo-), el D<sub>3</sub> y el D<sub>4</sub> (Gingrich y Caron, 1993; Karadaghy y cols., 1997). **Se han detectado en la cóclea de los mamíferos dos tipos de receptores D<sub>2L</sub> y D<sub>3</sub>, mientras que no se ha podido demostrar la existencia de los receptores D<sub>1A</sub>, D<sub>1B</sub>, D<sub>2S</sub> y D<sub>4</sub>**, bien porque no se expresen, o bien porque lo hagan en muy pequeña cantidad (Karadaghy y cols., 1997).

Respecto a su localización en la sinapsis, los receptores D<sub>1</sub>-like son de localización postsináptica, mientras que los D<sub>2</sub>-like parecen localizarse tanto presinápticamente como postsinápticamente, y habitualmente su acción la ejercen ambos al unirse a la proteína G, a través de un segundo mensajero; únicamente el D<sub>3</sub> no ejerce su acción a través de la adenilato-ciclasa, y tiene localización pre y postsináptica (Alonso-Solís, 1992).

Las repercusiones de la dopamina y de los agonistas dopaminérgicos sobre los registros electrofisiológicos son evidentes, producen una reducción de la amplitud del

potencial de acción compuesto (PAC) de manera dosis-dependiente, siendo mayor a altas intensidades de estimulación sonora; también aumenta la latencia de la onda N1 de dicho potencial (Eybalin, 1993; D'Aldin y cols., 1995-b; Oestreicher y cols., 1997), y sin embargo no se encuentra afectado el potencial de sumación (PS) ni el potencial microfónico coclear (MC), lo que supondría que la acción de la dopamina no se ejercería a nivel de las células ciliadas (Eybalin, 1993). La dopamina podría inhibir la transmisión entre las células ciliadas internas y las fibras aferentes tipo I (Eybalin, 1993), o bien inhibir la actividad de descarga de las fibras aferentes tipo I que inducen químicamente las células ciliadas internas (Oestreicher y cols., 1997).

También se sabe que la concentración de dopamina dentro de una cóclea sometida a ruido disminuye (Vicente-Torres y cols., 1993), mientras que los niveles de sus metabolitos, el ácido dihidroxi-fenil-acético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA), aumentan (Gil-Loyzaga y cols., 1993 y 1994-a), lo que supondría un aumento del recambio metabólico de la dopamina dentro de la cóclea. Sin embargo, si se hace un tratamiento con piribedil (agonista dopaminérgico D<sub>2</sub>), previo a la exposición al ruido, se comprueba que las concentraciones de dopamina, de DOPAC y de HVA dentro de la cóclea son similares a las existentes en los animales que han sido mantenidos en silencio, lo que significa que el piribedil puede bloquear el recambio metabólico de la dopamina que ocurre en las cócleas de los animales sometidos a ruidos de alta intensidad (Gil-Loyzaga y cols., 1994-a), lo que sugiere alguna clase de regulación presináptica, a través de receptores presinápticos D<sub>2</sub> o autorreceptores, en la liberación de la dopamina por parte de las fibras del sistema eferente lateral (Gil-Loyzaga y cols., 1992 y 1994-a).

Es probable que la dopamina esté involucrada en la modulación postsináptica de la neurotransmisión entre la célula ciliada interna (CCI) y las fibras aferentes tipo I, no

solo a través de receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> postsinápticos como sugieren algunos autores (Drescher y cols., 1994; Safieddine y Eybalin, 1994; D'Aldin y cols., 1995-b), sino también a través de receptores D<sub>1</sub> de localización postsináptica, como sugieren los trabajos de otros equipos de investigación (Oestreicher y cols., 1997; Gil-Loyzaga y cols., 1998-b). Este mecanismo de regulación postsináptica se pondría en marcha en situaciones fisiopatológicas, como puede ocurrir con el trauma acústico (Gil-Loyzaga y cols., 1994-a; D'Aldin y cols., 1995-b), pero también en situaciones fisiológicas, para tratar de evitar las lesiones que se producen en las dendritas de las fibras aferentes tipo I en situaciones de sobreestimulación (Oestreicher y cols., 1997).

### **SEROTONINA (5-HT).**

Es el último de los neurotransmisores detectados en el oído interno; se han empleado técnicas de cromatografía líquida de alta presión acoplada a detección electroquímica (HPLC-ED) para determinar la concentración de serotonina (5-HT) y su metabolito, el ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), en el vestíbulo del oído interno de la rata (Gil-Loyzaga y cols., 1997-b y 2000-c); el mismo método se ha empleado para la medición de la serotonina y su metabolito en la cóclea de la rata (Vicente-Torres y cols., 1996 y 1998).

Para la serotonina detectada en la cóclea se han supuesto tres posibles fuentes de origen (Vicente-Torres y cols., 1998). Técnicas de inmunocitoquímica han permitido identificar una pequeña población de fibras serotoninérgicas que tendrían una distribución similar a otras fibras del sistema olivococlear eferente lateral, y que se proyectarían a la cóclea, distribuyéndose principalmente por el plexo espiral interno, bajo las células ciliadas internas (CCI), aunque también existen colaterales que cruzando el túnel de Corti contactarían con algunas células ciliadas externas (CCE) de la primera hilera (Gil-Loyzaga y cols., 1997-a y 2000-c). Otra posible fuente de

serotonina podrían ser las fibras simpáticas del ganglio cervical superior que se proyectan hacia la cóclea, sin embargo, mediante estudios inmunocitoquímicos no se ha detectado serotonina en aquellos territorios de la cóclea inervados por fibras simpáticas (Gil-Loyzaga y cols., 1997-a); la sangre sería la tercera posible fuente de serotonina en la cóclea, principalmente en las plaquetas (Kumar y cols., 1990; Pussard y cols., 1996).

Se ha comprobado que la extirpación del ganglio cervical superior no modifica las concentraciones de serotonina (5-HT) ni del ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) de la cóclea (Gil-Loyzaga y cols., 1998-c), sin embargo la serotonina (5HT) si se modifica cuando se realiza el lavado de la sangre de la cóclea mediante perfusión aórtica, reduciéndose en un 76%, y permaneciendo invariables los niveles del ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA). Por lo tanto, se puede concluir que la serotonina que se obtiene cuando se lava la sangre de la cóclea mediante perfusión aórtica (24%) y todo el ácido 5-hidroxi-indol-acético detectados en la cóclea, podrían estar relacionados con el metabolismo de las fibras serotoninérgicas de la cóclea (Vicente-Torres y cols., 1998), que han sido recientemente identificadas por técnicas de inmunocitoquímica (Gil-Loyzaga y cols., 1997-b y 2000-c).

Experimentos con ratas sometidas a ruido intenso (90 dB SPL) y mantenido durante una hora, no han podido demostrar variaciones en la concentración de serotonina o de su metabolito (5-HIAA) en la cóclea, pero sí de dopamina, de GABA (ácido gamma-amino-butírico) o de Met-enkefalina (Vicente-Torres y cols., 1998), lo que supondría un mecanismo de liberación diferente al del resto de los neurotransmisores/neuromoduladores del sistema eferente lateral, y quizás se trataría de un sistema de inervación independiente (Gil-Loyzaga y cols., 1997; Vicente-Torres y cols., 1998).

Aunque el papel funcional de la serotonina en la cóclea no se ha evidenciado en la

actualidad, posiblemente sería el de modular la respuesta de las fibras aferentes tipo I al neurotransmisor liberado por las células ciliadas internas, ya que se ha comprobado que la inyección intracoclear de ésta produce una reducción del potencial de acción compuesto (PAC), de manera similar a otras sustancias neuroactivas del sistema eferente lateral (Bobbin y cols., 1978).

#### **ACIDO GAMMA-AMINO BUTIRICO (GABA).**

Es el aminoácido neurotransmisor inhibitor más abundante en el sistema nervioso central (SNC); se obtiene a partir del glutamato por acción de la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD) que, aparte de su localización en el sistema nervioso central y en la retina, también se ha localizado en fibras del haz espiral interno y en el haz espiral del túnel de Corti, dentro de la cóclea (Fex y Altschuler, 1984). La primera evidencia de sustancias similares al GABA (GABA-like), sustentada en experimentación con detección mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), corresponde a Drescher (Drescher y cols., 1983), quien demuestra el aumento de estas sustancias en la perilinfa de cobayas sometidos a ruidos de diferentes intensidades (Eybalin, 1993). Previamente existían evidencias de captación de GABA tritiado ( $[^3\text{H}]$ -GABA) por fibras eferentes, tanto mediales como laterales (Richrath y cols., 1974; Gulley y cols., 1979), que fueron confirmadas posteriormente por otros autores (Gil-Loyzaga y cols., 1994-b).

Posteriormente experimentos de inmunocitoquímica demuestran el posible papel del GABA como neurotransmisor del sistema eferente de la cóclea, y se describe la existencia de GABA y su enzima de síntesis, la glutamato decarboxilasa (GAD), en varicosidades y en fibras del haz espiral interno y en el haz espiral del túnel (Fex y Altschuler, 1984; Eybalin y cols., 1988; Whitlon y Sobkowicz, 1989; Ylikoski y cols., 1989; Eybalin y Altschuler, 1990; Merchán-Pérez y cols., 1990-b y c). Con el empleo de la microscopía electrónica, se ha observado en la cóclea inmunoreactividad al GABA

(GABA-like) a nivel de la sinapsis axodendrítica entre el sistema eferente lateral y el sistema aferente, por debajo de la célula ciliada interna (Eybalin y cols., 1988; Usami y cols., 1988; Eybalin y Altschuler, 1990). Algunas fibras que contienen GABA han sido localizadas formando un plexo complejo, a nivel del ápex coclear, donde llegan a contactar con las células ciliadas externas (Merchán-Pérez y cols., 1993).

La acción del GABA se produciría al interaccionar con al menos dos tipos de receptores, el GABA<sub>A</sub> y el GABA<sub>B</sub> (Hill y Bowery, 1981; Alonso-Solís, 1992). El GABA<sub>A</sub> se trata de un receptor ionotrópico, con cierta complejidad estructural, ya que estaría constituido por un lugar de reconocimiento para GABA, un lugar modulador para las benzodiazepinas y los barbitúricos y un canal iónico para paso del Cl<sup>-</sup> (Plinkert y cols., 1989; Alonso-Solís, 1992); sería de localización **postsináptica** y su activación provocaría la apertura del canal para el Cl<sup>-</sup>, lo que permitiría su paso al interior de la célula, provocando la hiperpolarización celular (Eybalin, 1993). El GABA<sub>B</sub>, identificado en los tejidos nerviosos, es un receptor metabotrópico (Wojcik y Neff, 1983) que tendría localización **presináptica** (autoreceptor) y su activación provocaría una reacción en cadena a través de un segundo mensajero, la adenilato-ciclasa o el fosfatidil-inositol, induciendo una reducción en la liberación de otros neurotransmisores por parte de las neuronas (posiblemente al inhibir la entrada de Ca<sup>2+</sup> a nivel del terminal presináptico). En la cóclea únicamente se han identificado receptores del tipo GABA<sub>A</sub> (Eybalin, 1993).

Diferentes estímulos elevan la concentración de GABA en la cóclea, la estimulación sonora (Drescher y cols., 1983), la perfusión de perilinfa rica en iones de K<sup>+</sup> (Bobbin y cols., 1990) o la administración de aminoácidos excitotóxicos análogos del glutamato como el aspartato, el AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) o el ácido kaínico (Erdo y cols., 1993; Janaky y cols., 1993).

Se ha demostrado que la microinyección de GABA en la proximidad del haz espiral interno provoca una disminución en la frecuencia de los disparos de las fibras aferentes radiales inducidos por la acción del glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) o acetil-colina, pero no tiene repercusión sobre la actividad espontánea de estas fibras (Felix y cols., 1991; Felix y Ehrenberger, 1992), por lo tanto inhibiría la transmisión entre la célula ciliada interna y la fibra aferente tipo I, protegiendo a estas fibras aferentes de excitaciones excesivas y de las posibles consecuencias neurotóxicas (Eybalin, 1993; Puel, 1995).

Cuando se supera la actividad del GABA y de todo el sistema eferente (por falta de reservas suficientes, por falta de afinidad por los receptores GABA<sub>A</sub>, por incapacidad de los receptores para ser activados,...) sobrevienen las lesiones ocasionadas por los aminoácidos excitotóxicos, de ahí que algunos grupos de trabajo estén dedicados al estudio de la potenciación de la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> mediante el uso de diferentes benzodiazepinas, para evitar estas situaciones de sobreestimulación (Jiménez-Ferreres, 1996). Se ha demostrado que con el empleo de clonazepam y de flunitrazepam se pueden evitar las lesiones morfológicas y las alteraciones electrofisiológicas provocadas por la administración de ácido kaínico, normalizándose la amplitud y la latencia del potencial de acción compuesto -PAC- (Jiménez-Ferreres, 1996).

### **ENCEFALINAS Y DINORFINAS.**

La **Met-enkefalina** y la **Leu-enkefalina** fueron los primeros péptidos opioides aislados en el cerebro a mediados de los años 70 (Hughes y cols., 1975). Su presencia en la cóclea fue detectada por técnicas de inmunoreactividad, en gatos y cobayas (Fex y Altschuler, 1981), y confirmada por técnicas de inmunofluorescencia (Eybalin y Pujol, 1984; Gil-Loyzaga y cols., 1988) y de inmunocitoquímica ultraestructural (Altschuler y cols., 1984; Eybalin y Altschuler, 1990). Su localización es muy variada, a nivel del haz

espiral interno y del haz espiral del túnel (sistema eferente lateral), haciendo sinapsis con las fibras aferentes, al nivel de las células ciliadas externas, formando a modo de parches en su base -sistema eferente medial- (Fex y Altschuler, 1981; Eybalin, 1993), aunque esta última localización podría ser debida a reacciones cruzadas como lo demuestran estudios en los que se emplean anticuerpos anti-Met-enkefalina (Eybalin y Pujol, 1984-a) y por lo tanto, la confirmación de su localización bajo las células ciliadas externas (CCE) aún no está probada. La distribución es a lo largo de toda la cóclea, tanto en animales adultos como en animales en desarrollo (Gil-Loyzaga y cols., 1988)

Las **dinorfinas** y **neoendorfinas** forman una familia de péptidos opioides cuyo precursor es la prodinorfina (o proencefalina B); la presencia de estas sustancias en el sistema eferente fue propuesta tras estudios realizados mediante radioinmunoensayo en cobayas y ratas (Hoffman y cols., 1985), y su localización en el sistema eferente lateral se demuestra con estudios de marcaje retrógrado y de inmunofluorescencia en ratas (Abou-Madi y cols., 1987).

La acción de los péptidos opioides en el sistema nervioso central se realiza a través de cuatro receptores,  $\mu$  (**mu**),  $\delta$  (**delta**),  $\kappa$  (**kappa**) y  $\sigma$  (**sigma**). Se discute si son formas proteicas diferentes o se trata de formas interconvertibles de la misma proteína; la acción general de estos receptores es inhibitoria, ya que producen inhibición de la adenilato-ciclasa e hiperpolarización secundaria a la apertura de un canal de  $K^+$  (Alonso-Solís, 1992)

Las enkefalinas en la cóclea reconocen los receptores  $\mu$  (mu) y sobre todo los receptores  $\delta$  (delta) (Kosterlitz, 1985; Puel, 1995) y sus efectos estarían mediados por un segundo mensajero, con inhibición de la adenilato-ciclasa (Simonds, 1988; Loh, y Smith, 1990), ya que no tienen repercusiones inmediatas en las concentraciones de  $K^+$  o  $Ca^{2+}$ , y sin embargo producirían cambios mantenidos en la excitabilidad neuronal

(Miller, 1984), que guardarían relación con ciertas formas de fatiga auditiva. Las dinorfinas actúan principalmente sobre receptores  $\kappa$  (kappa) (Goldstein, 1984).

En la cóclea, la liberación de encefalinas se relaciona con la estimulación sonora, ya que se ha observado un aumento de su concentración en la perilinfa y una disminución en su concentración general en la cóclea, en cobayas mantenidos bajo ruido intenso (Drescher y cols., 1983). Por el contrario la liberación de dinorfinas se relaciona con estimulaciones con altas concentraciones de  $K^+$  y con veratridina (Hoffman y cols., 1989).

Aunque no existen referencias claras a la influencia de los opioides sobre los registros electrofisiológicos, se han publicado trabajos en los que empleando pentazocina, un agonista de receptores  $\kappa$  (kappa) y antagonista de receptores  $\mu$  (mu), por vía intravenosa, se producían aumentos en la amplitud de las ondas  $N_1$  y  $N_2$  del potencial de acción compuesto (PAC) sin afectar al potencial microfónico coclear (MC) (Sahley y cols., 1991).

### **PEPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP).**

El CGRP es una sustancia sintetizada mayoritariamente en el sistema nervioso (Rosenfeld y cols., 1983); se ha detectado un  $ARN_m$  que codifica el CGRP en el complejo olivar superior (Amara y cols, 1985; Safieddine y Eybalin, 1992-a), además por estudios de inmunohistoquímica se han detectado sustancias similares al CGRP (CGRP-like) en la oliva lateral superior, en las neuronas periolivares y en el cuerpo trapezoidal (Beattie y Moore, 1991; Safieddine y Eybalin, 1992-b; Eybalin, 1993). Usando técnicas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y radioinmunoanálisis, este péptido ha sido identificado en la cóclea (Uddman, 1985).

Con técnicas de inmunocitoquímica y microscopía óptica ha sido identificado el

CGRP en el haz espiral interno, en el haz espiral del túnel y en el polo basal de las células ciliadas externas (Kitajiri y cols., 1985; Ylikoski y cols., 1989; Merchán-Pérez y cols., 1990-a). Estos hallazgos fueron confirmados con microscopía electrónica, admitiéndose que se halla como neuromodulador en las varicosidades del sistema eferente lateral que hace sinapsis con las fibras aferentes tipo I y en las sinapsis del sistema eferente medial con las células ciliadas externas (CCE) (Eybalin y Pujol, 1989; Kuriyama y cols., 1990).

Se ha observado que la perfusión intracoclear de CGRP produce una reducción de la amplitud del potencial de acción compuesto (Matsunaga y cols., 1986); este resultado contrasta con el efecto excitatorio que se obtiene en la línea lateral del *Xenopus laevis*, donde el CGRP aumentaría la frecuencia de descarga de las fibras aferentes conectadas con las células ciliadas (Adams y cols., 1987; Sewell y cols., 1991). En acción conjunta con la acetil-colina, el CGRP produciría un aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular (Shigemoto y Ohmori, 1990), sin embargo este efecto no se ha podido demostrar cuando aisladamente se emplea el CGRP (Eybalin, 1993).

#### **NEUROTRANSMISORES EN LA CELULA CILIADA EXTERNA.**

Debido a que la inervación aferente de las células ciliadas externas (CCE) es minoritaria (representa entre un 5% y un 10% de las neuronas del ganglio espiral) respecto a la de las células ciliadas internas (CCI), la actividad de esta sinapsis queda enmascarada por la actividad mayoritaria de la sinapsis entre las células ciliadas internas y las fibras aferentes tipo I, y por lo tanto se carece de un indicador de actividad de dicha sinapsis (Eybalin, 1993; Puel, 1995). El único registro aportado sobre la actividad de esta sinapsis (Robertson, 1984) sugiere que las fibras aferentes tipo II carecen de actividad espontánea y no responden a estímulos auditivos.

Para algunos autores (Lepage, 1989) la función de las fibras aferentes tipo II

podría ser la de registrar la actividad motil (tensión) de las células ciliadas externas, de manera similar al sistema de fibras intrafusales de la musculatura estriada; ello implicaría que esta inervación transmitiría sensaciones de fatiga auditiva (Brown y cols., 1988) y mensajes de daño celular (Simmons y Liberman, 1988) hacia el núcleo coclear, en respuesta a altas intensidades de estimulación que despolarizarían la célula ciliada externa y alterarían de manera importante su motilidad, liberando en este momento el neurotransmisor que actuaría sobre las dendritas de las fibras aferentes tipo II (Eybalin, 1993).

Diferentes estudios autoradiográficos empleando la captación “*in vivo*” de L-[<sup>3</sup>H]-glutamina (Ryan y Schwartz, 1984) y ensayos de inmunocitoquímica con glutamato (Altschuler y cols., 1989; Eybalin y cols., 1991), sugieren el empleo de este aminoácido como posible neurotransmisor al nivel de la célula ciliada externa; sin embargo la inmunocitoquímica no diferencia entre el glutamato metabólico y el glutamato usado como neurotransmisor, y algunos estudios de microscopía electrónica (Eybalin y cols., 1990; Eybalin y cols., 1991) orientan a favor del uso del glutamato como vía metabólica en vez de su uso como neurotransmisor.

Diferentes péptidos como la colecistoquinina, el glucagon, la sustancia P o la hormona reguladora de gonadotropinas (GnRH), han sido localizados a nivel de la célula ciliada externa (Nowak y cols., 1987), sin embargo aún serán necesarios estudios más profundos para poder llegar a conclusiones definitivas sobre los neurotransmisores empleados por dicha célula ciliada (Eybalin, 1993; Puel, 1995).

## **ACTIVIDAD ELECTRICA COCLEAR.**

En toda célula animal existe una diferencia de potencial entre la superficie interna y externa de la membrana de dicha célula, que se denomina **potencial de membrana** o **potencial de reposo**. Considerando el exterior de la célula como referencia, este potencial de membrana es negativo, y variando de unas células a otras; para la neurona el potencial de membrana es aproximadamente de -70 mV y para las células ciliadas varía entre -40/-60 mV (López-Barneo, 1992).

En situaciones de reposo la membrana celular es impermeable a los iones salvo al  $K^+$ , para el que se supone que existen canales iónicos permanentemente abiertos; a través de estos canales sale  $K^+$  a favor de un gradiente de concentración ó gradiente químico, ya que este ion es mayoritariamente intracelular, pero a esta salida se opone un gradiente eléctrico, ya que el interior celular es negativo con respecto al exterior. Cuando se iguala el flujo de salida y de entrada de  $K^+$  a través de la membrana celular se habla de **potencial de equilibrio** transmembrana (López-Barneo, 1992).

El **potencial de acción** es un cambio brusco y transitorio en el potencial de reposo generado en aquellas células que tienen membranas excitables; en situación de reposo y gracias a la permeabilidad selectiva de la membrana celular para el  $Na^+$  y el  $K^+$ , ocurre entrada progresiva de  $Na^+$  hasta que se alcanza un **valor umbral** (-40 ó -30 mV), a partir de este punto ocurre una despolarización brusca, llegando hasta +50 ó +60 mV (**potencial invertido**), entonces comienza la repolarización con la salida de  $K^+$ , también rápida, en contra de gradiente eléctrico, pero a favor de gradiente químico, volviendo a sobrepasar el potencial de reposo (-60/-80 mV), con el  $Na^+$  dentro y el  $K^+$  fuera de la célula. Para restablecer el equilibrio, la bomba de  $Na^+/K^+$  (mecanismo activo) saca  $Na^+$  y mete  $K^+$  a la célula, restableciéndose las condiciones iniciales **-postpotenciales-** (López-Barneo, 1992). En el caso de la célula ciliada interna la despolarización ocurriría

por entrada masiva de  $K^+$  al interior de la célula, a través de los “tip links” de los estereocilios (Gil-Loyzaga, 1997).

### **POTENCIALES AUDITIVOS.**

Se definen así todos los fenómenos eléctricos de la cóclea y del nervio auditivo que nos permiten, mediante su registro y medición, el análisis del funcionamiento del aparato auditivo tanto en su porción periférica como central; de los potenciales auditivos existen unos en reposo (el **potencial endococlear**) y otros evocados como respuesta a un estímulo acústico, el **potencial microfónico coclear** (MC), el **potencial de sumación** (PS), el **potencial de acción compuesto** (PAC), y el **potencial evocado auditivo del tronco cerebral** (PEATC o BERA).

### **POTENCIAL ENDOCOCLEAR.**

Refleja la diferencia de potencial existente entre la perilinfa y la endolinfa (que es de +80/+120 mV) y se debe a la diferencia en la composición iónica existente entre ambas linfas cocleares, y posiblemente esté mantenido por mecanismos activos localizados en las paredes laterales de las células epiteliales de la estría vascular; la diferencia de potencial existente entre el interior de la célula ciliada interna y la endolinfa que rodea los cilios de dicha célula ciliada será de 140 mV/160 mV aproximadamente.

Este potencial es relativamente constante, aunque puede alterarse con la estimulación acústica, y también se ve afectado por cambios metabólicos como la hipoxia y la hipoglucemia, que producen una marcada depresión de dicho potencial, e incluso puede llegar a invertirlo (Konishi y cols., 1961). Sin embargo las células no sufren una disminución tan brusca del potencial de membrana al inactivarse los canales iónicos. El potencial endococlear sería el resultado de la suma de un potencial negativo dentro de la escala media (debido principalmente a la difusión iónica del  $K^+$ ) y de un

potencial positivo dependiente de una bomba electrogénica, localizada supuestamente en la estría vascular (Prazma, 1975).

### **POTENCIALES EVOCADOS.**

Debe considerarse a Caton (1875) como el pionero en el descubrimiento de los potenciales evocados auditivos, ya que describe las “**corrientes débiles**” incluidas en los registros de la actividad eléctrica cerebral; posteriormente fue Hans **Berger**, considerado el iniciador de la electroencefalografía clínica, quién en 1930, haciendo registros de la actividad eléctrica cerebral en humanos y en gatos descerebrados, observó modificaciones de dicha actividad como respuesta a estímulos sonoros intensos, sin conseguir llegar a registrarla; gracias a los avances técnicos, a la aparición de los promediadores y al uso de computadoras y ordenadores se han conseguido identificar y registrar.

Estos potenciales son generados en respuesta a un estímulo que puede ser auditivo, visual o somatosensorial (vibratorio, táctil o eléctrico). En el caso de los potenciales evocados auditivos el **estímulo** empleado es sonoro y debe cumplir una serie de características:

- Debe tratarse de un estímulo **brusco**, de inicio y final rápido y de corta duración, con el fin de conseguir una activación sincrónica de la mayor cantidad posible de fibras aferentes. Los estímulos más frecuentemente empleados suelen ser del tipo “click”, “click filtrado” o “tone-pip” y “tone-burst” o tonos en salvas.
- Debe ser un estímulo **controlable**, es decir, que puedan modificarse sus características de duración, intensidad y frecuencia.
- Debe ser **reproducible**, de manera que la exploración con un determinado estímulo pueda ser realizada por otro explorador, pudiendo valorar, cuantificar y comparar la latencia y la amplitud de cada onda.

Dependiendo de la banda de tiempo donde se hace el análisis de la respuesta, del estímulo empleado y de la colocación de los electrodos, obtendremos diferentes potenciales evocados auditivos, la electrococleografía, los potenciales evocados auditivos del tronco cerebral (PEATC, BAER o BERA), potenciales de latencia media, potenciales evocados corticales, potenciales evocados tardíos, etc.

### **ELECTROCOCLEOGRAFIA.**

La electrococleografía refleja la actividad eléctrica de la cóclea, expresada como potencial microfónico coclear y potencial de sumación, y de la porción proximal del nervio coclear, reflejada como potencial de acción compuesto.

### **POTENCIAL MICROFONICO COCLEAR (MC).**

Este potencial fue descrito por primera vez por Weber y Bray (Weber y Bray, 1930) y los primeros en registrarlos fueron Gavilán y Sanjuán (Gavilán y Sanjuán 1961 y 1964), aunque los registros fueron realizados sin promediación y los resultados fueron tomados con cierto escepticismo (Sáinz y González, 1992). Se denomina así porque reproduce, como si de un micrófono se tratara, la onda empleada como sonido estimulante, tanto en frecuencia como en amplitud (Gibson 1978). No tiene latencia ni periodo refractario y disminuye al reducirse el estímulo que lo origina. Tradicionalmente se viene aceptando que la única manera de registrar este potencial es mediante las técnicas transtimpánicas, a través un electrodo colocado en el promontorio, y con altas intensidades de estimulación, por encima de 50/60 dB (López-Moya, 1992). Sin embargo, trabajos recientes apuntan la posibilidad de registro mediante electrodos de superficie (De los Santos y cols., 1998; Sanjuán-Juaristi, 1998; Carricondo y cols., 2001). No se ve afectado por la anoxia y puede incluso ser registrado después de la muerte. No parece existir una correlación directa entre el umbral auditivo y el umbral de los potenciales microfónicos cocleares (Carricondo y cols 1999).

Se trata de un multicomponente de polaridad alternante en el voltaje, cuyo origen parece estar situado en las células ciliadas del órgano de Corti, ya que desaparece al lesionarse las células ciliadas externas cuando se emplean aminoglucósidos, en especial la kanamicina (Dallos y Wang, 1974), o cuando se lesionan selectivamente de manera mecánica (Spoendlin y Baumgartner, 1977).

Algunos autores relacionan este potencial microfónico coclear con la despolarización de las células ciliadas externas, que ocurre cuando los cilios son desplazados en dirección excitatoria (hacia la estría vascular) permitiendo la entrada de  $K^+$  al interior celular, modificando el potencial transmembrana de reposo (Pujol, 1990). La contribución de las células ciliadas internas al potencial microfónico coclear es alrededor de la décima parte de la contribución de las células ciliadas externas (Davis y cols., 1958; Dallos y Wang, 1974; Dallos, 1976)

#### **POTENCIAL DE SUMACION (PS).**

Fue descrito por Davis (1950) y por von Békésy (1968), quienes observaron la aparición de una actividad eléctrica de tipo continuo mezclada con el trazado del potencial de acción compuesto, cuando un estímulo tonal llegaba a la cóclea (Sáinz y González, 1992).

Su origen es dudoso, pero podría estar relacionado con estructuras no lineales del interior de la cóclea, o bien con vibraciones asimétricas de la membrana basilar (López-Moya, 1992); otras teorías lo relacionan con la presencia de un gradiente eléctrico entre el potencial endolinfático y el potencial perilinfático en la membrana basilar, o con los productos de distorsión generados en el proceso de transducción acústico-eléctrico al nivel de las células ciliadas (Sáinz y González, 1992).

Se registra únicamente a altas intensidades de estimulación, superiores a 70/80 dB, y con la técnica transtimpánica de registro (López-Moya, 1992), y aparece

superpuesto al potencial de acción compuesto y al potencial microfónico coclear. Su polaridad suele ser negativa (Gibson, 1978), aunque basándose en los estudios de Davis (Davis y cols., 1950) y apoyado en los experimentos de Goldstein (Goldstein, 1954) y Honrubia (Honrubia, 1969), se postula un doble componente en este potencial, una parte negativa (-PS) y otro componente positivo (+PS). Con el incremento de las intensidades del estímulo, el potencial inicialmente positivo (+PS) se transforma en negativo (-PS) y este predomina a lo largo de todas las altas intensidades. Algunos autores consideran que el componente negativo (-PS) dependería de las células ciliadas internas, mientras que el componente positivo (+PS) dependería de las externas (Davis y cols., 1950), sin embargo esta afirmación no posee una confirmación científica.

De cualquier manera se asume que junto con el potencial microfónico coclear representaría el estado de las células ciliadas de la espira basal de la cóclea y por lo tanto reflejan el estado del receptor auditivo (López-Moya, 1992).

#### **POTENCIAL DE ACCION COMPUESTO (PAC).**

La aparición del potencial de acción en los registros electrococleográficos supone el final del proceso de transducción mecano-eléctrica a nivel del órgano de Corti y el comienzo de la actividad neural en el nervio coclear (Sáinz y González, 1992), y por lo tanto reflejará el estado de la sinapsis con las células ciliadas en la cóclea y el estado del nervio auditivo, hasta la siguiente sinapsis con las segundas neuronas de la vía auditiva, en los núcleos cocleares.

El potencial de acción del nervio coclear que se registra en la electrococleografía se compone de los potenciales de acción aislados de las múltiples fibras que lo forman, que al ser activadas cuando reciben un estímulo adecuado, descargan sincrónicamente; para conseguir la descarga sincrónica de un elevado número de las fibras del nervio coclear se deben emplear estímulos de tipo “click” o “click filtrado”, y así se hablaría de

**potencial de acción completo** cuando se utiliza un “click” para su obtención, ya que produciría una activación de casi toda la cóclea, y de **potencial de acción compuesto** cuando se utiliza para su obtención un “click filtrado”, con el que se consiguen estimulaciones selectivas de diferentes porciones de la cóclea (Gibson, 1978; Sáinz y González, 1992-a).

Este potencial constituye la modificación más visible registrada durante los primeros 5 milisegundos que siguen a la presentación de un estímulo auditivo (tiempo en el que se registra la electrococleografía) y está compuesto por tres ondas negativas denominadas  $N_1$ ,  $N_2$  y  $N_3$ , esta última es más inconstante y solamente aparece con altas intensidades de estimulación.

Existen dos técnicas de registro, una extratimpánica, incruenta, con la colocación del electrodo en el conducto auditivo externo (electrodo de cazoleta) o en el lóbulo de la oreja (electrodo de pinza) y otra transtimpánica, cruenta, mediante la colocación del electrodo, a través de la membrana timpánica, en el promontorio (López-Moya, 1992).

Cuando se realiza el análisis de un potencial de acción compuesto, habitualmente se hace referencia a las medidas de la latencia y de la amplitud de la onda  $N_1$ ; esta onda reflejaría el estado de la sinapsis y de la porción más proximal del nervio auditivo, mientras que la onda  $N_2$  tiene una significación más dudosa, podría reflejar el estado de la porción más distal del nervio coclear, próximo a los núcleos cocleares, o bien representaría la activación de una segunda población celular en el nervio coclear.

La amplitud de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto va a depender del número de neuronas que participen en la neurotransmisión, de la tasa de descarga de dichas neuronas y de su grado de sincronización (Sáinz y González, 1992), mientras que la latencia dependerá de la rapidez con la que se despolaricen ciertas neuronas del nervio auditivo, aquellas que tienen una mayor frecuencia de descarga espontánea, que

posiblemente coincidan con las neuronas que tienen mayor número de receptores no-NMDA que de NMDA.

El aumento de la actividad de descarga espontánea en las neuronas aferentes del ganglio espiral inducido por los diferentes agonistas glutamatérgicos, daría como resultado una desincronización de las mismas y una reducción de la amplitud del potencial de acción compuesto (Puel, 1995). La latencia y la amplitud de la onda  $N_1$  varía en condiciones fisiológicas o patológicas; se produce un aumento de la latencia y una disminución de la amplitud al disminuir la intensidad o la frecuencia del estímulo empleado y también se producen modificaciones en situaciones de isquemia y de trauma acústico, así como con el empleo de agonistas glutamatérgicos excitotóxicos (Puel, 1995).

Además del registro del potencial de acción compuesto del nervio coclear, hoy en día se pueden hacer registros de fibras aisladas (Tasaki, 1954; Oestreicher y cols., 1997). Colocando un electrodo en una fibra del VIII par se ha podido comprobar que existe una distribución tonotópica dentro del nervio coclear, de manera que cada fibra posee una **frecuencia característica** a la que mejor responde en intensidades próximas al umbral. Manteniendo el electrodo en tal fibra se observó que cuando se estimula el oído con otra frecuencia, con un estímulo próximo al umbral, dicha fibra no responde, pero a medida que la intensidad del estímulo aumenta la fibra comienza a responder, de manera que pequeños aumentos de intensidad en frecuencias vecinas producen descargas en fibras próximas (con frecuencias características diferentes); a medida que nos alejamos de la frecuencia característica se necesitaran mayores intensidades para que la fibra responda.

Esto tiene sus repercusiones en el registro del potencial de acción compuesto, de manera que al estimular con un “click” con una intensidad próxima al umbral

únicamente se activarían aquellas fibras del nervio auditivo que tienen una frecuencia característica igual que la del estímulo empleado, a medida que la intensidad del estímulo aumenta, se activarían las fibras de la frecuencia característica y las vecinas de manera que la amplitud del potencial de acción aumenta (Ciges, 1992); si el estímulo se hace más intenso, las células ciliadas que se activan son las de frecuencia característica, las vecinas y otras más alejadas (más próximas a la base), lo que daría lugar a que se activasen un mayor número de fibras del nervio coclear, aumentando la amplitud y disminuyendo la latencia ya que por estar más próximas a la base, donde se origina la onda viajera de Békésy, se van a activar precozmente (Sáinz y González, 1992).

### **POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS DEL TRONCO CEREBRAL (PEATC).**

Antes de la aparición de los promedidores electrónicos, la principal dificultad que existía para el registro de la actividad eléctrica de la vía auditiva era el registro de la señal eléctrica evocada, que quedaba enmascarada por el ruido de fondo y por la actividad eléctrica cerebral; el problema se resuelve con los promedidores que pueden eliminar de un registro todas aquellas señales que varían, quedando únicamente aquella señal que permanece constante en los distintos registros; esto se consigue siempre y cuando se empleen estímulos periódicamente repetidos (Ciges, 1992).

Fue Dawson (1951) el primero que empleó los promedidores para hacer registros evocados visuales, posteriormente Geisler (1958) los empleó en el campo de la audiología para la obtención de potenciales evocados auditivos; fueron Jewet (1970) y Sohmer (1970) quienes empleando electrodos de superficie (el electrodo activo en mastoides y el de referencia en el vértex) registraron una serie de ondas de corta latencia que corresponden a la actividad evocada del tronco cerebral.

Los potenciales evocados auditivos corresponden a los registros que aparecen en

los 10 a 15 milisegundos siguientes a la presentación del estímulo, cuando se realiza el registro con electrodos de superficie (vértex o frente y ambas mastoides). Consta de siete ondas positivas que se numeran con números romanos, de la onda I a la onda VII (en Europa se ha aceptado que las ondas son positivas, a diferencia de Estados Unidos donde se registran ondas negativas, siendo unas y otras imágenes especulares). Las más estudiadas son las ondas I, III y V; la onda V es la que tiene mayor importancia y expresividad clínica, se emplea fundamentalmente para valoración de umbrales auditivos, ya que es la única onda reconocible a bajas intensidades de estimulación (Barajas, 1992; López-Moya, 1992).

Se ha tratado de correlacionar cada onda de los potenciales evocados con un determinado grupo de neuronas y en este sentido apuntan los trabajos de diferentes autores (Sohmer y cols., 1974; Hasimoto y cols., 1981; Moller y cols., 1981); para ello se colocan los electrodos directamente sobre el nervio coclear, en el tronco cerebral, en el mesencéfalo o en los ventrículos laterales, en el curso de intervenciones quirúrgicas de neurocirugía. Así se relaciona la onda I con la porción proximal del nervio coclear, la onda II con la porción más distal del nervio coclear y con el núcleo coclear, la onda III con el complejo olivar superior, las ondas IV y V tienen una correlación más dudosa con el núcleo del lemnisco lateral y con el tubérculo cuadrigémino inferior (López-Moya, 1992).

## **JUSTIFICACION**

La finalidad del presente estudio es doble, pretende por una parte comprobar los efectos tóxicos que sobre la cóclea tienen los análogos del glutamato, en especial el **ácido kaínico** en administración perilinfática mediante perfusión intracoclear, y por otra parte se trata de valorar los efectos de protección contra la ototoxicidad producida por el ácido kaínico que puedan tener los agonistas de la dopamina.

Los efectos tóxicos del ácido kaínico sobre las fibras aferentes tipo I, tanto en administración intraperitoneal como en administración perilinfática, en animales de experimentación, son conocidos desde hace años, y en el presente estudio se hace una comprobación electrofisiológica y morfológica, mediante microscopía óptica, de las lesiones cuando se realiza una administración perilinfática mediante perfusión intracoclear del tóxico. Con esta vía de administración del tóxico se evitarían los problemas que puedan existir para traspasar la barrera hematoencefálica en la vía intraperitoneal; se evitarían también las posibles lesiones que el tóxico puede producir en las neuronas de la vía auditiva central y del sistema nervioso central al ser administrado por vía intraperitoneal, y que pueden repercutir en los registros electrofisiológicos; nos permitiría conocer con mayor exactitud las dosis a las que tiene repercusiones en los registros electrococleográficos y morfológicos.

Una vez establecido, mediante electrococleografía y comprobación morfológica, el modelo experimental de sordera, nos interesa conocer posibles vías para evitarla, y en este sentido el sistema eferente lateral parece tener cierta influencia, como lo demuestran los diferentes trabajos que se vienen realizando en nuestro laboratorio (Hernández-Martínez, 1993; Carricondo, 1995; Jiménez-Ferreres, 1996; Gil-Loyzaga y cols., 1998-c y 1999-a). Lo que se pretende con este estudio es comprobar el posible papel protector de la **dopamina**, uno de los neurotransmisores aislados en este sistema eferente lateral, mediante el uso de agonistas de sus receptores  $D_1$ ,  $D_2$  o  $D_1/D_2$ .

Si se considera a la pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la neurona y la pérdida en la capacidad del manejo adecuado de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{H}_2\text{O}$ , como el hecho fundamental para la génesis de las lesiones en la fibra aferente tipo I, cuando se emplea el glutamato (Hernández-Martínez, 1993; Carricondo, 1995) o cualquier otro análogo sintético, o en situaciones de hipoxia-isquemia y trauma acústico, cabría esperar una buena respuesta y cierta protección con el empleo de antagonistas de los receptores glutamatérgicos, así como con el empleo de antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los agonistas de la dopamina, al actuar sobre los receptores metabotrópicos de este neurotransmisor, activarían segundos mensajeros con funciones metabólicas poco conocidas, pero principalmente actuaría sobre receptores ionotrópicos, asociados a unos canales iónicos que permiten el paso de  $\text{K}^+$  al interior de la célula, consiguiendo con ello la hiperpolarización de las neuronas aferentes y así evitar la despolarización de las mismas por la acción del glutamato o del ácido kaínico, con lo que se evitaría la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  y su entrada masiva al interior de la célula arrastrando agua, evitándose la pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ello se considera oportuno el estudio de los efectos que varios agonistas de la dopamina ( $\text{D}_1$ ,  $\text{D}_2$  o  $\text{D}_1/\text{D}_2$ ) puedan tener sobre la neurotransmisión y sobre la protección de las fibras aferentes frente la excitotoxicidad producida experimentalmente por el ácido kaínico.

## **MATERIAL Y METODOS**

## **ANIMALES DE EXPERIMENTACION.**

Para la realización de los diferentes experimentos propuestos en esta tesis doctoral se han utilizado ratas Long-Evans machos; todos ellos estuvieron estabulados en el animalario central de la Universidad Complutense de Madrid (CAI-UCM), en habitaciones con la temperatura controlada ( $22^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ), con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (luz a partir de las 08:00 h.) y con libre acceso al agua y al alimento.

Se han escogido **ratas Long-Evans machos** ya que se ha demostrado que los niveles de dopamina y de sus metabolitos en la cóclea, el ácido homovanílico (HVA) y el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), se ven modificados en situaciones de exposición al ruido en diferente medida dependiendo del sexo del animal (Gil-Loyzaga y cols., 1993). Este hecho podría deberse a la influencia de los estrógenos y la progesterona sobre los niveles de dopamina y a los efectos antidopaminérgicos de los estrógenos al reducir el efecto postsináptico de la dopamina (Diamond, 1980; Palermo-Neto y cols., 1990). Los animales son **adultos**, de edades comprendidas entre los dos y los cinco meses, y de peso comprendido entre los 250 y 450 gramos. Estas ratas proceden de proveedores autorizados de Francia o de Estados Unidos o bien del cruce entre ellas en el propio animalario de la Universidad Complutense, donde se mantienen cumpliendo las condiciones adecuadas de cuidados, higiene, alimentación y desarrollo.

## **FARMACOS UTILIZADOS.**

- 1).- Como **tóxico** coclear se ha empleado el **ácido kaínico** (2-Carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidine), que es un agonista glutamatérgico, sintético, obtenido en los laboratorios SIGMA<sup>®</sup> (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, MO. 63178. USA); este fármaco se emplea disuelto en perilinfa artificial, obtenida según el método de Bobbin y Konishi (Bobbin y Konishi, 1974), para conseguir una concentración de **2,5 nM** de ácido kaínico; habitualmente se

conserva a temperatura ambiente y protegido de la luz.

- 2).- El **SKF-77434** hydrobromide ((+/-)-7,8-Dihydroxy-3-allyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrobromide) se trata de un agonista dopaminérgico selectivo de los receptores **D<sub>1</sub>**, obtenido en el laboratorio RBI<sup>®</sup> (RESEARCH BIOCHEMICALS INTERNATIONAL. Natick, MA. 1760-2447. USA); este fármaco se usa, disuelto en agua destilada (8 mg de SKF-77434 se disuelven en 1 ml de agua destilada), a la dosis de **8 mg/kg** de peso y se conserva a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- 3).- La **bromocriptina** (2-Bromo- $\alpha$ -ergocryptine), es un agonista dopaminérgico de los receptores **D<sub>2</sub>**, obtenido en los laboratorios SIGMA<sup>®</sup> (SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis, MO. 63178. USA). Este fármaco se disuelve con dificultad en una solución de alcohol de 96° (100  $\mu$ l) y de ácido tartárico al 0,2 % (900  $\mu$ l); se emplea 1 mg de bromocriptina disuelto en 1 ml de esta solución y se usa a la dosis de **1 mg/kg** de peso; se conserva en nevera a una temperatura de 4° y protegido de la luz.
- 4).- La **apomorfina** (R(-)-Apomorphine HCL) es un agonista dopaminérgico de los receptores **D<sub>1</sub>** y **D<sub>2</sub>**, obtenido en el laboratorio RBI<sup>®</sup> (RESEARCH BIOCHEMICALS INTERNATIONAL. Natick, MA. 1760-2447. USA). Para disolver 6 mg de este fármaco se emplea 1 ml de una solución de ClNa (0,9 %) y ácido ascórbico (0,1 %); se ha usado a dosis de **6 mg/kg** de peso, y su conservación es en nevera a 4° y protegido de la luz.

Las dosis de los agonistas dopaminérgicos empleados en este estudio se obtuvieron después de consultar la bibliografía de diferentes trabajos donde se han utilizado estas sustancias, para comprobar los efectos a nivel del sistema nervioso central (Schoenfeld y cols., 1975; Zetterström y Ungerstedt, 1984; Imperato y cols.,

1988; Jackson y cols., 1988 y 1989; Murray y Waddington, 1989; Andersen y Jansen, 1990; Jackson y cols., 1990; Brannan y cols., 1993; Mania-Farnell y cols., 1993; Mattingly y cols., 1993; Bergman y cols., 1995).

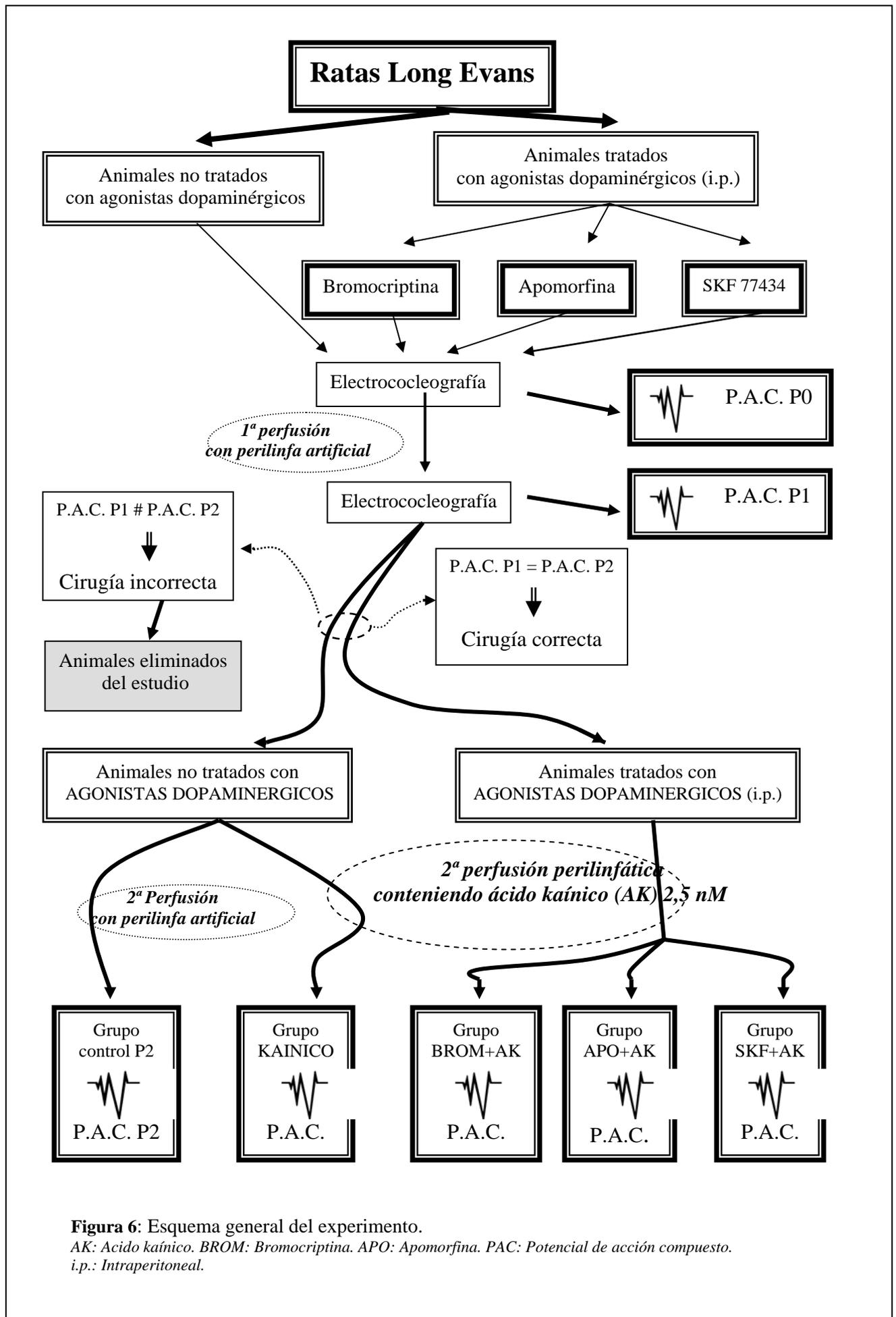
### **GRUPOS DE EXPERIMENTACION.**

Los animales utilizados en el estudio fueron distribuidos en varios grupos (Fig. 6. Pag. 125) dependiendo del tipo de tratamiento que recibieron:

- Grupo I, **control**, está compuesto por los animales en los que se realizaron dos perfusiones intracocleares con perilinfa artificial (P1 y P2), cada una de ellas durante 10 minutos, y sin emplear ningún principio activo.
- Grupo II, del **ácido kaínico**, formado por aquellos animales a los que se les realizó primero una perfusión intracoclear con perilinfa artificial durante 10 minutos, y luego una perfusión intracoclear con ácido kaínico disuelto en perilinfa artificial (2,5 nM), durante otros 10 minutos.
- Grupo III, de **bromocriptina/ácido kaínico**, en este grupo la administración de bromocriptina intraperitoneal fue previa a la perfusión intracoclear de perilinfa conteniendo 2,5 nM de ácido kaínico.
- Grupo IV, de **apomorfina/ácido kaínico**, el tratamiento con apomorfina intraperitoneal se realizó, por lo menos, una hora antes de la perfusión intracoclear del ácido kaínico (2,5 nM) disuelto en perilinfa.
- Grupo V, de **SKF-77434/ácido kaínico**, en estos animales se llevó a cabo la administración intraperitoneal de SKF-77434, al menos una hora antes de la administración intracoclear de ácido kaínico(2,5 nM).
- Grupo VI, de los **controles sin perfundir perilinfa (P0)**. Este grupo estaría formado por aquellos animales en los que se han realizado los registros electrococleográficos antes de las perfusiones intracocleares con perilinfa (control

P0), y por aquellos en los que los registros se han realizado después de haber administrado intraperitonealmente los agonistas de la dopamina y antes de las perfusiones con perilinfina (bromocriptina P0, apomorfina P0 y SKF P0).

- Grupo VII, del **disolvente de bromocriptina**, se inyecta intraperitonealmente 1 ml de la solución empleada para disolver la bromocriptina (100 µl de alcohol 96° + 900 µl de ácido tartárico al 0,2 %).
- Grupo VIII, del **disolvente de apomorfina**, en estos animales se administra intraperitonealmente 1 ml del disolvente de la apomorfina (cloruro sódico al 0,9 % + ácido ascórbico al 0,1 %).



## **VIA DE ADMINISTRACION DE FARMACOS.**

La vía de administración de ácido kaínico es intracocular, y para ello se disuelve en perilinfa artificial con el fin de obtener una concentración de 2,5 nM; la perfusión de la perilinfa conteniendo el ácido kaínico se realiza durante 10 minutos, a un flujo lento de 1,7 µl/min.

### **Técnica de perfusión intracocular:**

Tras anestesia con uretano al 28 % y con la rata colocada en decúbito supino sobre un molde adecuado, se realiza traqueotomía y colocación de cánula de plástico conectada a un aparato de respiración mecánica para ventilación, con el fin de evitar paradas respiratorias y para evitar el paso de sangre a la vía respiratoria en el caso de sangrado profuso. El abordaje de la bulla ósea, que envuelve las estructuras del oído medio, se realiza por vía cervical anterolateral, mediante la disección roma de las estructuras musculares (músculo esternocleidomastoideo, digástrico y omohioideo), vasculares (vena yugular interna, arteria carótida común, arteria estapedial) y fascias del cuello (superficial, profunda y perivascular); una vez que hemos accedido a la bulla, se labra en la misma una ventana lo suficientemente amplia que nos permita la correcta visualización de las estructuras del oído medio, la cara interna de la membrana timpánica, la columela martillo-yunque, el estribo, la arteria estapedial, la ventana redonda, y por transparencia la cóclea, reconociéndose la espira basal, la espira media y el ápex coclear.

Identificada la espira basal y el ápex de la cóclea, se fresan con sumo cuidado dos orificios de diámetro inferior a 0,5 mm, uno de ellos en el ápex y el otro en la espira basal (Fig. 7. Pag. 129), al nivel de la rampa timpánica, y muy próximo a la ventana redonda, donde se coloca la cánula que conecta a la bomba de perfusión, sellándose alrededor con cera de hueso para evitar pérdidas de los fármacos perfundidos, con lo

que se consigue que toda la solución circule por la rampa timpánica desde la base hasta el ápex, saliendo por el orificio que se labra a este nivel. La perfusión se mantiene durante 10 minutos y una vez finalizada se retira la cánula, se sellan ambos orificios con cera de hueso y se realizan los registros electrococleográficos.

En los casos del grupo I, control, se hacen dos perfusiones con perilinfa artificial, cada una de ellas durante 10 minutos, con los correspondientes registros electrococleográficos después de cada perfusión; en el grupo II del ácido kaínico, se hace una primera perfusión con perilinfa durante 10 minutos y luego se realiza la perfusión de una solución de perilinfa conteniendo ácido kaínico. Para la perfusión se utiliza una bomba de perfusión continua y de flujo lento (1,7  $\mu$ l/min.), con el fin de evitar sobrepresiones dentro de la cóclea y la lesión de las estructuras más lábiles como son la membrana basilar y la membrana de Reissner.

Cuando se emplean los agonistas de la dopamina, la vía de administración es intraperitoneal (i.p.), a un volumen de administración de 1 ml/kg. de peso de la rata, y por lo menos una hora antes de la perfusión con perilinfa y ácido kaínico.

En todo momento se mantiene controlada la temperatura de la rata entre 35-37° con un termómetro rectal (tipo NOVO 45220) y una manta eléctrica casera, de pequeño tamaño.

Las soluciones que se emplean, perilinfa o perilinfa con ácido kaínico, se conservan en nevera a una temperatura de 4° y solamente cuando se van a perfundir se calientan a una temperatura de 37°, con un calentador de agua tipo PRECISTERM (SELECTA®).

#### **ANESTESICO.**

Como anestésico para los animales de experimentación se ha empleado una solución de uretano al 28%, mediante administración intraperitoneal y a la dosis de 5

ml/kg de peso, repitiendo la administración de dosis de 0,5 ml cuando fuera necesario.

### **PERILINFA ARTIFICIAL.**

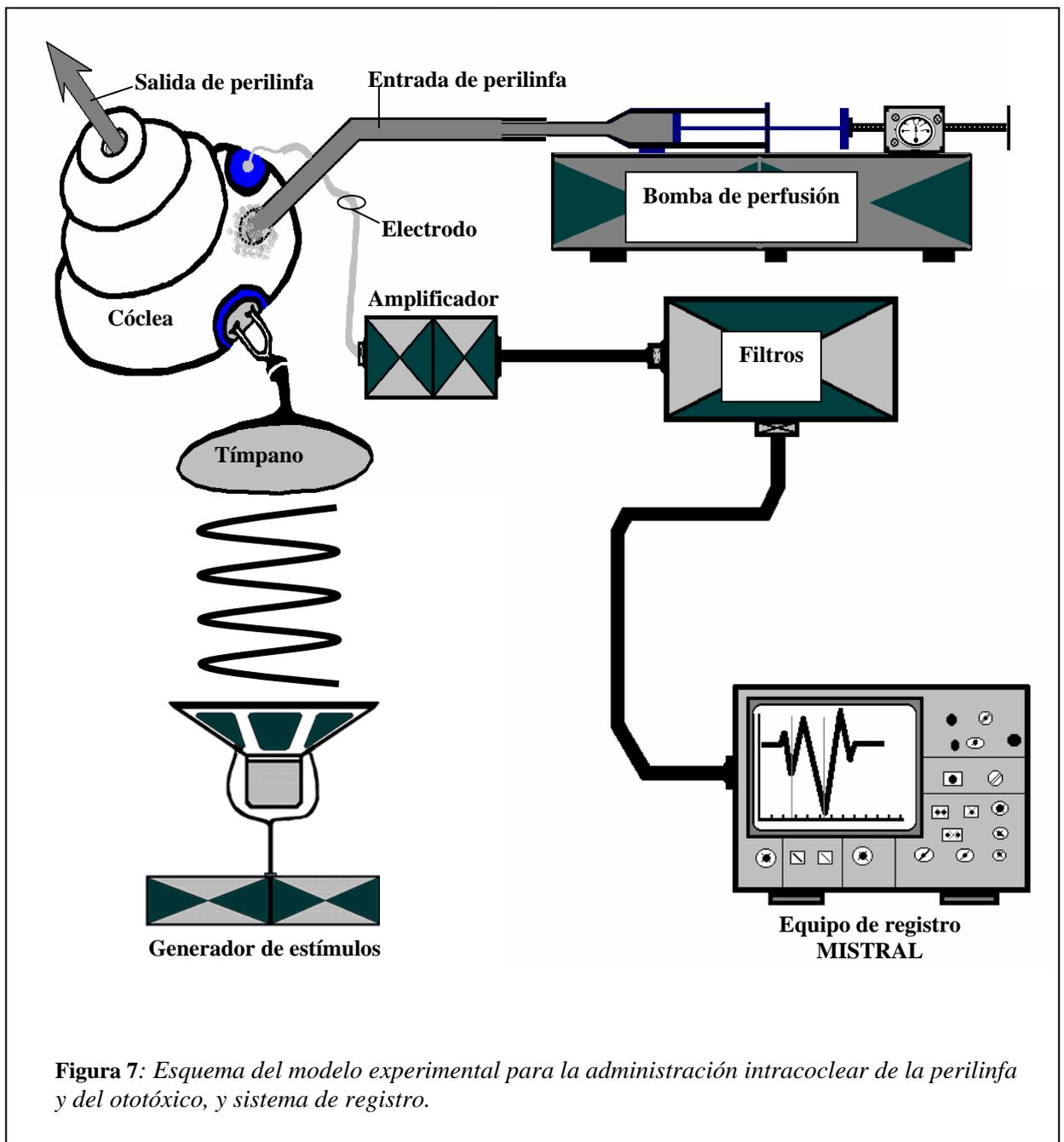
La perilinfina se prepara artificialmente según el método de Konishi (Konishi y Hamrick, 1978), en 100 ml de agua destilada se disuelven 800 mg de ClNa (137 mM), 37,2 mg de ClK (5 mM), 13,79 mg de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na (1 mM), 100 mg de CO<sub>3</sub>HNa (12 mM), 20,3 mg de Cl<sub>2</sub>Mg (1 mM), 29,4 mg de Cl<sub>2</sub>Ca (2 mM) y 217,98 mg de glucosa (11 mM); mediante un agitador se disuelven los productos y una vez filtrada la solución se ajusta el pH a 7,2 (+/-0,02), empleando ClH (1 N) o NaOH (10 N). Se conserva en nevera a una temperatura de 4° y protegida de la luz.

### **EQUIPO DE ELECTROFISIOLOGIA.**

Este equipo estaría formado por los siguientes elementos (Fig. 7. Pag. 129) :

- **Cámara anecoica y farádica**, que aísla al animal de experimentación de ruidos exteriores, cuando son inferiores a 30 dB, y de ondas electromagnéticas que puedan interferir en los registros; está colocada sobre un sistema de suspensión que evita las vibraciones.
- **Generador de estímulos o sintetizador de frecuencias** HP 8904-A (HEWLETT-PACKARD®) capaz de producir estímulos de tipo “click filtrado” de diferentes frecuencias.
- **Equipo de registro de potenciales evocados**, tipo MISTRAL (MEDELEC INTERNACIONAL®), que lleva asociado un amplificador de señales biológicas con unos filtros de paso alto y paso bajo, con dos altavoces (tipo Telephonics TDH 49-P), rojo y azul, y unos electrodos de aguja o de hilo de plata recubierto de teflon (CIBERTEC®).
- **Respirador mecánico** (New England Medical Instruments Inc. 141. A.).
- **Bomba de perfusión** de flujo continuo (Scientific & Research Instruments LTD.).

- **Lupa** para intervenciones, de varios aumentos (x6, x10, x25, x40) y de base desplazable, marca Leica (Wild M 715).
- **Sonómetro** (Promax 120).
- Termómetro rectal (Novo 45220).
- **Instrumental de microcirugía** de oído (pinzas, tijeras, bisturíes, separadores, agujas, ganchos,...).



**Figura 7:** Esquema del modelo experimental para la administración intracoclear de la perilinfa y del ototóxico, y sistema de registro.

## ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO.

Durante el tiempo de la intervención y de los registros electrofisiológicos, el animal de experimentación permanece dentro de la cámara anecoica, con una temperatura corporal controlada entre 35° y 37° y la respiración asistida con un respirador mecánico, a una frecuencia entre 60-70 respiraciones por minuto. Con el animal adecuadamente anestesiado y después de cada perfusión de perilinfa sola o de perilinfa conteniendo ácido kaínico, se realizan los registros de potenciales evocados auditivos, para lo cual se emplean tres electrodos, el electrodo activo que se sitúa en contacto con la membrana que recubre la ventana redonda, es de plata recubierto de teflon con una pequeña bolita en la punta, el electrodo de referencia es de aguja y se fija en la musculatura masetera ipsilateral, y el electrodo de tierra, que también es de aguja, se fija en la axila contralateral; estos tres electrodos están conectados a un amplificador de señales biológicas (Fig. 7. Pag 129), que también sirve de filtro de señales de paso bajo (30 Hz) y de paso alto (3000 Hz). Para asegurarse del correcto posicionamiento de los electrodos se visualizan las oscilaciones de la línea base en la pantalla del ordenador, o bien comprobando que los potenciales microfónicos cocleares rellenan toda la pantalla al emitir un sonido fijo, lo que indica que el electrodo activo estaría en contacto con la membrana de la ventana redonda.

Una vez que los electrodos se encuentran situados se comienza con los registros de los potenciales evocados auditivos, que en el presente estudio se limitan a la **electrococleografía**; como estímulos se van a emplear los “**click filtrados**” (tone pips) con unas frecuencias fijas de 22 kHz, 18 kHz, 16 kHz y 12 kHz, y con intensidades decrecientes, de 10 en 10 dB, desde 90 hasta 30 dB, que son generados por un sintetizador de funciones. Esta señal generada en el sintetizador de funciones es eléctrica y se mide en voltios (V) o en milivoltios (mV) y será transformada en señal

acústica en los altavoces, estableciéndose una correlación entre la intensidad eléctrica (V o mV) y la intensidad del sonido (dB) en el altavoz, quedando para cada frecuencia de la siguiente manera:

- **22 kHz:** 1,75 V / 90 dB, 500 mV / 80 dB, 175 mV / 70 dB, 50 mV / 60 dB, 15 mV / 50 dB, 4 mV / 40 dB y 0,25 mV / 30 dB.
- **18 kHz:** 1 V / 90 dB, 300 mV / 80 dB, 110 mV / 70 dB, 40 mV / 60 dB, 10 mV / 50 dB, 2,5 mV / 40 dB y 0,2 mV / 30 dB.
- **16 kHz:** 950 mV / 90 dB, 300 mV / 80 dB, 100 mV / 70 dB, 33 mV / 60 dB, 10 mV / 50 dB, 2,2 mV / 40 dB y 0,35 mV / 30 dB.
- **12 kHz:** 2,75 V / 90 dB, 900 mV / 80 dB, 300 mV / 70 dB, 90 mV / 60 dB, 25 mV / 50 dB, 6,5 mV / 40 dB y 1 mV / 30 dB.

Periódicamente se hacen comprobaciones con el sonómetro para confirmar que los aparatos están perfectamente calibrados, especialmente los altavoces.

El oído contralateral al oído en estudio es enmascarado mediante “**ruido blanco**”, con intensidades iguales a las del sonido estimulador, con el fin de asegurar que toda la señal eléctrica registrada con el electrodo activo corresponda a la actividad del oído estudiado y no a la suma de actividades del oído estudiado y a la generada en el oído contralateral, por la señal del altavoz del oído estudiado.

Por cada intensidad de cada frecuencia se hacen 64 mediciones o pases, con una cadencia de 10 “click filtrados” por segundo y con una ventana de análisis de 10 milisegundos (la actividad eléctrica se suele registrar en los primeros 3 milisegundos). La respuesta biológica es tratada en un amplificador, ya que al ser de muy baja intensidad no podría ser medida por el equipo de registro, y se filtra mediante filtros de paso alto (3.000 Hz) y de paso bajo (30 Hz), para evitar la sobresaturación ya que al amplificarse también aumentaría el ruido de fondo. La señal resultante (potencial de

acción compuesto) que aparece de cada intensidad en la pantalla del ordenador, es registrada en una memoria.

Los parámetros que se miden del **potencial de acción compuesto** (PAC) resultante son la **latencia** y la **amplitud** de la onda  $N_1$ , teniendo en cuenta que para medir la latencia se debe considerar el retraso que se acumula por el hecho de no generarse el estímulo en el mismo aparato donde se registra; se ha calculado el retraso acumulado en 15,4 milisegundos, este retraso nos obliga a hacer un análisis de la respuesta en los 20 milisegundos siguientes al estímulo, en lugar de ser en los 10 milisegundos siguientes, como se hace en el caso de emplearse como estímulo el “click” normal, no filtrado, ya que se genera en el mismo aparato en el que se registra.

#### **MATERIAL PARA ESTUDIO MORFOLOGICO.**

- Molde de inclusión con silicona marca Balzers Union AG, con punta piramidal y de 4 mm de profundidad.
- Cuchillas de tallar GEM/STAR.
- Vidrio para cuchillas marca LKB de 5 x 40 mm.
- Placa eléctrica (CMO) de 70°.
- Ultramicrotomo LKB Bromma 8800-III Ultratome.
- Estufa marca Heraeus.
- Medio de montaje Eukit.
- Microscopio Oxfron Trade.

#### **MATERIAL HISTOLOGICO:**

- Como **fijador** se utiliza una solución de glutaraldehído al 2,5% y tampón fosfato 0,12 M y de pH 7,33.
- **Descalcificador:** se emplea una solución de ácido ascórbico al 1 % y de ClNa al 0,9 %.

- La **deshidratación** se hace según la siguiente secuencia:

H <sub>2</sub> O destilada	2 pases de 10 minutos.
Etanol al 50 %	1 pase de 10 minutos.
Etanol al 70 %	2 pases de 10 minutos.
Etanol al 96 %	3 pases de 10 minutos.
Etanol al 100 %	3 pases de 15 minutos.
Oxido de propileno	3 pases de 10 minutos.

- La **osmicación** se realiza con tetróxido de osmio al 1 % en tampón fosfato 0,2 M.

- **Inclusión en Spurr** (preparado con NSA 26gr. + ERL 4206 10gr. + DER 10gr. + DMAE S-10,4gr.).

- **Tinción** con azul de Richardson.

### **ESTUDIO MORFOLOGICO.**

Una vez finalizado el estudio electrofisiológico, se realiza la perfusión intracoclear de un fijador (glutaraldehído al 2,5 % con tampón fosfato 0,12 M a un pH de 7,33), a través de los orificios empleados para la perfusión perilinfática, y antes de sacrificar al animal, con ello se consigue que el fijador circule desde la espira basal hasta el ápex por la rampa timpánica y difunda a través de la membrana basilar hasta la rampa coclear, fijando las células del órgano de Corti; se sacrifica el animal y se extraen las cócleas inmediatamente, postfijándose en una solución del mismo fijador durante dos horas a temperatura ambiente o durante toda la noche en la nevera.

Posteriormente se lavan en una solución de tampón fosfato 0,1 M y se someten a un proceso de descalcificación con ácido ascórbico al 1 % y CNa al 0,9 %; una vez descalcificadas, se procede a la limpieza de los restos que no sirven para el estudio morfológico. Las cócleas descalcificadas deben ser deshidratadas, para lo que se

emplean soluciones de etanol en concentraciones crecientes; una vez deshidratadas, se incuban con ácido ósmico al 4 % en tampón fosfato 0,2 M, durante una hora, en oscuridad y con agitación continua, y al cabo de esta hora se lavan con PBS (tampón fosfato salino) y se hace la inclusión. La inclusión en Spurr dura tres días, el primer día se incuban las piezas con 50 % de Spurr y 50 % de óxido de propileno, el segundo día se incuban en Spurr y durante el tercer día se incuban las cócleas en Spurr solo y se realiza la polimerización del mismo en estufa a 60° durante 48 horas.

Una vez finalizado el proceso anterior, se procede a realizar los cortes ultrafinos (1µm de espesor) con el ultramicrotomo y a su tinción con azul de Richardson. De cada pieza fijada se hicieron entre tres y seis preparaciones histológicas, y en cada preparación hay de seis a diez cortes seriados de la cóclea en estudio, mostrándose en un medio de montaje Eukit.

#### **ANALISIS DE LOS RESULTADOS.**

El estudio de los resultados se realiza mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA), de una vía (latencia o amplitud), ya que solo existe una variable independiente (tratamiento); se analiza la variabilidad dentro de cada grupo y la variabilidad entre los diferentes grupos. Cuando del análisis de la varianza se deduce que existe un resultado estadísticamente significativo, se somete a un test “*a posteriori*” tipo Bonferroni, donde se realizan comparaciones múltiples entre los diferentes grupos.

## **RESULTADOS**

En el diseño del presente estudio se han tenido en cuenta los diferentes grupos de experimentación tal y como se refleja en las páginas 123 y 125 (Fig. 6). En el **grupo control** se incluyeron a aquellos animales en los que se realizó un primer registro electrococleográfico antes de proceder a la perfusión perilinfática (P0); posteriormente se realizaron dos perfusiones intracocleares de perilinfa artificial sucesivas (P1, una perfusión y P2, dos perfusiones), con los correspondientes registros electrococleográficos después de cada perfusión; estos dos grupos, P1 y P2, nos servirán fundamentalmente para conocer las repercusiones electrococleográficas y morfológicas derivadas de la manipulación coclear y de la perfusión con perilinfa artificial; la segunda perfusión de perilinfa artificial (P2) se ha considerado como el verdadero grupo control de nuestro estudio, para las sucesivas comparaciones con el grupo del tóxico y con el grupo de los agonistas dopaminérgicos.

El **grupo tratado con ácido kaínico** recibió una primera perfusión con perilinfa únicamente, sin ningún principio activo, y durante diez minutos, posteriormente se realizó la comprobación electrococleográfica (potencial microfónico coclear y potencial de acción compuesto) para confirmar que el oído perfundido no se había lesionado como consecuencia de esta primera perfusión; a continuación se realizó una segunda perfusión de perilinfa conteniendo ácido kaínico, durante otros diez minutos, y también se realizaron nuevos registros electrococleográficos que nos servirán para conocer los efectos derivados de la perfusión del tóxico, al compararlos con los resultados obtenidos de los controles P2 (segunda perfusión con perilinfa).

Con el **grupo de los agonistas de la dopamina** se procedió del siguiente modo, una vez que se habían administrado por vía intraperitoneal y al cabo de unas dos horas, se realizó un primer registro electrococleográfico antes de realizar ninguna perfusión perilinfática, que nos servirá, al compararlo con los controles P0, para conocer los

efectos que los agonistas de dopamina pudieran tener sobre la audición en condiciones basales (Bromocriptina P0, Apomorfina P0 y SKF P0); se continuó con una primera perfusión de perilinfa y un nuevo registro electrococleográfico, para comprobar que la cóclea del animal no se había lesionado como consecuencia de la manipulación, y luego una segunda perfusión de perilinfa conteniendo ácido kaínico, con el correspondiente registro electrofisiológico, que nos permitirá valorar los efectos que los agonistas de dopamina tienen frente a la ototoxicidad provocada por el ácido kaínico.

Por último, en el **grupo de los vehículos** de los agonistas de la dopamina se compararon los resultados electrococleográficos obtenidos tras la administración intraperitoneal de dichos disolventes, con los resultados electrococleográficos obtenidos en el grupo control P0 antes de hacer ninguna perfusión perilinfática, con el fin de valorar si estos podrían influir en los resultados del estudio.

### **RESULTADOS DEL GRUPO CONTROL.**

En este grupo se compararon las medias y las desviaciones estándar respecto a la media, de la latencia y la amplitud de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto, entre los individuos que habían sido sometidos a diferentes experimentos; por una parte estaban los animales a los que no se les había realizado perfusión perilinfática (control P0), por otra aquellos a los que se les había hecho una única perfusión con perilinfa (control P1), y por último, los que se les habían hecho dos perfusiones con perilinfa (control P2). Del experimento se desecharon aquellos animales en los que existía una alteración en el registro electrococleográfico del potencial microfónico coclear, con disminución importante de la su amplitud, ya que se consideró que con la manipulación se había provocado una lesión coclear, ocasionando una sordera yatrogénica.

Los valores obtenidos en este grupo demostraron que existían unas diferencias en

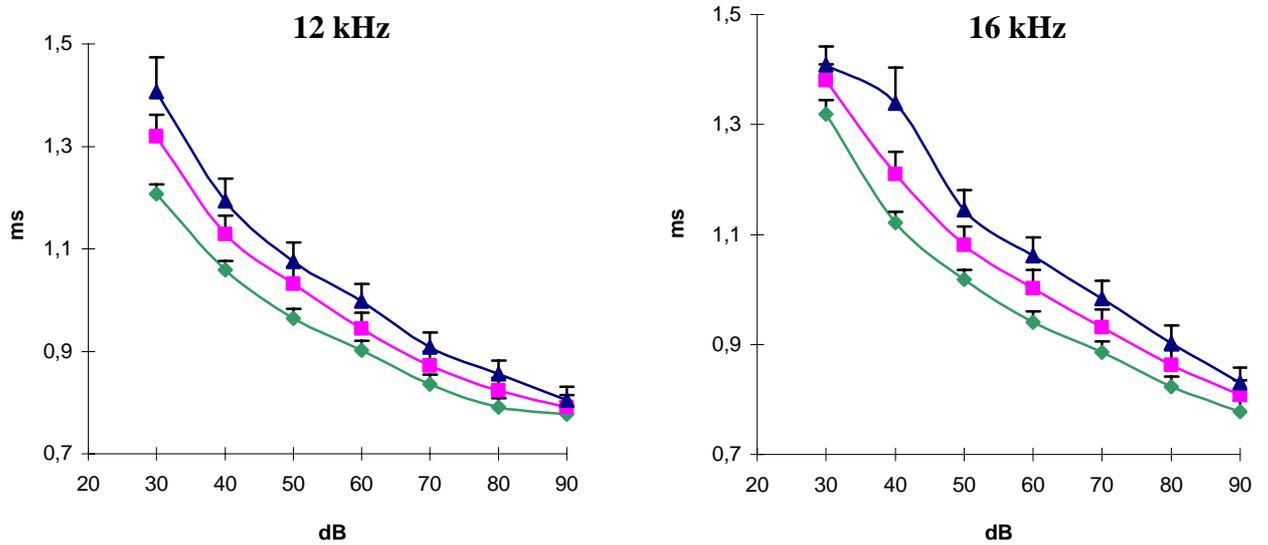
las medias, más importante sobre todo para las amplitudes, entre los animales a los que no se les había hecho perfusión (control P0) y a los que se les habían hecho una (control P1) o dos perfusiones perilinfáticas (control P2), como queda patente en los gráficos de las páginas 139 y 140; sin embargo no se apreció diferencia significativa, ni en la amplitud ni en la latencia, entre los animales a los que se les habían hecho una (control P1) o dos perfusiones perilinfáticas (control P2).

Estos resultados vendrían a demostrar que con la manipulación inicial de la cóclea, la realización de los agujeros, la colocación de la cánula de perfusión, la perfusión perilinfática inicial, el sellado de los orificios, se modifica el experimento y cambian las condiciones basales, pero sin embargo estas modificaciones no siguen aumentando con las sucesivas perfusiones perilinfáticas, lo que nos permitirá considerar a la segunda perfusión perilinfática (control P2) como nuestro verdadero control y punto de referencia para sucesivas comparaciones.

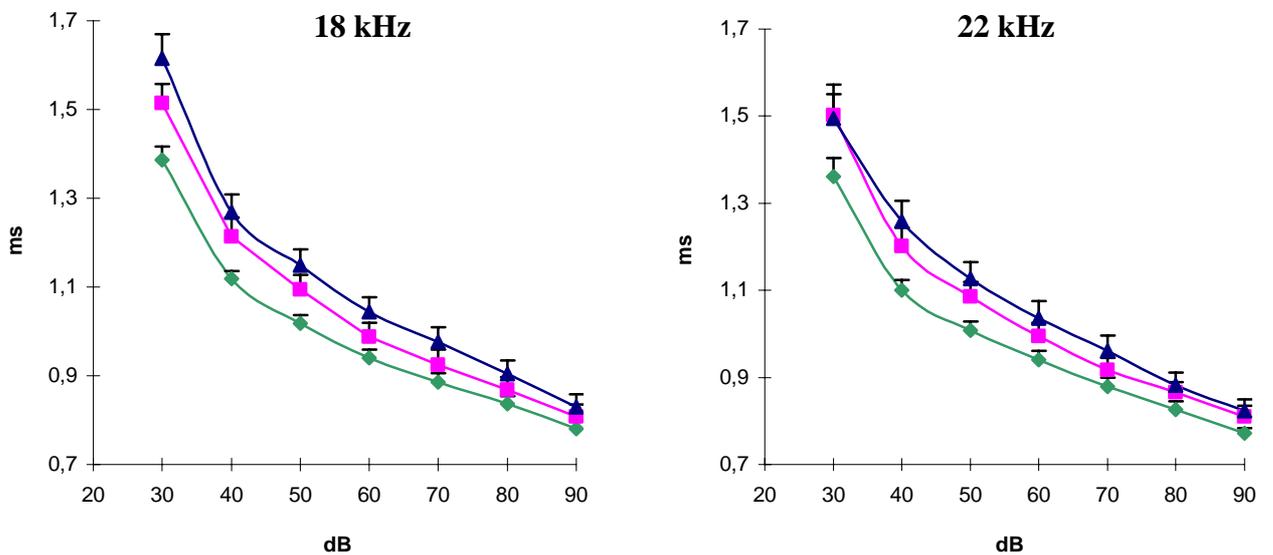
El estudio morfológico de la cóclea y del órgano de Corti con microscopía óptica, muestra una estructura y anatomía normales que no se diferencian de la que corresponde a una cóclea sin manipular (Fig. 8 y 9. Pag. 141).

## GRUPO CONTROL

### LATENCIA



### Perilina P0. Perilina P1. Perilina P2.

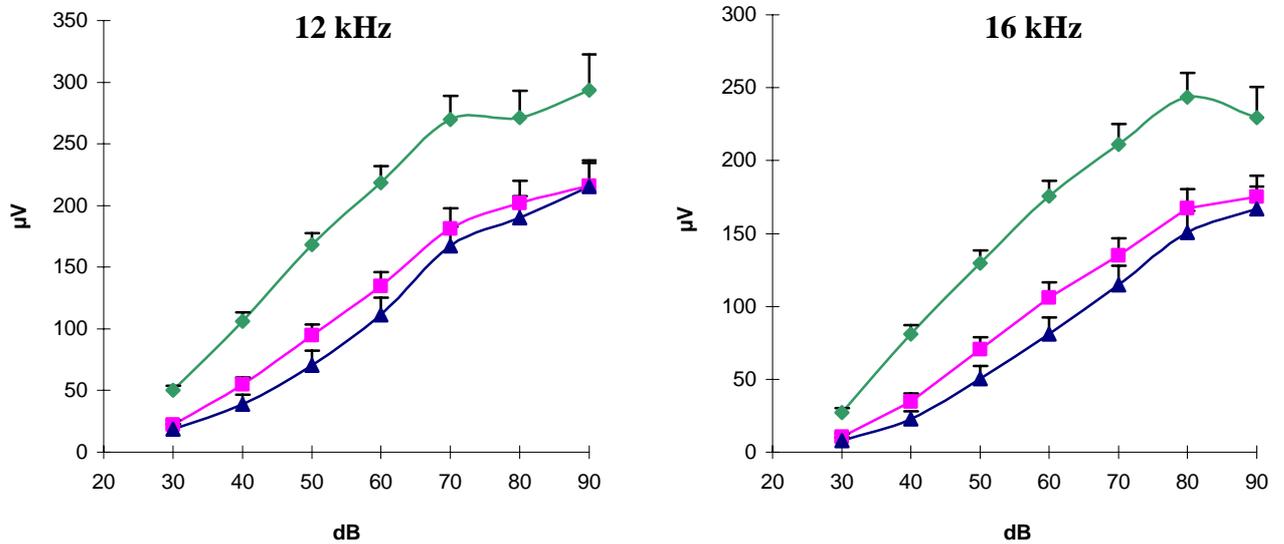


**Gráfico 1:** Latencias de la onda N1 del potencial de acción compuesto en los **grupos control**.

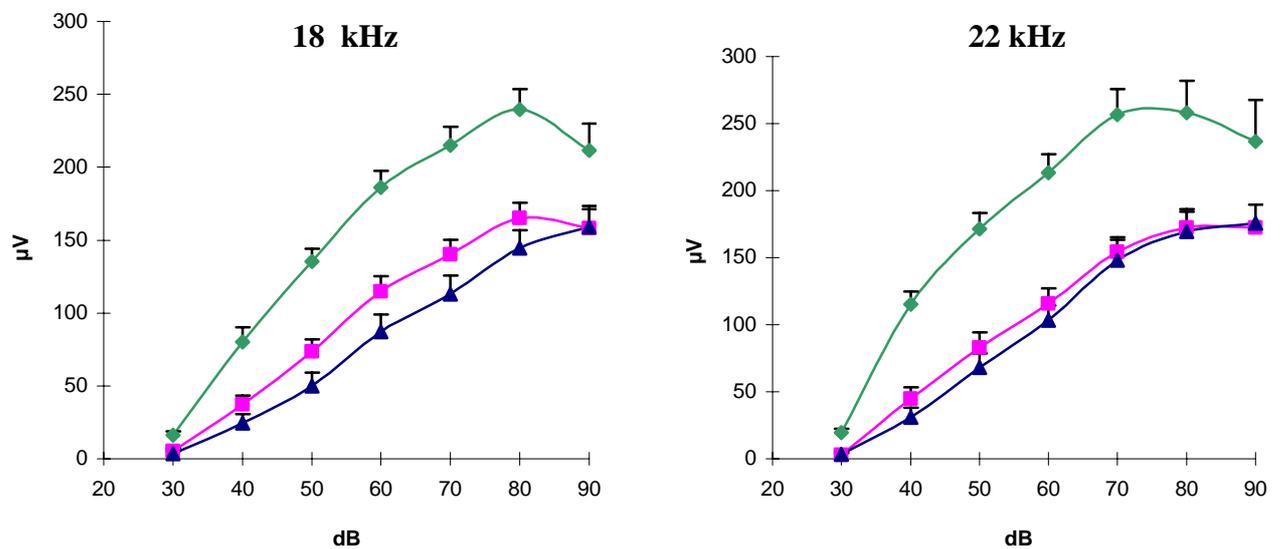
dB: decibelios. ms: milisegundos.

## GRUPO CONTROL

### AMPLITUD

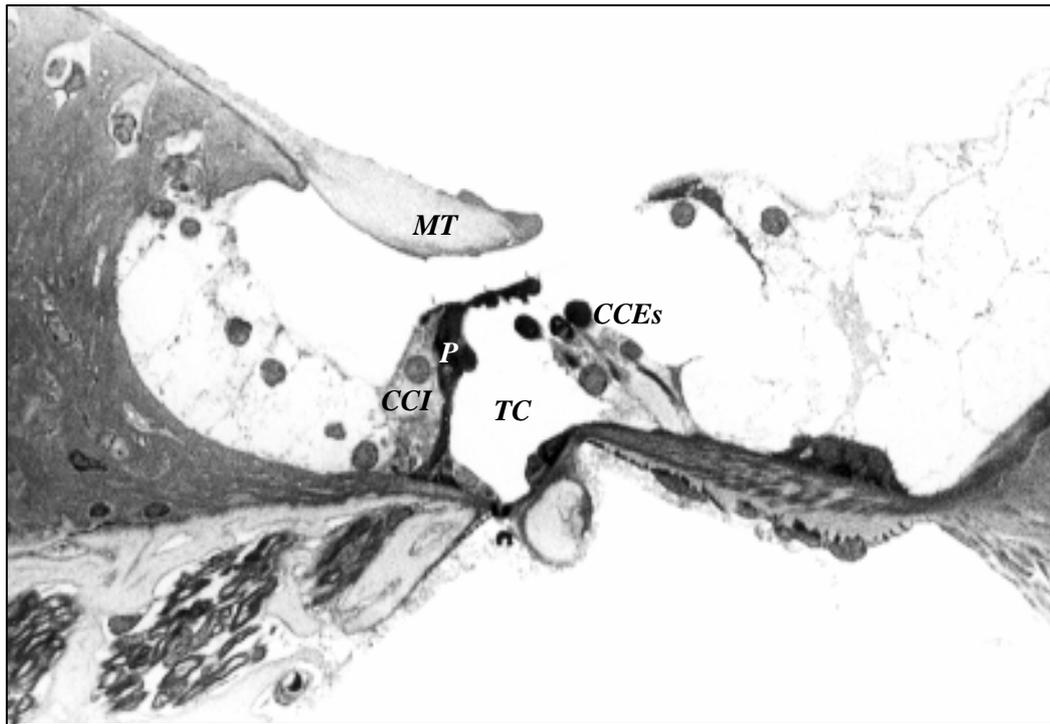


### Perilinf P0. Perilinf P1. Perilinf P2.

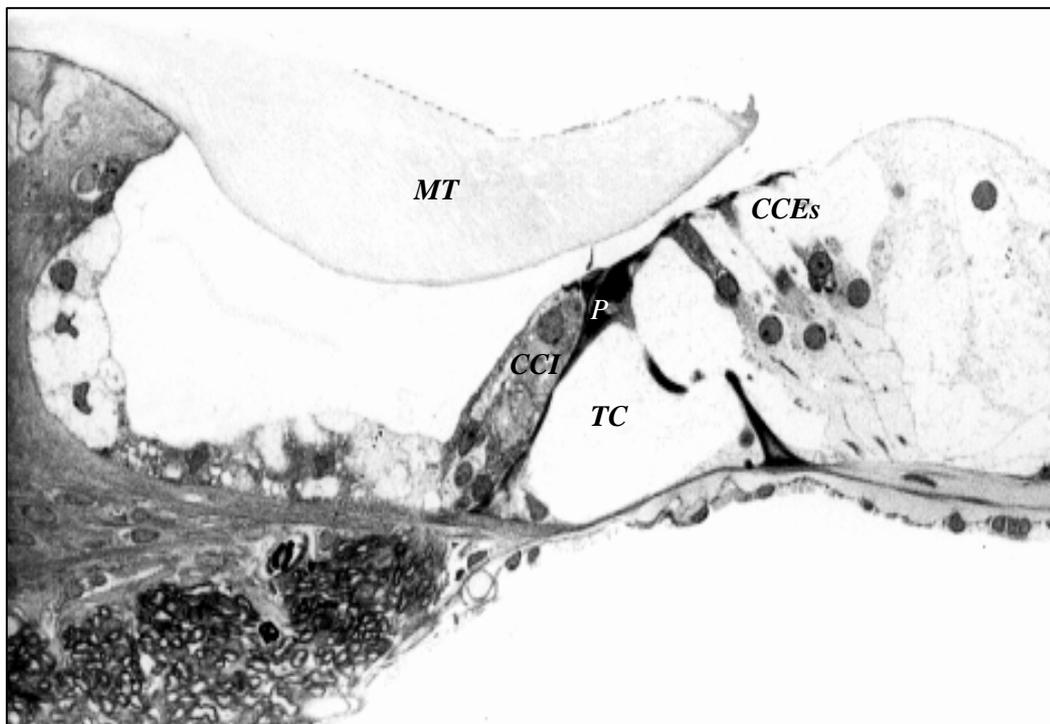


**Gráfico 2:** Amplitudes de la onda N1 del potencial de acción compuesto en los grupos control.

dB: decibelios.  $\mu$ V: microvoltios.



**Figura 8:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira basal (x40), obtenido de aquellos animales en los que se han realizado **dos perfusiones con perilinfa artificial** exclusivamente. TC: túnel de Corti. CCI: célula ciliada interna. MT: membrana tectoria. CCEs: células ciliadas externas. P: célula de los pilares.



**Figura 9:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira media-apical (x40), obtenido de aquellos animales en los que se han realizado **dos perfusiones con perilinfa artificial** exclusivamente. TC: túnel de Corti. CCI: célula ciliada interna.. MT: membrana tectoria. CCEs: células ciliadas externas. P: célula de los pilares.

## **RESULTADOS DEL TRATAMIENTO CON EL ACIDO KAINICO Y CON LOS AGONISTAS DOPAMINERGICOS.**

En este apartado se realiza una comparación múltiple de los resultados electrofisiológicos obtenidos tras la medición de la latencia y de la amplitud de la onda N1 del potencial de acción compuesto, después de realizar dos perfusiones perilinfáticas (control P2), con los resultados de los mismos parámetros obtenidos tras una primera perfusión con perilinfa y una segunda perfusión de perilinfa conteniendo ácido kaínico en una concentración de 2'5 nM, y con los obtenidos tras la administración intraperitoneal de los agonistas de la dopamina, con la posterior perfusión de perilinfa y de perilinfa con ácido kaínico.

Los datos obtenidos para las latencias y las amplitudes se han comparado mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA), dando como resultado la significación estadística, con una  $p < 0,05$ , para la mayoría de las frecuencias exploradas, tanto para la amplitud como para la latencia, salvo en intensidades bajas (30 y 40 dB) para las frecuencias de medias (16 y 18 kHz), siendo especialmente significativas las comparaciones de las latencias en intensidades medias y altas, como se demuestra en los gráficos de las páginas 144 y 145.

El umbral auditivo de la exploración, que habitualmente se encuentra en 30 dB para todas las frecuencias de los diferentes experimentos, se encuentra aumentado (40 dB) en los experimentos llevados a cabo con el ácido kaínico, sobre todo en las frecuencias de 16 y 22 kHz.

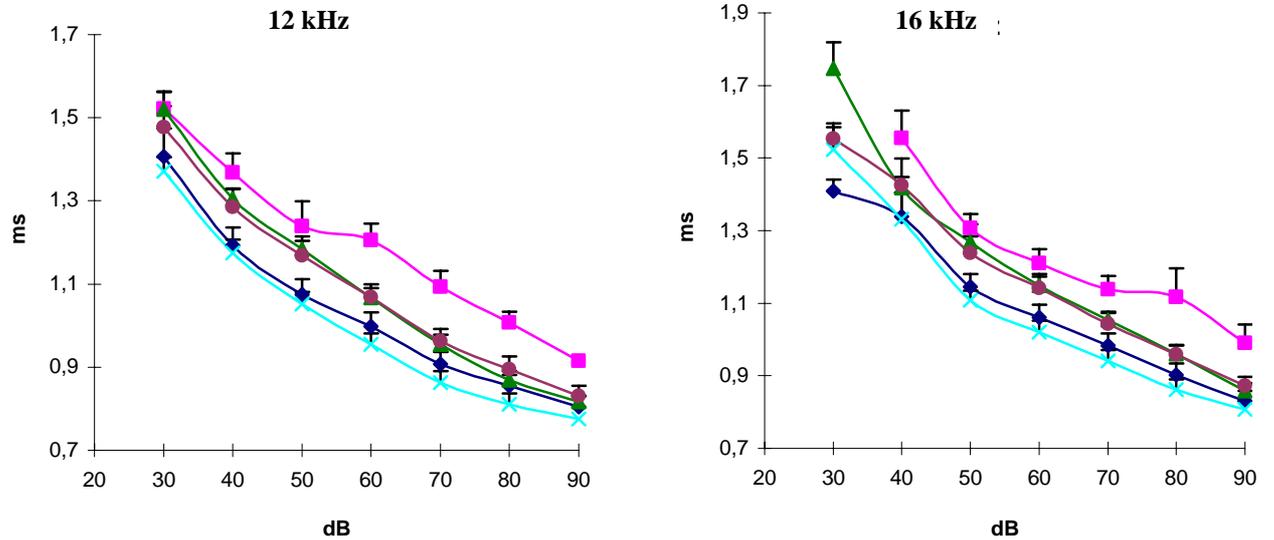
En el estudio de las preparaciones de microscopía óptica se aprecian diferencias importantes entre las cócleas del grupo control (Fig. 8 y 9. Pag. 141), al compararlas con aquellas preparaciones obtenidas de las cócleas en las que se ha perfundido ácido kaínico, donde aparece una vacuolización y edematización con rotura de las membranas

de las neuronas existentes bajo las células ciliadas internas, plexo espiral interno, mucho más importante en las espiras más basales que en el ápex coclear (Fig. 10 y 11. Pag. 146).

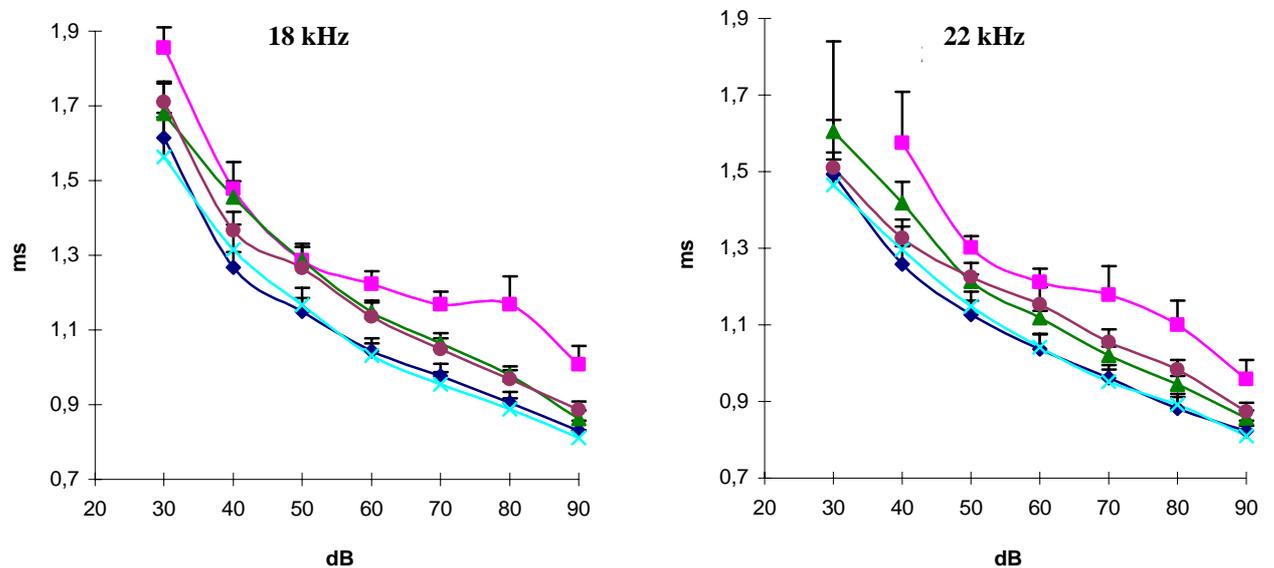
Aquí se hace una comparación en conjunto de todos los agonistas de dopamina entre sí, con el grupo control y con el grupo del tóxico.

# AGONISTAS DOPAMINERGICOS

## LATENCIA



Perilina P2. Acido kaínico. Bromocriptina. Apomorfina. SKF 77434.

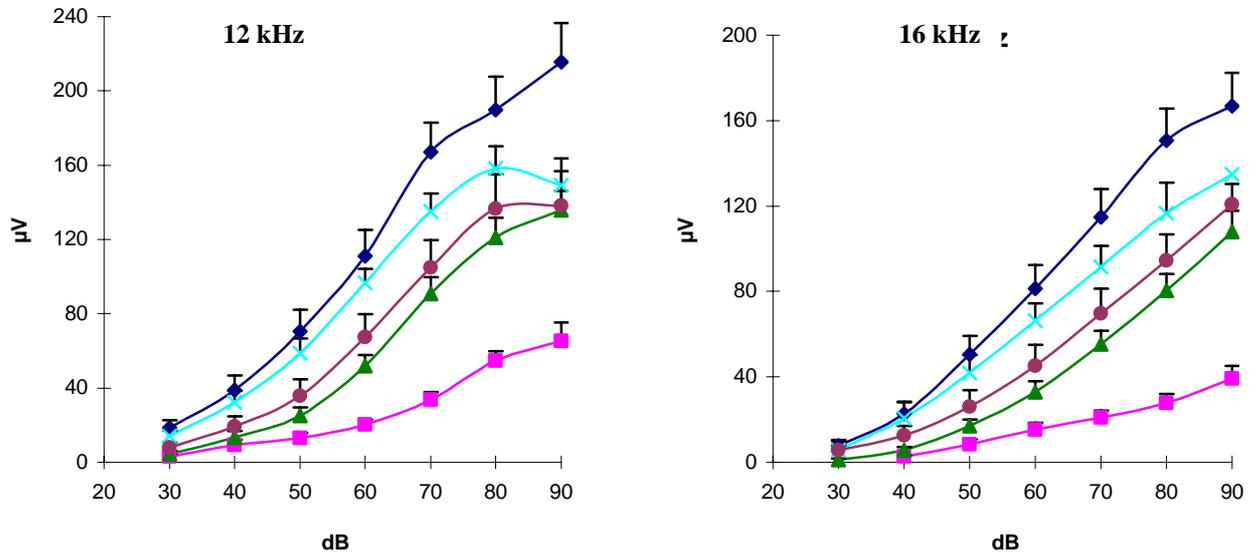


**Gráfico 3:** Latencias de la onda N1 del potencial de acción compuesto en el grupo de los agonistas dopaminérgicos.

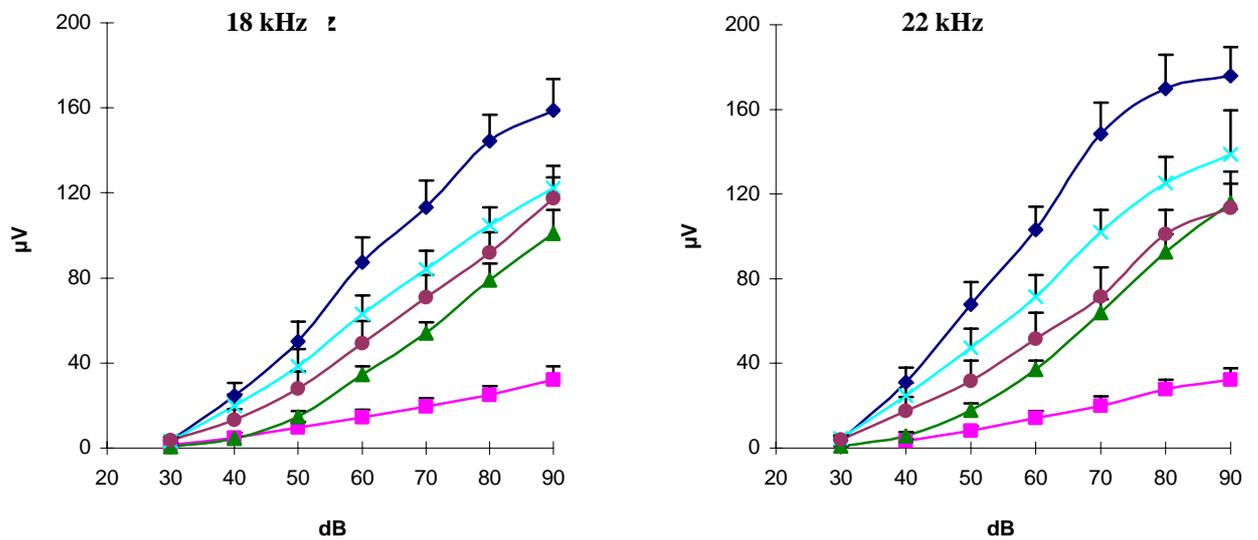
dB: decibelios. ms: milisegundos.

# AGONISTAS DOPAMINERGICOS

## AMPLITUD



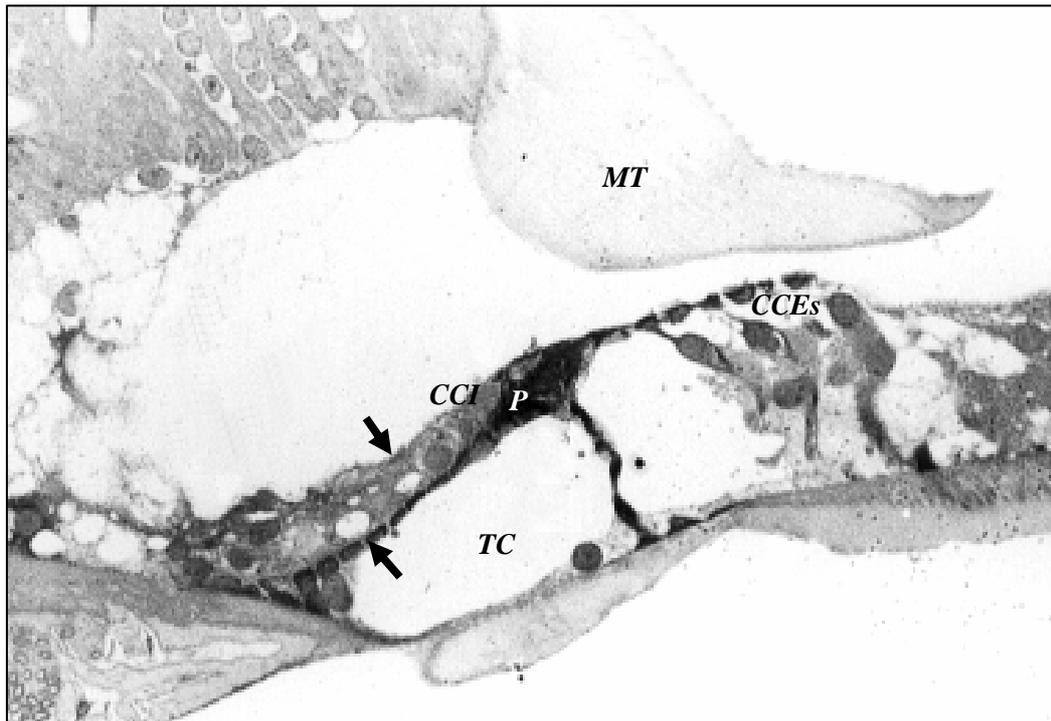
Perilina P2. Acido kaínico. Bromocriptina. Apomorfin. SKF 77434.



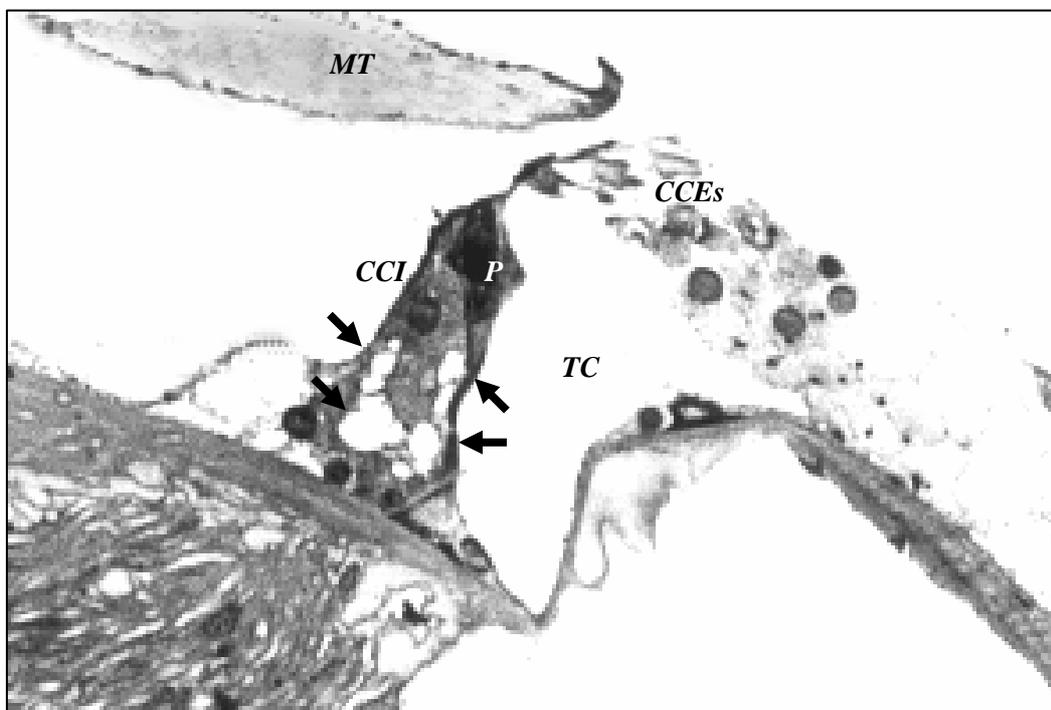
**Gráfico 4:** Amplitudes de la onda N1 del potencial de acción compuesto en el grupo de los agonistas dopaminérgicos.

dB: decibelios.  $\mu$ V: microvoltios.

## ACIDO KAINICO



**Figura 10:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira basal (x40), obtenido de aquellos animales en los que se ha realizado una **perfusión intracoclear con ácido kaínico disuelto en perilinfa artificial**, donde se aprecia la vacuolización existente bajo la célula ciliada interna. TC: túnel de Corti. CCI: célula ciliada interna.. MT: membrana tectoria. CCEs: células ciliadas externas. P: célula de los pilares.



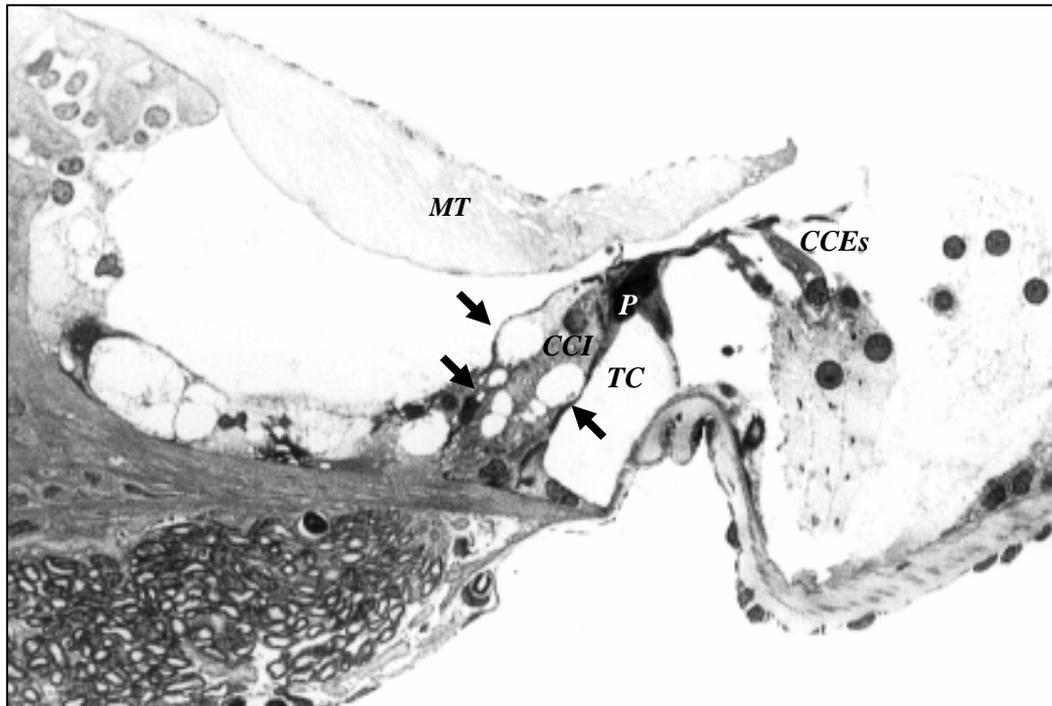
**Figura 11:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira media-apical (x63), obtenido de aquellos animales en los que se ha realizado una **perfusión intracoclear con ácido kaínico disuelto en perilinfa artificial**, donde se aprecia una vacuolización intensa bajo la célula ciliada interna. TC: túnel de Corti. CCI: célula ciliada interna.. MT: membrana tectoria. CCEs: células ciliadas externas. P: célula de los pilares.

### **Bromocriptina.**

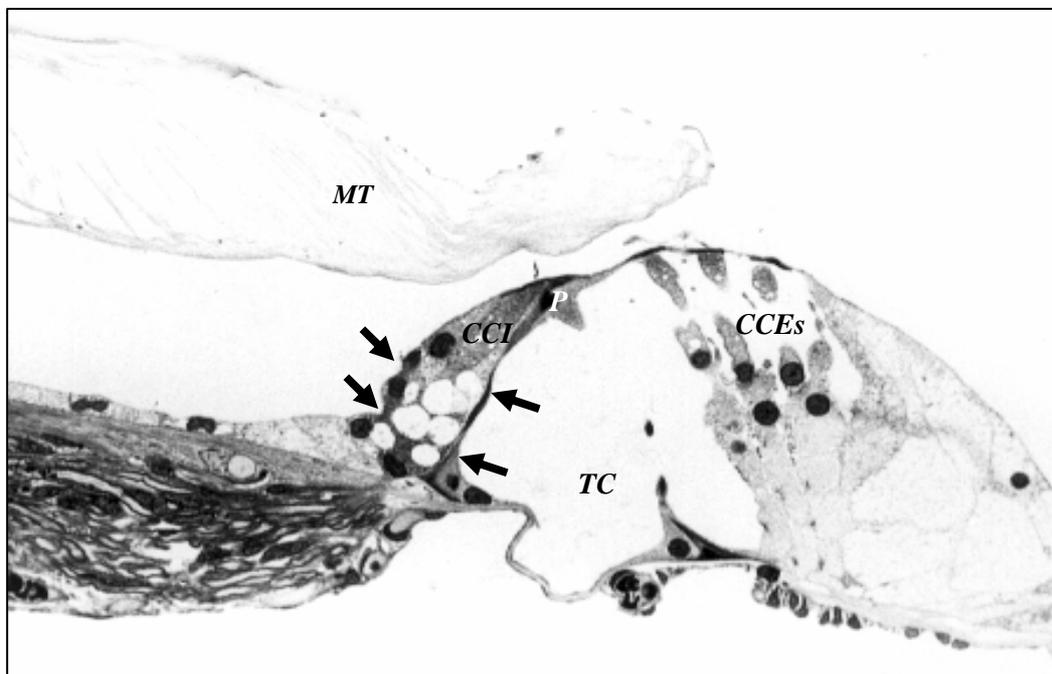
Los resultados electrofisiológicos obtenidos, de la latencia y de la amplitud de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto, tras el empleo de este agonista dopaminérgico, a dosis de **1 mg/Kg de peso del animal**, son comparados con los obtenidos en el grupo control P2 y con los obtenidos en el grupo del ácido kaínico; los valores medios obtenidos de la medición de las latencias y de las amplitudes, se localizan entre los valores del grupo control (P2) y los del grupo del tóxico, y al realizarse la comparación estadística mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA), se aprecia que **no existen diferencias significativas ( $p>0,05$ )**, en lo que a la latencia se refiere, entre la bromocriptina y el grupo control (P2) o entre la bromocriptina y el ácido kaínico. En los valores de la amplitud, tratados con el mismo test, se aprecia que tampoco existen diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre la bromocriptina y el grupo del tóxico, para intensidades bajas y medias (entre 30 y 70 dB) en todas las frecuencias, sin embargo para intensidades altas (80 y 90 dB) si se aprecian diferencias significativas ( $p<0,05$ ) con el uso de la bromocriptina. Al comparar la bromocriptina con los controles P2, si se encuentran diferencias significativas en la amplitud para todas las frecuencias y en todas las intensidades.

En el estudio morfológico se pone de manifiesto que las lesiones que aparecen al nivel de todo el polo basal de las células ciliadas internas (sobre todo edematización y vacuolización) son menores en las espiras basales y medias, siendo más intensa la vacuolización a nivel del ápex coclear (Fig. 12 y 13. Pag. 148). Las lesiones son muy similares a las que aparecen con el uso del ácido kaínico, lo que las hace difícilmente distinguibles desde el punto de vista microscópico y únicamente se diferenciarían en el resultado obtenido del estudio electrofisiológico (gráficos 3 y 4 de las páginas 144 y 145).

## BROMOCRIPTINA



**Figura 12:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira basal-media (x40), obtenido de aquellos animales en los que se ha realizado *perfusión intracoclear con ácido kaínico después de la administración intraperitoneal de bromocriptina*, donde se aprecia una intensa vacuolización bajo la célula ciliada interna. MT: membrana tectoria. P: célula de los pilares. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. TC: túnel de Corti.



**Figura 13:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira apical (x40), de aquellos animales en los que se ha realizado *perfusión intracoclear de ácido kaínico después de la administración intraperitoneal de bromocriptina*, apreciándose una intensa vacuolización bajo la célula ciliada interna. MT: membrana tectoria. P: célula de los pilares. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. TC: túnel de Corti.

### **Apomorfina.**

Las medias de los resultados electrofisiológicos de la latencia y de la amplitud obtenidos con el empleo de este agonista de la dopamina se muestran en los gráficos de las páginas 144 y 145; también se muestran los resultados morfológicos de microscopía óptica en las figuras 14 y 15 de la página 151.

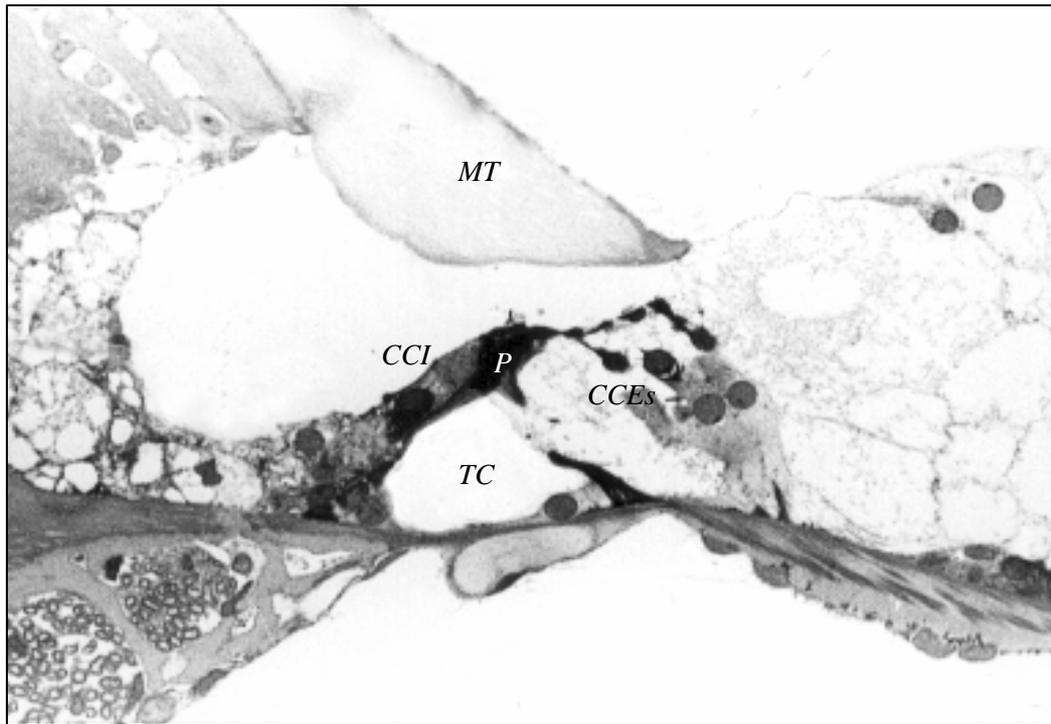
Los valores de la latencia del potencial de acción compuesto son muy similares a los que se obtienen con el empleo de la perilinfa (control P2), e incluso para las frecuencias de 12, 16, y 18 kHz, la latencia obtenida con el empleo de la apomorfina es menor que el obtenido con la perilinfa, como queda reflejado en las gráficas. Los valores de la amplitud de la onda  $N_1$ , en este experimento con apomorfina, se sitúan entre los valores de las medias obtenidos con el empleo de perilinfa (control P2) y los obtenidos con el empleo del tóxico (ácido kaínico).

Sometiendo estos resultados a un test de análisis de la varianza (ANOVA), se obtiene que, en lo que a la latencia se refiere, no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar los resultados obtenidos tras la segunda perfusión de perilinfa (control P2) y los obtenidos con el uso de apomorfina; sin embargo si **existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ )** entre los valores de las latencias obtenidos con el empleo de apomorfina y los obtenidos tras el empleo de ácido kaínico, para la mayoría de las intensidades en todas las frecuencias, salvo para la frecuencia de 18 kHz a bajas intensidades de estímulo sonoro (30, 40 y 50 dB).

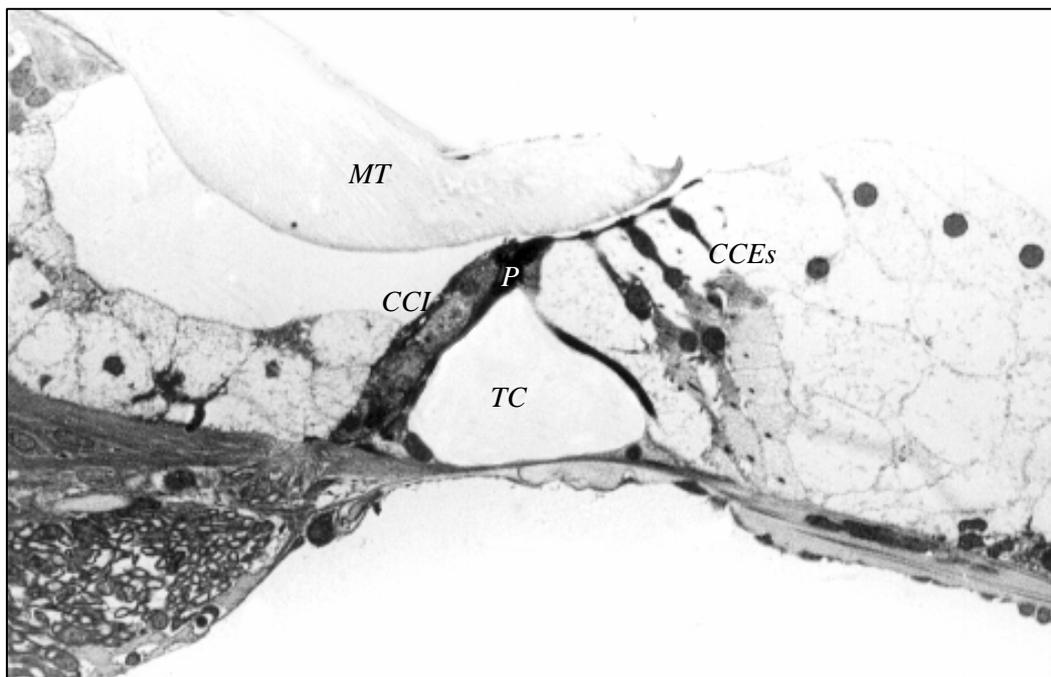
Para los resultados obtenidos de la medición de amplitud se ha utilizado el mismo test de análisis (ANOVA), resultando que tras la comparación de los resultados entre la perilinfa P2 y la apomorfina no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), mientras que en la comparación entre la apomorfina y el ácido kaínico, si se observan diferencias significativas para todas las intensidades en la mayoría de las frecuencias,

excepto a bajas intensidades, en la frecuencia de los 18 kHz.

Los resultados morfológicos obtenidos en este experimento se muestran en las figuras 14 y 15 de la página 151, observándose con microscopía óptica una menor o nula acumulación de vacuolas por debajo de las células ciliadas internas, siendo nula la acumulación de vacuolas a nivel del ápex coclear, dato objetivo que está en consonancia con los resultados electrofisiológicos obtenidos.

**APOMORFINA**

**Figura 14:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira basal (x40), obtenido de aquellos animales en los que se ha realizado **perfusión intracocular de ácido kaínico después de la administración intraperitoneal de apomorfina**, donde no se aprecia vacuolización bajo la célula ciliada interna. MT: membrana tectoria. P: célula de los pilares. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. TC: túnel de Corti.



**Figura 15:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira apical (x40), obtenido de aquellos animales en los que se ha realizado **perfusión intracocular de ácido kaínico después de la administración intraperitoneal de apomorfina**, apreciándose la ausencia de vacuolización bajo la célula ciliada interna. MT: membrana tectoria. P: célula de los pilares. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. TC: túnel de Corti.

**SKF 77434.**

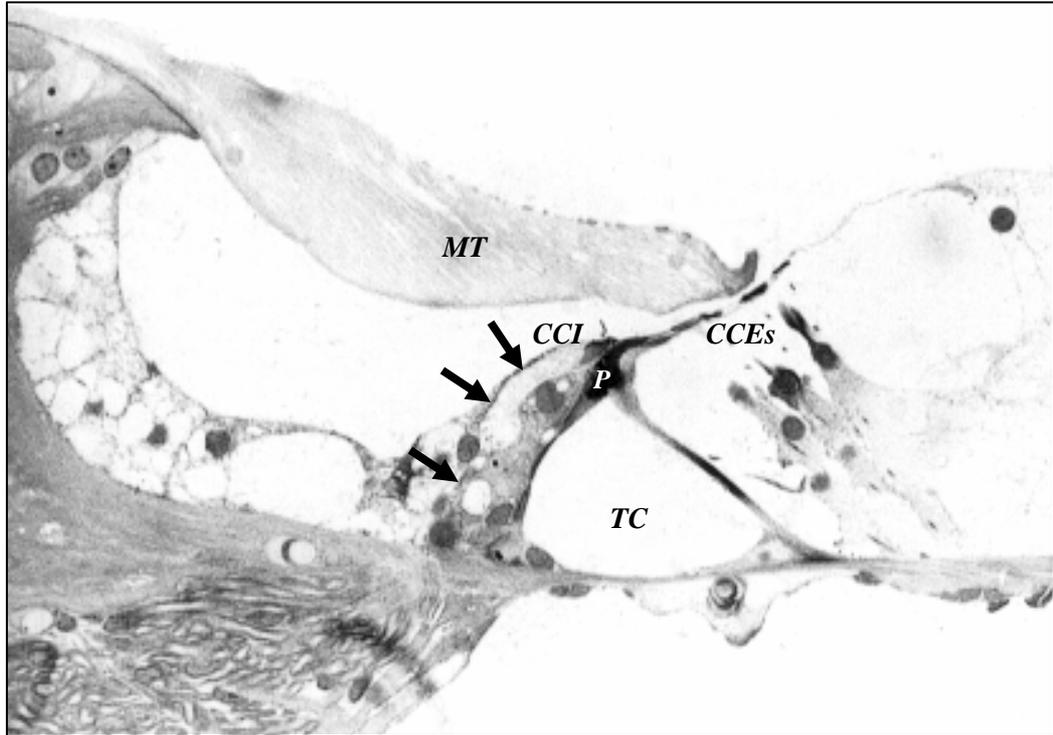
Con el uso de este agonista  $D_1$  de la dopamina, los resultados de la amplitud y la latencia de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto (PAC) de este experimento se sitúan entre los valores correspondientes de la perilinfa (control P2) y los valores correspondientes al experimento con el ácido kaínico, para todas las intensidades y en todas las frecuencias, como se aprecia en los gráficos 3 y 4 de las páginas 144 y 145.

Aplicando un test de análisis de la varianza (ANOVA) para el análisis de los resultados obtenidos en las latencias, se aprecia que **no existen diferencias significativas** ( $p > 0,05$ ) comparándolos con los resultados obtenidos en los experimentos con la perilinfa, tal y como se aprecia en los gráficos de la página 144; tampoco se aprecian diferencias significativas al compararlos con los resultados obtenidos tras el empleo del tóxico (ácido kaínico), como se muestra en las mismas gráficas anteriores.

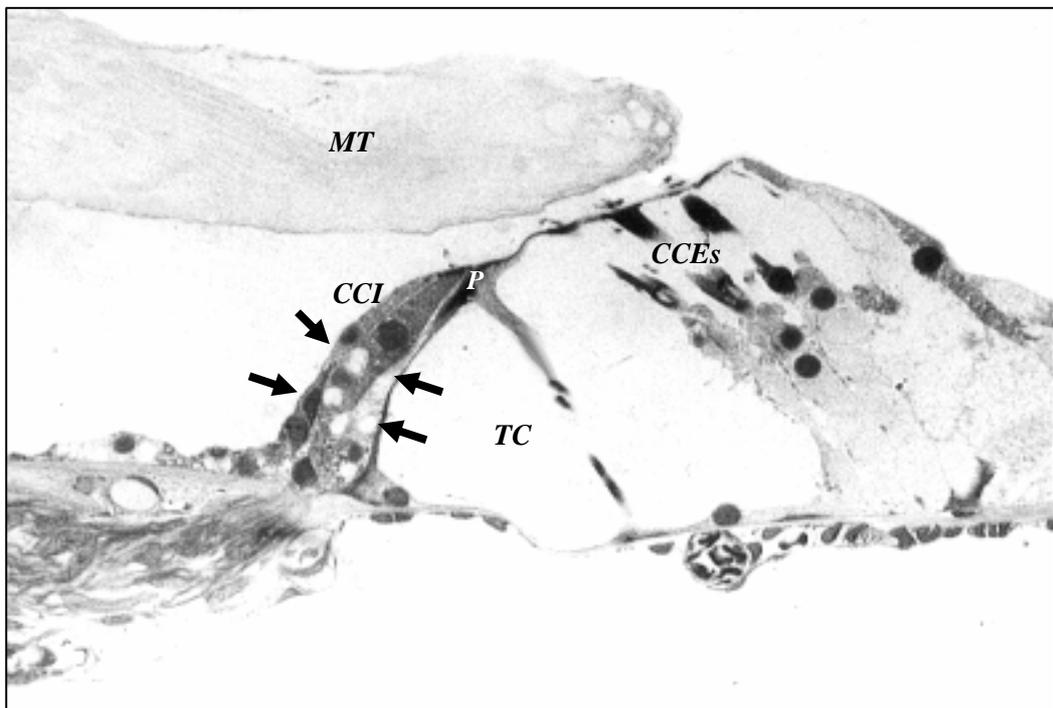
Aplicando el mismo test (ANOVA) para el análisis de los resultados de las medias de las amplitudes obtenidas en este experimento, se observa que los valores correspondientes al experimento con el SKF tienen una distribución que se localiza entre los valores obtenidos para la perilinfa P2 y los valores que se obtienen con el uso del ácido kaínico (Pag. 145); también se aprecia que existe un comportamiento diferente según se trate de la parte baja de la curva, correspondiente a las bajas intensidades de estimulación (30,40 y 50 dB), o a la parte alta de la curva, correspondiente a las altas intensidades (70,80 y 90 dB). En la parte baja de la curva, puesto que los valores del experimento con el SKF tienen un valor intermedio entre los valores de la perilinfa y del tóxico, no se aprecia diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el SKF y el ácido kaínico en ninguna de las frecuencias, tampoco se observan diferencias significativas en los resultados obtenidos al comparar el SKF y la segunda perfusión con la perilinfa (control

P2), sobre todo para las intensidades más bajas (30,40 y 50 dB) de todas las frecuencias. Para la parte de la curva correspondiente a las intensidades más altas (70, 80 y 90 dB), la comparación de los resultados obtenidos con el SKF y los obtenidos con la perilinfa y con el ácido kaínico ya muestran diferencias significativas para todas las frecuencias ( $p < 0,05$ ).

El examen morfológico de microscopía óptica muestra la existencia de un menor número de lesiones vacuoladas en las fibras situadas bajo las células ciliadas internas de los órganos de Corti correspondientes a las espiras más apicales, mientras que en las preparaciones correspondientes de las zonas próximas a la base coclear, el número de vacuolas es bastante más evidente, como puede comprobarse en las figuras 16 y 17 de la página 154.



**Figura 16:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel de la espira basal-media (x40), de aquellos animales en los que se ha realizado **perfusión intracocular de ácido kaínico**, después de la administración intraperitoneal de SKF, donde se observa la vacuolización bajo la célula ciliada interna. MT: membrana tectoria. P: célula de los pilares. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. TC: túnel de Corti.



**Figura 17:** Sección transversal de órgano de Corti a nivel del ápex (x40), en aquellos animales en los que se ha realizado **perfusión intracocular de ácido kaínico** después de la administración intraperitoneal de SKF, apreciándose una moderada vacuolización bajo la célula ciliada interna. MT: membrana tectoria. P: célula de los pilares. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. TC: túnel de Corti.

## RESULTADOS EN EL GRUPO DE LOS VEHICULOS.

En este grupo se hace una comparación múltiple de los resultados de la latencia y la amplitud de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto (PAC), obtenidos entre los animales en los que no se ha hecho ninguna perfusión (P0), con aquellos en los que se ha administrado intraperitonealmente el agonista de la dopamina o el vehículo de estos agonistas, y antes de realizar ninguna perfusión (Bromocriptina P0, Apomorfina P0, SKF P0, Dis/Apomorfina P0 y Dis/Bromocriptina P0).

Aplicando un test de análisis de la varianza (ANOVA) de un factor a los resultados obtenidos en este experimento, se observa que **no existe diferencia significativa** ( $p > 0,05$ ) en los resultados obtenidos para las medias de la latencia y de la amplitud, entre la perilinfa P0, los agonistas de la dopamina antes de las perfusiones (Bromocriptina P0, Apomorfina P0 y SKF P0), y los vehículos de los agonistas dopaminérgicos (Dis/Apomorfina P0 y Dis/Bromocriptina P0), para todas las frecuencias y para todas las intensidades.

Sin embargo, aunque no existan diferencias significativas, se aprecia que para bajas intensidades de estimulación (30, 40 y 50 dB), la latencia obtenida en el experimento de la perilinfa P0 es menor que las latencias obtenidas en los experimentos en los que se ha empleado bromocriptina (Bromocriptina P0), apomorfina (Apomorfina P0) y SKF (SKF P0); sin embargo, para altas intensidades de estimulación ocurre lo contrario, son menores las latencias obtenidas con la bromocriptina, la apomorfina y el SKF que con la perilinfa P0, como queda reflejado en los gráficos de las páginas 158, 159 y 160.

Al hacer el estudio comparativo en el caso de las medias de la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC) de la perilinfa P0 y de los agonistas de la dopamina (Bromocriptina P0, Apomorfina P0 y SKF P0), ocurre que a bajas

intensidades de estimulación (30, 40 y 50 dB) los valores medios son muy similares, siendo a intensidades de estimulación medias y altas (70, 80 y 90 dB), donde la diferencia es mayor, sin llegar a ser significativa, a favor de los agonistas de la dopamina (gráficos de las páginas 161, 162 y 163).

En el grupo de los vehículos únicamente se van a considerar los empleados para disolver la bromocriptina y la apomorfina, ya que en el caso del SKF 77434 se emplea como vehículo del principio activo el agua destilada. Al comparar, mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA), los valores de la latencia y la amplitud de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto (PAC) obtenido antes de hacer ninguna perfusión con perilinfa (P0), con los mismos parámetros obtenidos una vez administrados por vía intraperitoneal, y antes de realizar ninguna perfusión, bien el agonista de la dopamina (Bromocriptina P0, Apomorfina P0 o SKF P0), bien el correspondiente vehículo (Dis/Bromocriptina P0, Dis/Apomorfina P0), se observa que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en las frecuencias y para las intensidades exploradas, si exceptuamos la latencia de la perilinfa P0, la bromocriptina P0 y del vehículo de bromocriptina (Dis/Bromocriptina P0), en la frecuencias de los 12 y los 22 kHz a 90 dB ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de este experimento están expuestos en los gráficos de las páginas 158 a la 163, donde pueden verse que los valores de las medias en el grupo de los vehículos de los agonistas de la dopamina están muy próximos a los valores de las medias del grupo de los agonistas de la dopamina y del grupo de los animales sin perfundir (perilinfia P0).

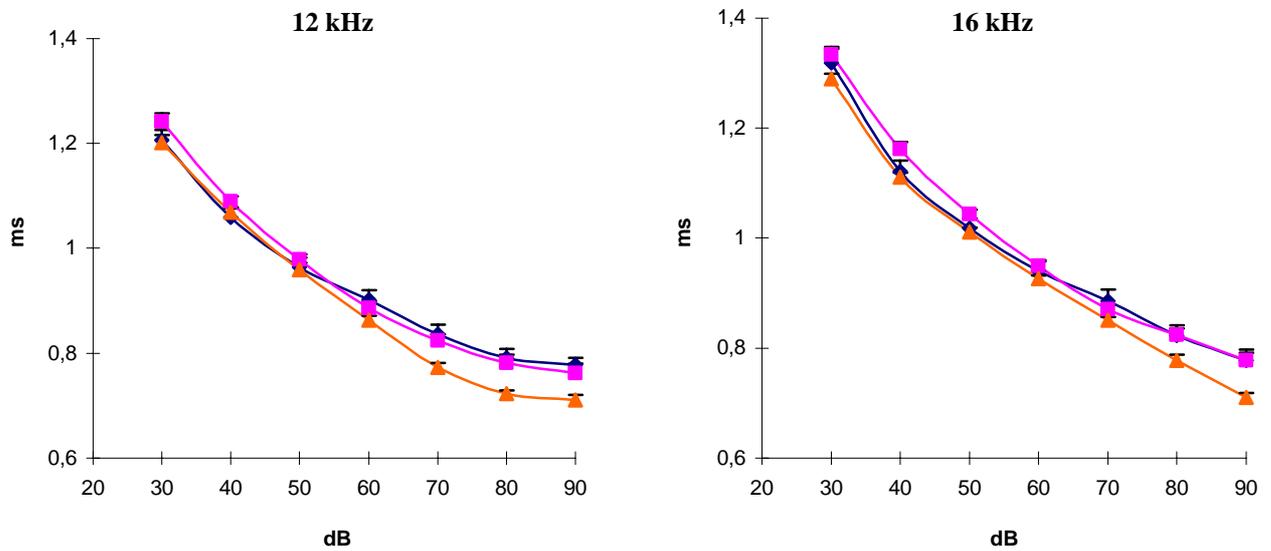
También se muestran diferentes cortes de microscopía óptica, en las figuras 18 y 19 de la página 164, de las preparaciones obtenidas tras la administración intraperitoneal de los vehículos de los agonistas dopaminérgicos, donde se aprecian

escasas lesiones en las fibras existentes bajo las células ciliadas internas.

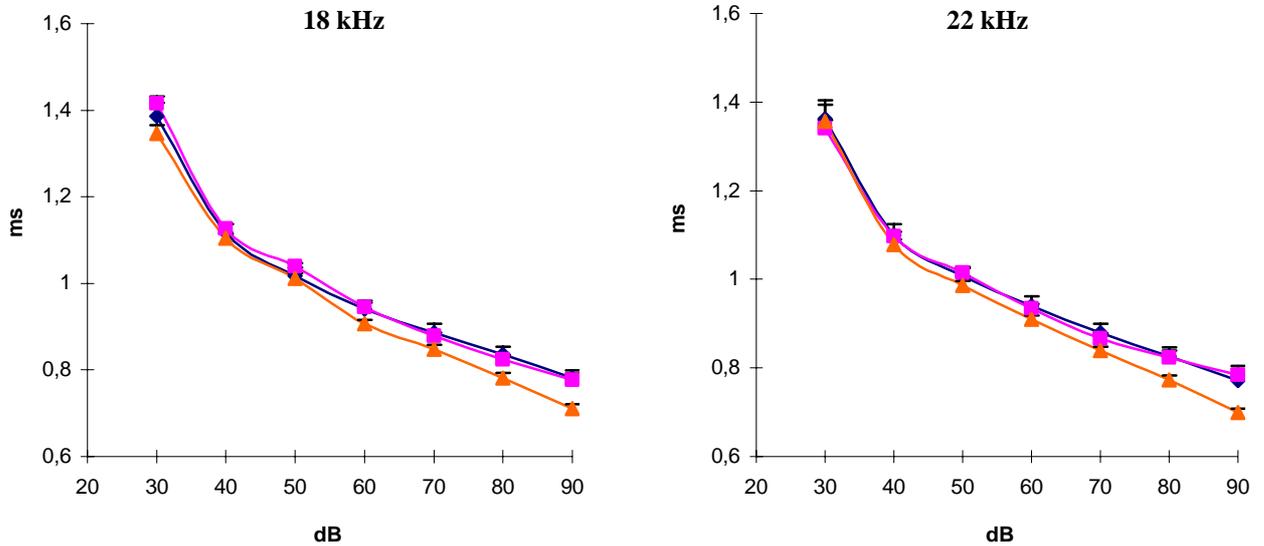
De este análisis estadístico se deduce que los vehículos de los agonistas dopaminérgicos no producen modificaciones en los registros de la latencia o de la amplitud de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto (PAC), ni en los estudios morfológicos de las cócleas obtenidas tras el uso de dichos vehículos. De aquí se desprende que todas las alteraciones electrococleográficas o morfológicas encontradas tras el uso de los agonistas de la dopamina se deben única y exclusivamente al empleo de los mismos y no al efecto de los vehículos empleados para disolver estos.

# VEHICULO DE BROMOCRIPTINA

## LATENCIA



## Perilínea P0. Bromocriptina P0. Dis/Bromocriptina.

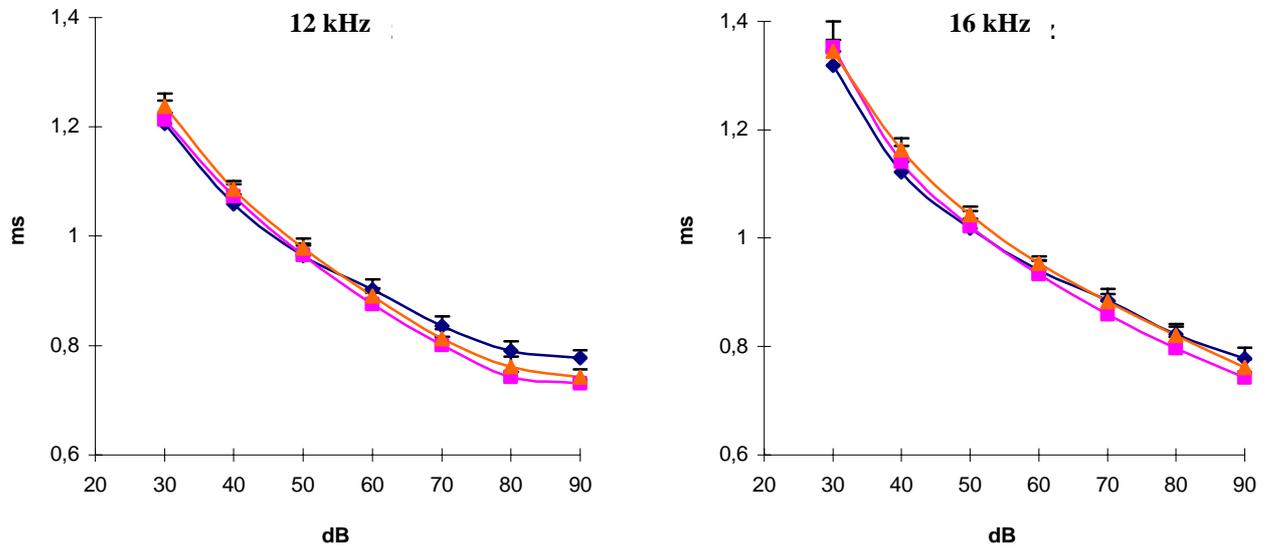


**Gráfico 5:** Latencias de la onda N1 del potencial de acción compuesto en el grupo de los disolventes de los agonistas dopaminérgicos.

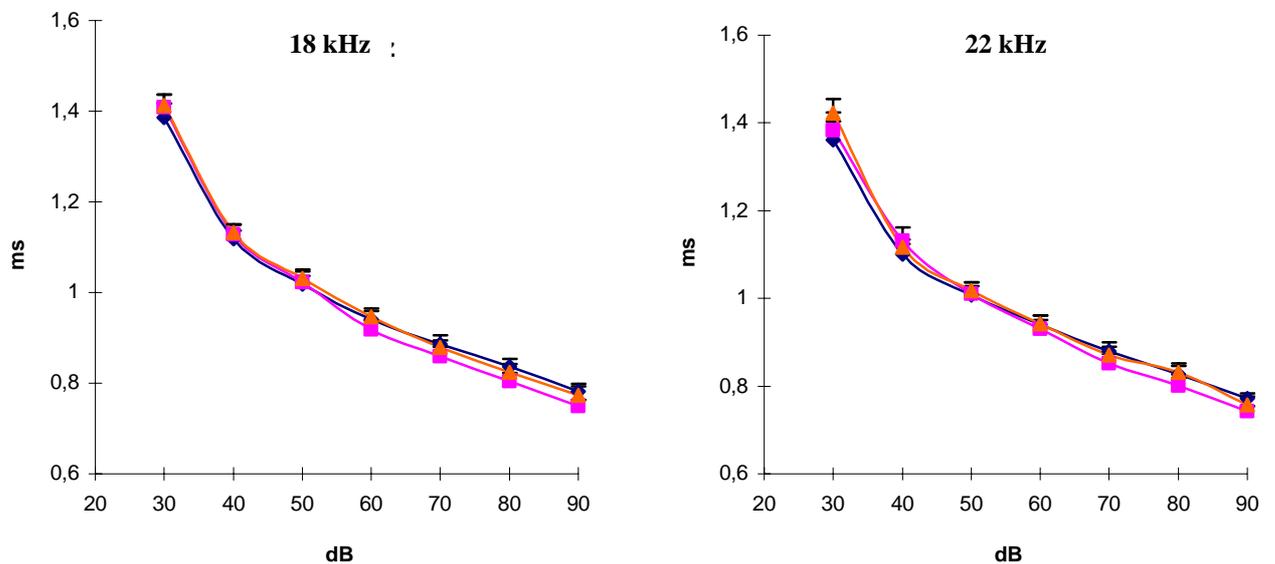
dB: decibelios. ms: milisegundos.

## VEHICULO DE APOMORFINA

### LATENCIA



### Perilinf. P0. Apomorfina P0. Dis/Apomorfina.

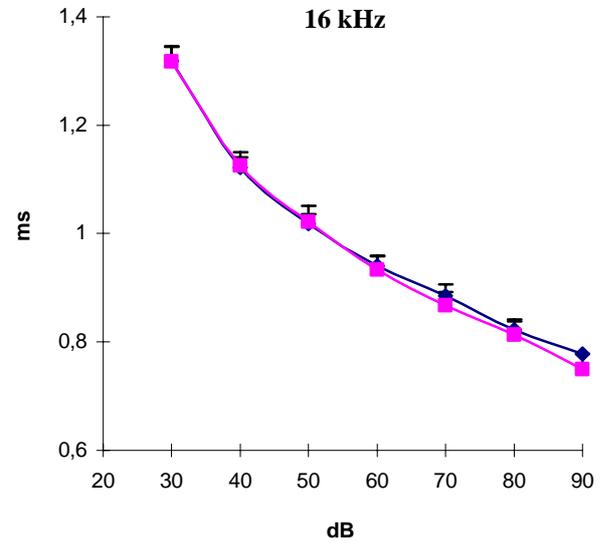
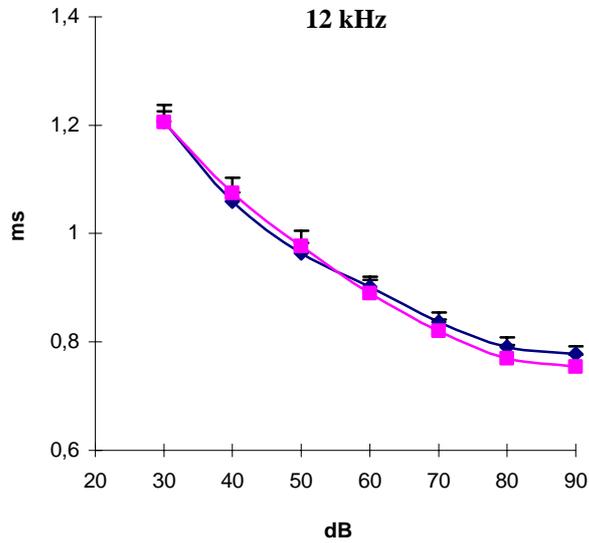


**Gráfico 6:** Latencias de la onda N1 del potencial de acción compuesto en el grupo de los disolventes de los agonistas dopaminérgicos.

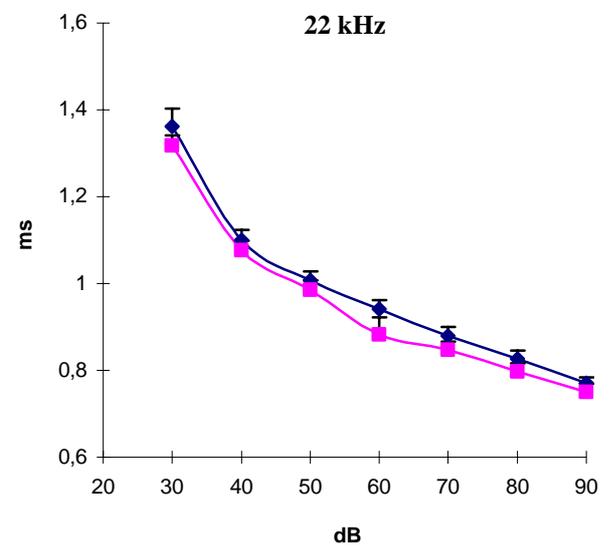
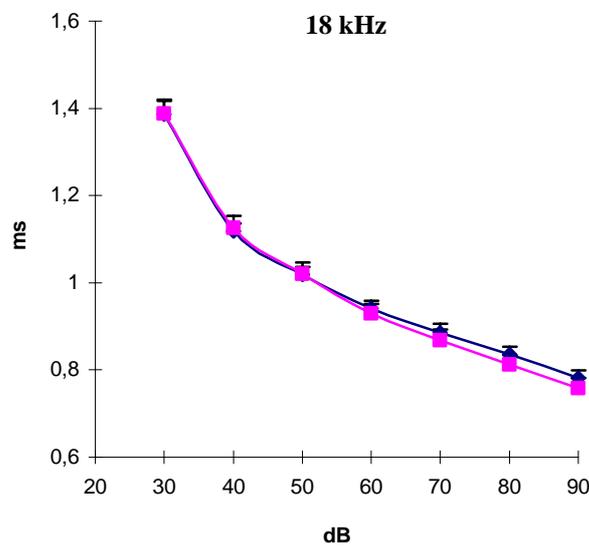
dB: decibelios. ms: milisegundos.

# VEHICULO DE SKF

## LATENCIA



## Perilífa P0. SKF P0.

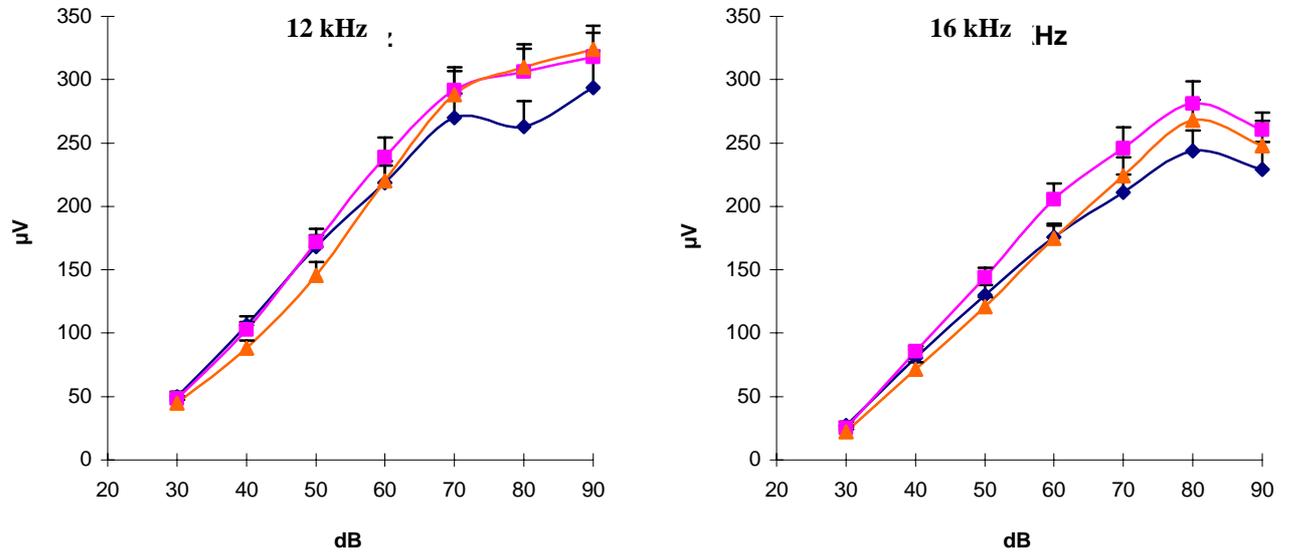


**Gráfico 7:** Latencias de la onda N1 del potencial de acción compuesto en el grupo de los disolventes de los agonistas dopaminérgicos.

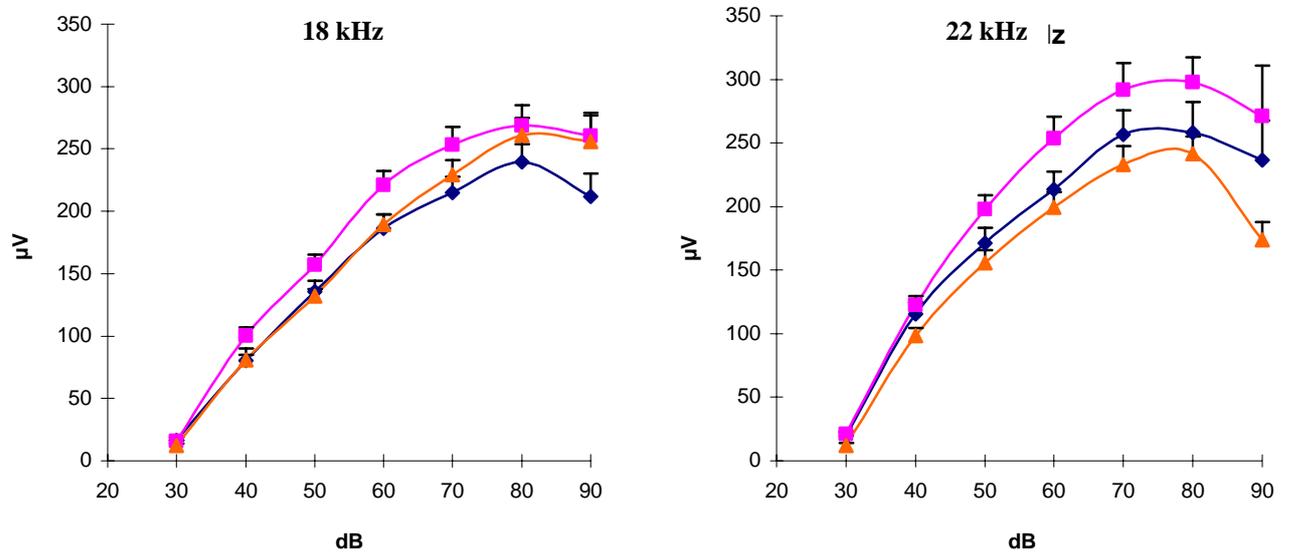
dB: decibelios. ms: milisegundos.

## VEHICULO DE BROMOCRIPTINA

### AMPLITUD



### Perilínea P0. Bromocriptina P0. Dis/Bromocriptina.

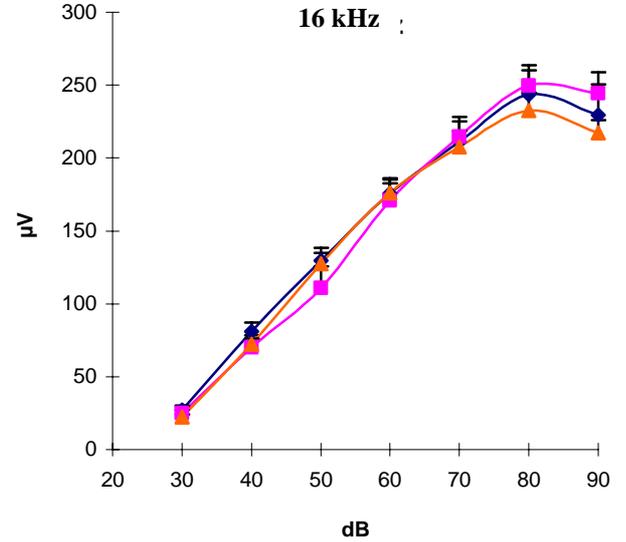
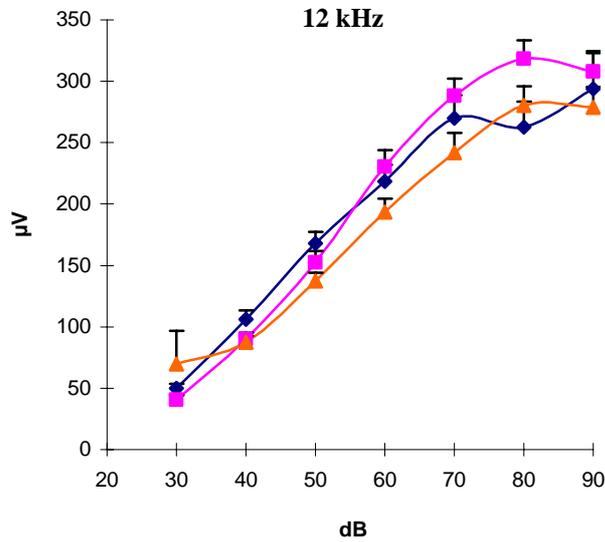


**Gráfico 8:** Amplitudes de la onda N1 del potencial de acción compuesto en el grupo de los disolventes de los agonistas dopaminérgicos.

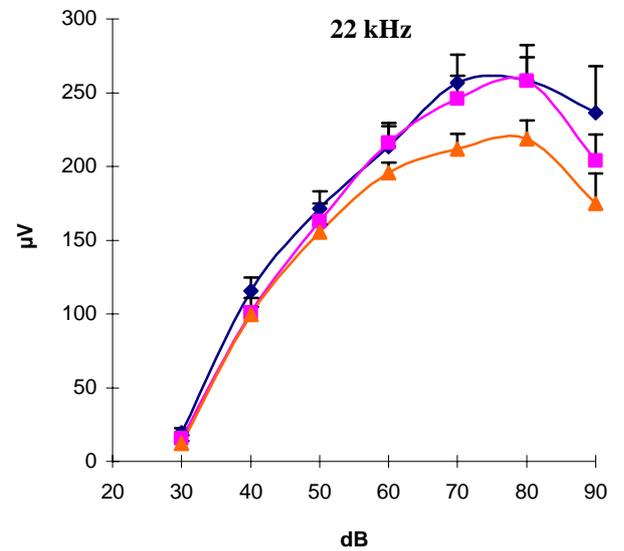
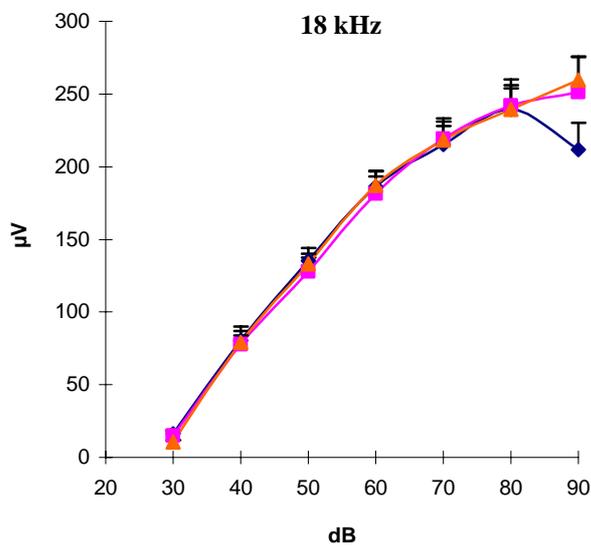
dB: decibelios. µV: microvoltios.

# VEHICULO DE APOMORFINA

## AMPLITUD



## Perilinfina P0. Apomorfina P0. Dis/Apomorfina.

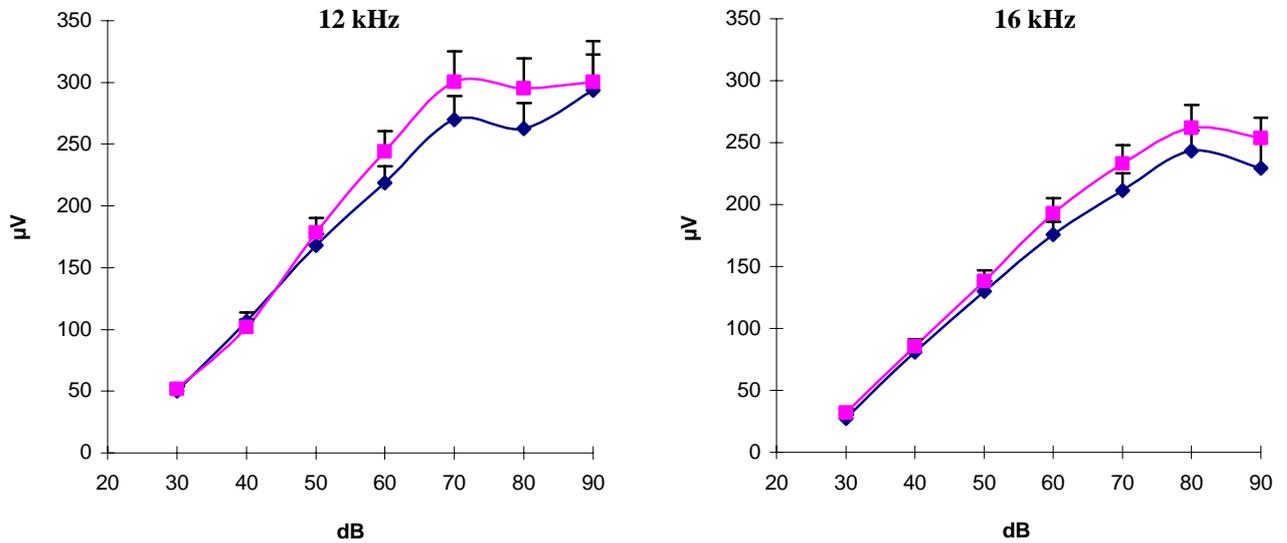


**Gráfico 9:** Amplitudes de la onda N1 del potencial de acción compuesto en el grupo de los disolventes de los agonistas dopaminérgicos.

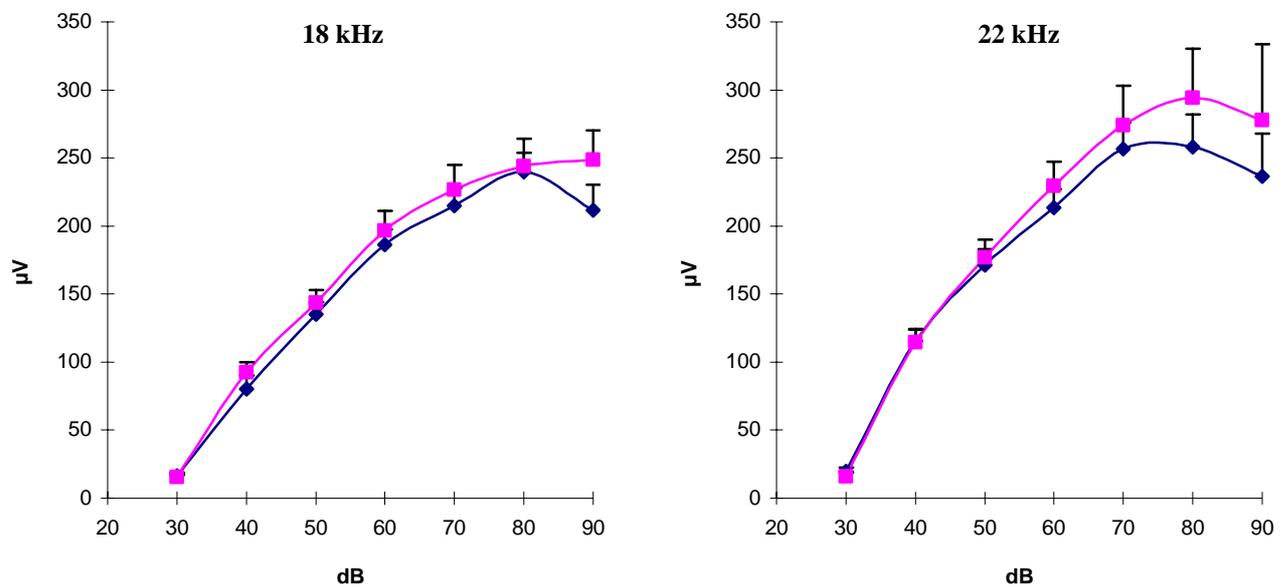
dB: decibelios.  $\mu$ V: microvoltios.

## VEHICULO DE SKF

### AMPLITUD

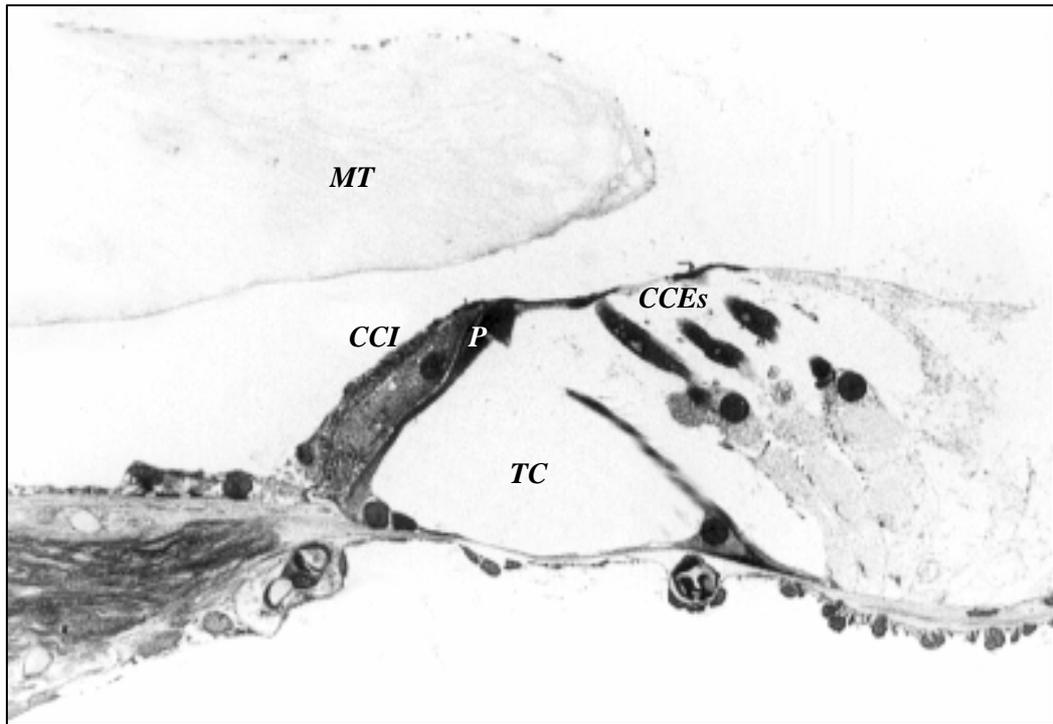


### Perilina P0. SKF P0.

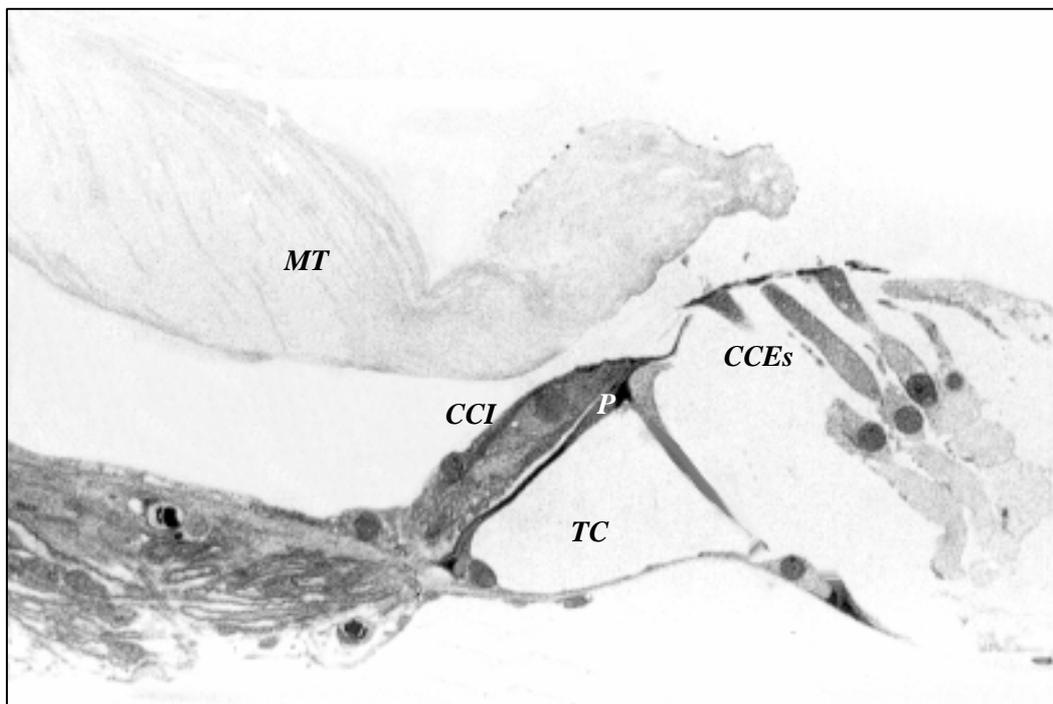


**Gráfico 10:** Amplitudes de la onda NI del potencial de acción compuesto en el grupo de los disolventes de los agonistas dopaminérgicos.

dB: decibelios. µV: microvoltios.



**Figura 18:** Corte transversal de un órgano de Corti (x40), espira apical, obtenido de un animal al que se ha inyectado intraperitonealmente el **vehículo en el que se ha disuelto la bromocriptina**. No se aprecia vacuolización bajo las células ciliadas internas. TC: túnel de Corti. MB: membrana basilar. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. P: célula de los pilares.



**Figura 19:** Corte transversal de un órgano de Corti (x40), espira apical, obtenido de un animal al que se ha inyectado intraperitonealmente el **vehículo en el que se ha disuelto la apomorfina**. No se aprecia vacuolización bajo las células ciliadas internas. TC: túnel de Corti. MB: membrana basilar. CCI: célula ciliada interna. CCEs: células ciliadas externas. P: célula de los pilares.

## **DISCUSSION**

## **MODELO EXPERIMENTAL DE SORDERA.**

En este estudio se ha elegido la rata como **animal de experimentación** con la finalidad de crear un modelo experimental por varias razones; en primer lugar por una cuestión de similitud, porque su cóclea tiene un número de espiras similar a la de los humanos, a diferencia de la cóclea de los cobayas u otros roedores, en los que el número de espiras es mayor; en segundo lugar por una cuestión técnica, porque el tamaño de la cóclea de la rata y de sus espiras permiten la manipulación y la realización de los agujeros necesarios para la perfusión coclear de perilinfa con ciertas garantías, esto no ocurre en el caso de roedores más pequeños (ratones), donde la cóclea tiene un reducido tamaño y la separación entre las diferentes espiras es tan escasa que no permite la realización de agujeros tan pequeños como para que se pueda realizar la perfusión perilinfática con garantías, con el material del que se dispone.

Existe una cuestión de disponibilidad y logística, puesto que se reproducen fácilmente y con un corto periodo de gestación, con un número de crías elevado por cada camada, y en el plazo de un mes ya se consideran adultos, aptos para poder ser empleados en experimentación.

También existen motivos económicos, ya que no requieren cuidados muy especializados en los animalarios donde se mantienen, después de haber sido adquiridas en los laboratorios proveedores oficiales de Francia o Estados Unidos.

Se ha preferido el uso de ratas pigmentadas Long Evans, ya que diversos estudios indican que hay una mayor frecuencia de malformaciones congénitas en el oído interno y de hipoacusias progresivas no congénitas en las ratas albinas Wistar (Bock y Steel, 1984).

El empleo de animales machos en lugar de hembras tiene que ver con la influencia que sobre los niveles de la dopamina tienen los estrógenos y la progesterona y los

efectos antidopaminérgicos de los estrógenos al reducir los efectos postsinápticos de la dopamina (Diamond, 1980; Palermo-Neto y cols., 1990).

### **Efectos derivados de la administración de neurotóxicos.**

Ya se ha señalado con anterioridad que el glutamato es el principal aminoácido neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (Curtis y Watkins, 1963), y aunque su presencia en la cóclea es aún motivo de controversia, se ha postulado como el principal neurotransmisor existente entre la célula ciliada interna y las fibras aferentes tipo I (Godfrey y cols., 1976; Bobbin y cols., 1978; Bobbin, 1979; Eybalin y cols., 1983; Altschuler y cols., 1989; Eybalin y cols., 1990 y 1991), aunque tampoco deberá olvidarse otro posible candidato en esta neurotransmisión, como es el aspartato (Fex y cols., 1982; Wenthold y cols., 1986). Se ha demostrado que ambos neurotransmisores pueden ser captados por las fibras eferentes del haz espiral interno y del haz espiral del túnel (Gulley y cols., 1979; Schwartz y cols., 1986), lo que ha sido interpretado como un mecanismo de protección frente a los efectos neurotóxicos producidos por el exceso de glutamato y aspartato a nivel de la hendidura sináptica (Altschuler y cols., 1989).

Aceptando la hipótesis del glutamato como principal neurotransmisor de la vía auditiva aferente, se ha empleado en diferentes ocasiones, en nuestro laboratorio, para la experimentación animal (Hernández-Ortiz, 1992; Carricondo, 1995). No obstante, la utilización de análogos del glutamato permite un estudio adecuado por su mayor capacidad neurotóxica. El glutamato sería aclarado de la hendidura sináptica por las células gliales (Eybalin y Pujol, 1983; Choi y Rothman, 1990; Eybalin, 1993) o sería captado por las fibras eferentes del haz espiral interno y del túnel de una manera muy eficaz (Gulley y cols., 1979; Schwartz y cols., 1986; Altschuler y cols., 1989), lo que obligaría al uso de dosis muy altas, del orden de 5 mM, para provocar lesiones en las fibras aferentes de la vía auditiva (Puel y cols., 1994).

Existen diferentes análogos del glutamato (Eybalin, 1993; Puel, 1995) como el ácido kaínico (Bledsoe y cols., 1981; Kusakari y cols., 1984), el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico (AMPA) (Puel y cols., 1991), el ácido domoico, el ácido iboténico, el ácido quisquálico (Jenison y cols., 1986), que son empleados a dosis 10 o 100 veces inferiores al glutamato, para conseguir iguales efectos. Todos ellos son considerados aminoácidos excitotóxicos (Olney, 1978; Choi y Rothman, 1990; Pujol y cols., 1993), ya que estimularían la sinapsis entre la célula ciliada interna y la fibra aferente tipo I, funcionando como aminoácidos excitadores rápidos (efecto despolarizador), y cuando se emplean a dosis elevadas producirían lesiones en las dendritas de las fibras aferentes (efecto neurotóxico), salvo el NMDA (N-metil-D-aspartato), que no llegaría a producir lesiones en la fibra aferente a pesar de emplearse a dosis muy altas (Puel y Pujol, 1992).

De estos agonistas glutamatérgicos, únicamente el ácido kaínico y el AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) serían capaces de suprimir el potencial de acción compuesto (Puel, 1993); el ácido kaínico lo suprimiría cuando es empleado a dosis mayores de 10 nM (Bledsoe y cols., 1981; Kusakari y cols., 1984).

Esta batería de productos, análogos del glutamato, nos permitiría la obtención de **modelos experimentales** adecuados para el estudio de ciertas patologías, en las que se ha constatado que las lesiones microscópicas halladas en el órgano de Corti son similares a las que se producen con el empleo de estos agonistas glutamatérgicos (Choi, 1990; Pujol y cols., 1993); por ello estos modelos experimentales nos servirían para el estudio de aquellas patologías (trauma acústico, sordera súbita, hipoxia/isquemia coclear aguda) y para el estudio de los factores que puedan influir en ellas y la manera de prevenirlas, tratarlas, evitar sus consecuencias y las complicaciones.

Los agonistas de glutamato más empleados en experimentación animal, mediante

perfusión perilinfática, son el **ácido kaínico** a unas dosis que varían entre 1 y 5 nM (Pujol y cols., 1985; Juiz y cols., 1989; Hernández-Ortiz, 1992; Eybalin, 1993; Hernández-Martínez, 1993; Carricondo, 1995; Jiménez-Ferreres, 1996; Gil-Loyzaga y cols., 1999-a), mientras que su EC<sub>50</sub> (50% de la concentración efectiva: concentración media de un agonista que produce la mitad del máximo efecto supresivo sobre el potencial de acción compuesto) es de 67 μM (Jenison y cols., 1986) y el **AMPA** (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) a dosis de 10 μM (Puel y cols., 1991 y 1994; Puel, 1995), mientras que su EC<sub>50</sub> es de 25 μM y la concentración a la que produce la supresión completa del potencial de acción compuesto es de 100 mM (Puel y cols., 1991; Eybalin, 1993).

En el presente estudio se ha empleado el ácido kaínico como neurotóxico, ya que existe mayor experiencia con su uso en nuestro laboratorio (Hernández-Ortiz, 1992; Hernández-Martínez, 1993; Carricondo, 1995; Jiménez-Ferreres, 1996; Gil-Loyzaga y cols., 1999-a), y además resultó más sencilla la obtención de las dosis a las que debía emplearse para provocar lesiones bajo las células ciliadas internas y modificaciones en los registros electrococcleográficos, mientras que con el uso del AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) no se obtuvo ninguna modificación en los registros electrococcleográficos del potencial de acción compuesto (PAC), a pesar de aumentar las dosis muy por encima de los valores que aparecen en la literatura y que se están empleando en otros laboratorios (Puel y cols., 1991 y 1994; Puel, 1995).

El uso de ácido kaínico en experimentación animal nos va a proporcionar una herramienta útil dentro de la investigación (Hernández-Ortiz, 1992; Hernández-Martínez, 1993; Carricondo, 1995; Jiménez-Ferreres, 1996; Gil-Loyzaga y cols., 1999-a), ya que con su empleo desarrollamos un modelo experimental de sordera, lo que nos permitirá el estudio y la experimentación con sustancias que puedan ser útiles para el

tratamiento de esta patología y puedan aplicarse posteriormente en la clínica; tal es el caso de las sorderas bruscas y también en las sorderas consecutivas a un trauma acústico, como procesos agudos, y para evitar en lo posible la presbiacusia, como proceso crónico, donde se ha comprobado que existe un descenso marcado en el número de neuronas tipo I del ganglio espiral (Spoendlin y Schrott, 1988), que podría estar relacionado con el daño excitotóxico de larga duración (Pujol y cols., 1991).

La vía empleada **para la administración del neurotóxico** es la perilinfática ya que, a pesar de tratarse de una técnica más compleja que la requerida para la vía intraperitoneal, con ello se consigue salvar el efecto de la barrera hematoencefálica, nos permite conocer y manejar con mayor exactitud la dosis a las que es tóxico el ácido kaínico, y se evitan los efectos adversos del ácido kaínico administrado por vía intraperitoneal (que van desde la sialorrea, los vómitos, las convulsiones, la agitación y hasta la muerte por sobredosis) al conseguir que la acción del tóxico se ejerza única y exclusivamente en la cóclea, y no en todo el sistema nervioso central, con lo que tendríamos no solo un modelo experimental de sordera sino también un modelo experimental de crisis convulsivas (epilepsia).

Para algunos autores esta vía plantearía algún inconveniente (Juiz y cols., 1988 y 1989), ya que no permitiría diferenciar en el estudio microscópico aquellas lesiones debidas a la acción del ácido kaínico, de aquellas debidas al posible efecto de la descompresión perilinfática que se produce cuando se labran los agujeros para la realización de la perfusión, de la manipulación y de la fijación, y que según estos autores (Juiz y cols., 1988 y 1989) suelen ser reversibles en unas horas o en pocos días. Sin embargo este inconveniente no es compartido, ni aceptado, por otros laboratorios dedicados a la investigación en oído interno (Hernández-Martínez, 1993; D'Aldin y cols., 1995; Gil-Loyzaga y cols., 1998-b), donde no se han descrito dichas alteraciones

tras la perfusión perilinfática sin ningún tóxico.

La aparición de lesiones morfológicas en las dendritas situadas bajo las células ciliadas internas es inmediata, tras el empleo del neurotóxico por vía perilinfática, ya que se registran lesiones a los 5 minutos de perfundido solamente 1 nM de ácido kaínico (Pujol y cols., 1985; Eybalin, 1993), por lo que se podría considerar este modelo experimental válido como ejemplo de cuadros que se acompañan de pérdida de audición brusca en la patología médica como son la sordera brusca, el cuadro de hipoxia/isquemia coclear brusca, el trauma acústico, etc...

Las primeras evidencias de las repercusiones del glutamato y del aspartato (agonistas de los receptores NMDA) sobre los registros electrofisiológicos, con disminución de la amplitud de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto (PAC) sin afectarse el potencial de sumación (PS) ni el potencial microfónico coclear (MC) (Littman y cols., 1989), demuestran que ambos neurotransmisores reproducen el efecto de la estimulación acústica, y por lo tanto imitarían la acción de los neurotransmisores endógenos, aumentando la descarga espontánea de las neuronas auditivas primarias (Bobbin, 1979; Comis y Leng, 1979). Esta reducción en la amplitud del PAC podría ser debida a que únicamente una pequeña cantidad de fibras del nervio auditivo están descargando sincrónicamente, posiblemente debido al efecto de las sustancias empleadas, que aumentarían las descargas espontáneas (y por lo tanto asincrónicas), o bien a que los neurotransmisores empleados han suprimido disparos aislados, por un proceso de depresión post-excitatoria (Bledsoe y cols., 1988). De cualquiera de las dos formas, por aumento de las descargas espontáneas asincrónicas o por una depresión post-excitatoria, quedan menos neuronas en el nervio auditivo para descargar sincrónicamente, por efecto del sonido (Puel, 1995).

Con el uso de agonistas de receptores no-NMDA, como son el ácido kaínico y el

AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico), se podría influir en los registros electrococleográficos no únicamente porque aumentarían las descargas espontáneas de las neuronas aferentes o por la depresión post-excitatoria, sino porque también producirían fenómenos neurotóxicos, con lesiones microscópicas de las terminales postsinápticas bajo las células ciliadas internas (Puel, 1995; Gil-Loyzaga y cols., 1999-a).

En cuanto al análisis de los resultados electrococleográficos, se ha tratado de identificar una determinada población neuronal del nervio coclear, con alguno de los parámetros medidos en el potencial de acción compuesto (PAC), y así se piensa que la **latencia de la onda N<sub>1</sub> del PAC** vendría determinada por el disparo de las fibras más sensibles al estímulo acústico (aquellas de menor umbral auditivo y de mayor frecuencia de descarga espontánea), mientras que **la amplitud** vendría determinada por el número de fibras de baja y alta frecuencia de descarga que se disparan sincrónicamente. La latencia conduce información sobre el inicio del estímulo, mientras que la amplitud nos da información sobre la intensidad del mismo, y por último, la información de la frecuencia del estímulo vendría dada por la disposición tonotópica de las neuronas en el nervio coclear, en la periferia las frecuencias agudas y en el centro las frecuencias graves (Liberman, 1982-b).

Por lo tanto, se podrían diferenciar dos poblaciones celulares de características funcionales y morfológicas distintas (Liberman, 1980-a y 1982-a; Liberman y Oliver, 1984); un grupo de fibras con baja y media frecuencia de descarga espontánea, que morfológicamente se caracterizarían por ser finas, con escaso número de mitocondrias y por localizarse en la región modiolar, bajo las células ciliadas internas; el otro grupo estaría compuesto por fibras con una alta frecuencia de descarga espontánea, serían de diámetro mayor, poseerían un mayor número de mitocondrias y tendrían una

disposición lateral bajo las células ciliadas internas, en la región de los pilares.

Dejando aparte los receptores metabotrópicos, que podrían tener una intervención escasa en la neurotransmisión, parece claro que existen dos tipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, los no-NMDA, del tipo del ácido kaínico y del tipo AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico) y los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). Los receptores no-NMDA podrían ser los primeros en activarse en la neurotransmisión a pequeñas y moderadas intensidades de estímulo (Puel y cols., 1991) y serían más abundantes en aquellas neuronas aferentes situadas en la región de los pilares, bajo las células ciliadas internas (CCI), que tienen media y alta frecuencia de descarga espontánea y un umbral más bajo para los estímulos auditivos (Lieberman, 1982-a y b); los receptores NMDA parecen activarse secundariamente, una vez que se han activado los receptores no-NMDA, y únicamente con sonidos de alta intensidad (Ehrenberger y Felix, 1991), y podrían ser más abundantes en aquellas neuronas situadas en la región modiolar bajo las células ciliadas internas, y que tienen una frecuencia de descarga espontánea más baja y un umbral más alto para los estímulos auditivos (Lieberman, 1982-a y b; Lieberman y Olivier, 1984).

#### **Modelo experimental de protección con agonistas de la dopamina.**

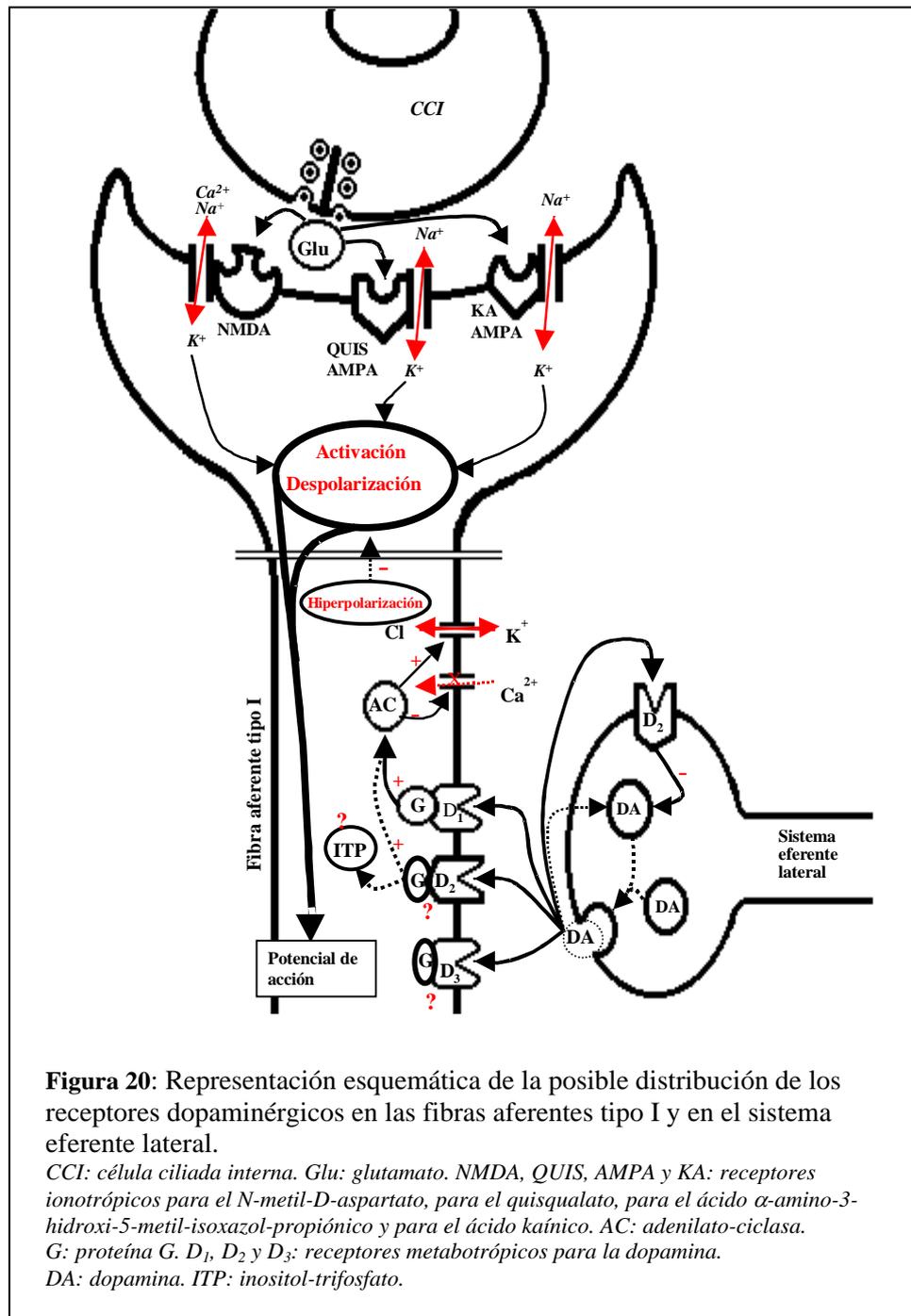
La dopamina se identificó inicialmente en la cóclea empleando técnicas de cromatografía líquida de alta presión (Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, 1986 y 1989), confirmándose posteriormente su presencia en el sistema eferente lateral (Eybalin y cols., 1993; Vicente-Torres y cols., 1993; Gil-Loyzaga, 1995). Se ha demostrado que los niveles de dopamina en la cóclea descienden en relación inversa al ruido, mientras que sus principales metabolitos, ácido homovanílico (HVA) y ácido dihidroxi-fenilacético (DOPAC), aumentan su concentración en relación directa con el estímulo auditivo (Gil-Loyzaga y cols., 1993). Desde los primeros estudios se ha sugerido que

esta catecolamina podría tener efectos protectores frente a la neurotoxicidad provocada por la excesiva liberación de ácido glutámico sobre la fibra aferente tipo I, como ocurriría en situaciones de ruido intenso (Gil-Loyzaga y cols., 1994-a) o en situaciones de hipoxia/isquemia (Pujol y cols., 1992-a; D'Aldin y cols., 1995).

Se ha demostrado que la edematización que se produce en los terminales dendríticos bajo las células ciliadas internas (CCI), en situaciones de ruido intenso y prolongado o en situaciones de isquemia coclear, es una consecuencia fisiopatológica motivada por la estimulación excesiva de los receptores glutamatérgicos de dichos terminales (Pujol, 1991; Pujol y cols., 1992-a y b; Puel y cols., 1994). Este hecho vendría a demostrar que al emplear previamente un antagonista de estos receptores glutamatérgicos, estas lesiones no se producirían (Pujol y cols., 1985; Pujol y cols., 1992-a). Al activarse los receptores glutamatérgicos no-NMDA se abrirían los canales iónicos, permitiendo el paso de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la neurona (Fig. 20. Pag. 175), arrastrando consigo agua (Rothman, 1985; Choi, 1987; Mayer y Westbrook, 1987); cuando la estimulación es excesiva o mantenida, la célula acabaría perdiendo la capacidad de manejo de estos iones y del agua (pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Choi, 1990; Lefebvre y cols., 1991), acumulándose ambos en gran cantidad en el interior de la neurona, provocando la edematización de la terminal dendrítica y la consiguiente degeneración neuronal (Pujol y cols., 1993).

La dopamina actuaría fundamentalmente sobre dos tipos de receptores metabotrópicos (Alonso-Solís, 1992), los  $\text{D}_1$  y los  $\text{D}_2$ , que tienen localizaciones diferentes en los dos extremos de las sinapsis (Fig. 20. Pag. 175). Los receptores  $\text{D}_1$  son **postsinápticos** y al unirse con la dopamina se produciría una activación de la adenilato-ciclase, a través de la proteína G, mientras que los receptores  $\text{D}_2$  tienen localización **presináptica** (autorreceptores) y postsináptica, y al activarse, tras la unión con la

dopamina, producirían una inhibición de la adenilato-ciclasa (Kabebian y Calne, 1979), una inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , con disminución de los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular (Todd y O'Malley, 1993), una activación de los canales de  $\text{K}^+$  y una disminución del recambio del inositol-trifosfato (Vallar y Meldolesi, 1989; Karadaghy y cols., 1997).



**Figura 20:** Representación esquemática de la posible distribución de los receptores dopaminérgicos en las fibras aferentes tipo I y en el sistema eferente lateral.

CCI: célula ciliada interna. Glu: glutamato. NMDA, QUIS, AMPA y KA: receptores ionotrópicos para el N-metil-D-aspartato, para el quisqualato, para el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-propiónico y para el ácido kaínico. AC: adenilato-ciclasa. G: proteína G.  $\text{D}_1$ ,  $\text{D}_2$  y  $\text{D}_3$ : receptores metabotrópicos para la dopamina. DA: dopamina. ITP: inositol-trifosfato.

Algunos trabajos de hibridación “*in situ*” han demostrado que el ARN<sub>m</sub> que codifica los receptores D<sub>2</sub>, se localiza en las neuronas del ganglio espiral, así como en las neuronas del haz olivococlear lateral (Safieddine y Eybalin, 1994); otro grupo de investigación ha descubierto en la cóclea de los ratones la existencia de un ARN<sub>m</sub> que codifica los receptores D<sub>3</sub> (Drescher y cols., 1994).

La experimentación animal con los agonistas de la dopamina permite sugerir que la función de esta catecolamina, identificada en la cóclea, sería la de inhibir o regular la transmisión entre la célula ciliada interna y las dendritas de las fibras aferentes tipo I (Puel y cols., 1992; Pujol y cols., 1992-a). En este sentido se han observado modificaciones en los registros electrococleográficos, que incluyen la reducción en la amplitud del potencial de acción compuesto (PAC) y el aumento en la latencia de la onda N<sub>1</sub>, únicamente para altas intensidades de estimulación (Puel y cols., 1992; d’Aldin y cols., 1995). La administración de dopamina no afecta al potencial microfónico coclear (MC) ni al potencial de sumación (PS), lo que indicaría que la acción de estos agonistas de la dopamina se llevaría a cabo en regiones postsinápticas, más allá de las células ciliadas (Pujol y cols., 1993). Esta acción sería muy evidente bajo las células ciliadas internas más próximas al modiollo, región que corresponde a las fibras aferentes de baja frecuencia de descarga espontánea (entre 0 y 18 descargas por segundo), con altos umbrales de estimulación (Lieberman, 1980; Lieberman y cols., 1990; Puel, 1995) y posiblemente con una mayor concentración de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Lieberman, 1982-a y b; Lieberman y Olivier, 1984).

También se ha demostrado que ciertos agonistas de la dopamina inyectados intraperitonealmente (piribedil) podrían modificar los niveles de la dopamina detectados en las cócleas sometidas al ruido, sugiriendo la existencia de algún tipo de control presináptico en su liberación por parte de las fibras eferentes (Gil-Loyzaga y cols.,

1992). Además la perfusión intracoclear de piribedil antes de someter a la cóclea a 10 minutos de isquemia, evita la edematización que se produce habitualmente en las dendritas de las fibras aferentes primarias (Puel y cols., 1994).

Recientemente, mediante el uso de técnicas de microiontoforesis junto con tratamientos con agonistas y antagonistas dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$ , se ha demostrado que la dopamina modularía la actividad de las fibras aferentes primarias de una manera inhibitoria, para evitar la sobreestimulación (“feed-back” negativo), y esta inhibición podría estar mediada no solamente por receptores dopaminérgicos  $D_2$  (D’Aldin y cols., 1995), sino también por receptores  $D_1$  (Oestreicher y cols., 1997).

En nuestro estudio, la administración de los agonistas de la dopamina se realizó por vía intraperitoneal al menos una hora antes de la perfusión perilinfática del tóxico; estos agonistas pertenecen a los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos que se sospecha que existen en la cóclea, de ahí que se haya empleado un agonista para los receptores  $D_1$  como es el SKF 77434 (O’Boyle y Waddington, 1987; Murray and Waddington, 1989; O’Boyle y cols., 1989; Bergman y cols., 1995), un agonista selectivo para receptores  $D_2$ , la bromocriptina (Hoffman y Cubeddu, 1984; Jackson y cols., 1989), y un agonista para ambos receptores  $D_1$  y  $D_2$  o agonista no selectivo, la apomorfina (Bergman y cols., 1995).

**La finalidad del presente estudio sería la de conocer, en primer lugar, los efectos que estos agonistas tienen sobre la cóclea y sobre la neurotransmisión, con las posibles repercusiones electrofisiológicas; en segundo lugar, los efectos que puedan tener sobre las fibras aferentes tipo I cuando estas se hallan sometidas al efecto del neurotóxico administrado localmente, y su papel, protector o no, sobre dichas fibras aferentes en situaciones de sobreestimulación.**

La administración intraperitoneal elegida para los agonistas de la dopamina es una

vía general de administración de principios activos, a diferencia de la vía perilinfática, local, elegida para el aminoácido excitotóxico. Aquella sería, por lo tanto, una vía más fisiológica para la administración de medicamentos, permitiéndonos conocer los efectos secundarios derivados del uso de la dopamina (taquicardia, irritabilidad, sialorrea, vómitos, piloerección, movimientos anormales de la boca, aumento o disminución de la actividad locomotora con movimientos estereotipados,...), que no se podrían conocer de haberse empleado una vía local para su administración.

Puesto que el efecto del aminoácido excitotóxico empleado por vía local se realiza de manera casi inmediata, la administración de los agonistas de la dopamina deberá realizarse una hora antes de la administración del ototóxico, para permitir su absorción de la cavidad peritoneal, su paso a la sangre y por esta hasta el sistema nervioso central y hasta la cóclea a través de las arterias cerebelosas anteroinferiores, y a través de las perilinfas hasta las dendritas de las neuronas aferentes tipo I y hasta las terminales sinápticas del sistema eferente lateral.

#### **Protección derivada de la administración de agonistas de la dopamina.**

Para el análisis de los resultados hemos empleado un test de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (latencia o amplitud), ya que solo existe una variable independiente, el tratamiento, para conseguir una variable dependiente (latencia o amplitud). Se ha preferido este test para el análisis de los resultados, en lugar de la “*t* de Student”, ya que al tener que comparar varios grupos (control P2, ácido kaínico, bromocriptina, apomorfina, SKF), el test de análisis de la varianza nos permite realizar comparaciones múltiples entre todos los grupos, en lugar de realizar múltiples comparaciones de dos en dos grupos, como ocurriría con el test de Student, aumentando el riesgo de cometer el error tipo I (aceptar la hipótesis nula  $H_0$ , todos los grupos son iguales, cuando no es verdad).

En primer lugar, se han comparado los resultados de tres experimentos diferentes para establecer nuestra hipótesis de trabajo; se comparan las medias de las amplitudes y de las latencias obtenidas de aquellos animales a los que no se les ha realizado perfusión con perilinfa (control P0), con las de aquellos en los que se han realizado una (control P1) o dos perfusiones de perilinfa (control P2). Se aprecia una diferencia estadísticamente significativa entre las amplitudes obtenidas de aquellos animales en los que no se había perfundido perilinfa, al compararlas con las obtenidas de aquellos otros a los que se les habían perfundido perilinfa en una o en dos ocasiones; con respecto a la latencia, los resultados no son tan claros, ya que las diferencias entre los valores de las medias son más escasas, y aunque no sean estadísticamente significativas, los valores de la latencia obtenidos sin perfundir perilinfa (control P0) son menores que los valores de las latencias obtenidas al perfundir perilinfa en una o en dos ocasiones (gráfico 1. Pag. 139 y gráfico 2. Pag. 140). Entre una o dos perfusiones de perilinfa, las diferencias de las medias de las amplitudes y de las latencias no son muy importantes y no resultan estadísticamente significativas.

Después de este análisis, se puede concluir que la manipulación de la cóclea va acompañada de alteraciones en los registros del potencial de acción compuesto, tanto en la latencia como en la amplitud, posiblemente debido o a la descompresión de las rampas vestibular y timpánica, o a pequeñas variaciones en la composición iónica de la perilinfa artificial, sin embargo estas alteraciones no se siguen produciendo en las sucesivas perfusiones, manteniéndose con escasas variaciones las medias de las latencias y las amplitudes en la primera y en la segunda perfusión con perilinfa artificial (controles P1 y P2).

La doble perfusión coclear con perilinfa tiene como finalidad la de asegurarse que con la primera perfusión no se ha lesionado la cóclea y el animal del experimento no se

ha quedado cofótico. Estos resultados nos permiten justificar el modelo experimental empleado y considerar a esta segunda perfusión con perilinfa artificial (control P2) como el verdadero control de todo el estudio y emplearlo para ulteriores comparaciones con el experimento del ototóxico y el de los agonistas de la dopamina; las posibles alteraciones que se puedan producir con las perfusiones perilinfáticas se van a producir de igual manera en el resto de los experimentos (en el del ácido kaínico y en el de los agonistas dopaminérgicos), consiguiendo con ello un diseño homogéneo para todo el estudio general.

También se han estudiado los efectos derivados del uso de los agonistas de la dopamina, mediante los registros electrococleográficos realizados antes de perfundir ninguna perilinfa y después de haber administrado intraperitonealmente los correspondientes agonistas (bromocriptina P0, apomorfina P0 y SKF P0) y se comparan con las medias de la latencia y de la amplitud del control P0 (antes de perfundir ninguna perilinfa y sin medicación intraperitoneal). En general las diferencias apreciadas no son estadísticamente significativas, aunque los resultados indican que, en lo que a la latencia se refiere, esta se acorta con el uso de todos los agonistas de la dopamina para altas intensidades del estímulo (por encima de 50 dB), mientras que está alargada para estímulos de baja intensidad (menores de 50 dB); la amplitud aumenta con el empleo de los agonistas dopaminérgicos tanto más cuanto mayor es la intensidad del sonido estimulante, aunque los resultados no sean estadísticamente significativos, tal y como se aprecia en los gráficos del 5 al 10 de las páginas 158 a la 163.

De este análisis se puede deducir que los agonistas de la dopamina, inyectados intraperitonealmente, no influyen, cuando la cóclea se halla en situación basal, en los registros electrococleográficos de la latencia y de la amplitud de la onda N<sub>1</sub> del potencial de acción compuesto (PAC), por lo menos significativamente, y a diferencia

de lo publicado por otros autores (Pujol y cols., 1993; D'Aldin y cols., 1995; Puel, 1995; Oestreicher y cols., 1997); motivo de otro análisis sería aquella situación en la que se realizara una perfusión coclear con un aminoácido excitotóxico.

En el estudio realizado con el **ácido kaínico** se comparan los resultados de las medias de las latencias y de las amplitudes obtenidas tras la perfusión, en dos ocasiones, con perilinfa artificial sin ningún otro producto (control P2), con los obtenidos tras la perfusión coclear en un primer lugar con perilinfa y en una segunda perfusión de perilinfa conteniendo ácido kaínico. Este experimento nos permitirá comparar los resultados obtenidos en nuestro control P2, con los resultados obtenidos con el ácido kaínico, con el fin de comprobar que el ácido kaínico es tóxico, en perfusión intracoclear, tal y como está diseñado para nuestro experimento.

En los resultados de los estudios de las latencias, las amplitudes y los umbrales, se han obtenido diferencias; en lo que respecta al umbral, se observa que está aumentado en el experimento con el ácido kaínico para dos frecuencias, 22 y 16 KHz, quedando en 40 dB, mientras que en el resto de las frecuencias está en 30 dB, siendo similar al umbral de los controles. En cuanto a la comparación de las medias de las latencias y de las amplitudes de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto (gráficos 3 y 4 de las páginas 144 y 145), y tras el análisis de los resultados, se aprecia que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el experimento con perilinfa (control P2) y el experimento con ácido kaínico, salvo para algunos valores aislados (16 y 18 KHz) y a bajas intensidades de estimulación acústica (30 o 40 dB), lo que viene a significar que electrofisiológicamente se encuentran diferencias entre el uso de perilinfa y el uso del ácido kaínico, que posteriormente fueron confirmadas con los resultados morfológicos de microscopía óptica (Fig. 8 y 9. Pag. 141 y Fig. 10 y 11. Pag. 146), donde se pueden comprobar las lesiones que se han producido (vacuolización de las terminales sinápticas

situadas bajo las células ciliadas internas); por lo tanto, también queda establecido el modelo de ototoxicidad experimental (modelo experimental de sordera) con el empleo del ácido kaínico.

Ya tenemos los experimentos que nos servirán de control, que se ha denominado control P2, también tenemos el modelo de toxicidad coclear que hemos obtenido con la perfusión intracoclear del ácido kaínico, ahora nos queda el análisis de los resultados obtenidos con el empleo de los diferentes agonistas de la dopamina y la comparación con los datos obtenidos de las dos hipótesis de partida, que son los animales controles normooyentes y los animales tratados con el ototóxico y que son hipoacúsicos.

Para el análisis de los resultados se ha procedido a comparar los datos obtenidos tras el uso de cada uno de los agonistas dopaminérgicos, con los obtenidos con los controles de perilinfa P2 y con los obtenidos tras el uso del ototóxico (ácido kaínico), y luego se ha hecho una comparación en conjunto para valorar con cuál de los agonistas dopaminérgicos se obtienen mejores resultados.

Con el empleo de la **bromocriptina**, un agonista  $D_2$  de la dopamina, se obtienen unos resultados en las latencias y en las amplitudes cuyas medias se encuentran en una situación intermedia entre los valores de las medias del control y del ototóxico (gráfico 3 de la página 144 y gráfico 4 de la página 145). Cuando se realiza un test de análisis de la varianza (ANOVA), tanto para los valores de la latencia como para los de la amplitud, se obtienen unos resultados que, en el caso de la latencia, no son significativos con respecto a los valores obtenidos para los controles P2, ni tampoco con respecto a los valores obtenidos en el caso del ototóxico, lo que viene a significar que los resultados aritméticamente se sitúan en una posición intermedia, no son como los resultados obtenidos en el caso de los controles, ni tampoco como en los casos en los que se usa ácido kaínico. En el caso de la amplitud, la no significación estadística es

mayor con el experimento del ototóxico, a bajas y medias intensidades de estimulación, que con el del control, lo que quiere decir que los resultados obtenidos con este agonista dopaminérgico se aproximan más a los del ácido kaínico que a los del control; en intensidades altas de estimulación (70, 80 y 90 dB) la significación estadística lo es con el experimento del ototóxico y con el del control, sin aproximarse sus valores más a uno que a otro.

Los resultados de microscopía óptica son variables, en algunas preparaciones se observan escasas lesiones, mientras que en otras se aprecia una vacuolización más intensa bajo las células ciliadas internas, sobre todo al nivel de las espiras medias y del ápex coclear (Fig. 12 y 13. Pag. 148).

Con el uso de la **apomorfina** los resultados estadísticos obtenidos son algo diferentes; el umbral es similar al umbral del experimento en el que se ha empleado la perilinfa (30 dB), diferenciándose de los casos en los que con el empleo del ácido kaínico el umbral se eleva a 40 dB. Los resultados de las medias de las latencias y de las amplitudes obtenidas tras el empleo de este agonista dopaminérgico  $D_1/D_2$ , están más próximas a los valores de las medias de los experimentos realizados con la perilinfa (controles P2) que a las medias obtenidas con el empleo del ácido kaínico (ototóxico), según se aprecia en los gráficos 3 y 4 de las páginas 144 y 145. Mediante el análisis de la varianza se ha obtenido que, comparando los resultados de las medias de las latencias y las amplitudes, no se encuentra diferencia estadísticamente significativa entre el experimento con la apomorfina y los resultados de los controles P2, a la vez que en algunas frecuencias (18, 16 y 12 KHz) los valores de la latencia son menores que en los casos controles. Al hacer la comparación entre los resultados obtenidos con el empleo de la apomorfina y el ácido kaínico, se observa que si **existe una diferencia que es estadísticamente significativa** tanto en la comparación de las latencias, como en la

comparación de las amplitudes, y sobre todo para altas intensidades de estimulación sonora.

El estudio de los órganos de Corti a diferentes niveles y en preparaciones de microscopía óptica, demuestra o bien la ausencia de lesiones o si estas aparecen suelen ser mínimas al compararlas con las observadas en el estudio con el ácido kaínico, estando localizadas al nivel de las espiras de la base (Fig. 14 y 15. Pag. 151).

**Estos resultados nos indican que se aprecian diferencias con el empleo de la apomorfina, siendo estadísticamente significativas, y que los resultados se aproximan más a los obtenidos en los casos controles, y a veces mejorando los registros de las latencias, que a los obtenidos con el empleo del ototóxico, lo que supone la confirmación electrofisiológica y morfológica de cierto papel protector para este agonista dopaminérgico D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>, frente a la neurotoxicidad inducida experimentalmente por el ácido kaínico.**

Cuando se emplea el **SKF 77434**, agonista dopaminérgico D<sub>1</sub>, y se analizan los resultados obtenidos de las medias de la latencia y de la amplitud de la onda N<sub>1</sub> del potencial de acción compuesto y se comparan con los obtenidos en el caso de los controles de perilinfa P2 y del ototóxico, se aprecia que los valores de las respectivas medias tienen una posición intermedia entre los mismos valores del control P2 y del ototóxico (gráfico 3 y 4 de las páginas 144 y 145). Al realizar el test de análisis de la varianza (ANOVA) se pone de manifiesto que, en lo que a la latencia se refiere, no existe diferencia significativa con respecto a los resultados obtenidos con el empleo del ácido kaínico, ni tampoco con respecto a los obtenidos en el caso de los controles de perilinfa P2. En el estudio de la amplitud, las diferencias tampoco son estadísticamente significativas cuando se emplean estímulos de baja o media intensidad (30, 40, 50 o 60 dB), mientras que a altas intensidades de estimulación los resultados son

estadísticamente significativos al compararlos con los resultados de los controles y del ácido kaínico, sin aproximarse más a unos que a otros.

**Estos datos vienen a señalar que aunque no exista significación estadística en los resultados, tras el análisis de la varianza, el empleo de este agonista dopaminérgico D<sub>1</sub> proporciona cierta protección, ya que los resultados de las medias de la latencia y la amplitud se sitúan entre los valores extremos de los controles P2 y del ácido kaínico, sin llegar al nivel de los controles, pero siendo claramente mejores que los resultados obtenidos con el empleo del ototóxico.**

En el estudio de microscopía óptica se aprecian lesiones bajo las células ciliadas internas de todas las espiras de la cóclea, siendo al nivel de la base y de las espiras medias donde la vacuolización de este espacio es más evidente. En las espiras del ápex coclear la vacuolización en algunas ocasiones no se aprecia con claridad, figuras 16 y 17 de la página 154.

Una vez que ya conocemos los efectos de diferentes agonistas dopaminérgicos en la prevención de la ototoxicidad provocada experimentalmente, ahora vamos a analizar el posible efecto de los **vehículos** empleados para disolver los principios activos, principalmente de aquellos agonistas dopaminérgicos que no se pueden disolver ni en agua destilada, ni en soluciones de cloruro sódico.

La bromocriptina se disuelve con dificultad en una solución de alcohol de 96° y de ácido tartárico al 0,2 %; se emplea 1 mg de bromocriptina disuelto en 1 ml de esta solución y se usa a una dosis de 1 mg/kg de peso, administrado por vía intraperitoneal. Hemos comparado los resultados obtenidos en el estudio electrofisiológico y en el estudio morfológico, apreciándose que no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias de las latencias y de las amplitudes obtenidas en el caso del control P0, en el caso de la bromocriptina antes de la perfusión perilinfática

(Bromocriptina P0) y en el caso de la administración intraperitoneal del vehículo de la bromocriptina -Dis/Bromocriptina P0- (gráfico 5 de la página 158 y gráfico 8 de la página 161).

Morfológicamente no existen diferencias entre los órganos de Corti obtenidos de los animales de experimentación a los que se les ha realizado la administración intraperitoneal del vehículo de la bromocriptina y los obtenidos de aquellos en los que no se ha perfundido todavía perilinfa -Perilinfina P0- (Fig. 18. Pag. 164).

Dado que ni electrofisiológicamente ni estructuralmente se producen repercusiones en los registros realizados o en el estudio microscópico tras el empleo del vehículo de la bromocriptina, se puede concluir que cualquier efecto detectado en la cóclea del animal de experimentación tras la administración de la bromocriptina por vía intraperitoneal se deberá a la propia bromocriptina y no al uso concomitante del vehículo de este principio activo.

En el caso de la apomorfina se ha procedido de igual manera que con la bromocriptina; para disolver 6 mg de este fármaco se emplea 1 ml de una solución de ClNa (0,9 %) y ácido ascórbico (0,1 %), y se usa a dosis de 6 mg/kg de peso. Se ha realizado un estudio morfológico de la cóclea y un estudio electrofisiológico tras la administración de 1 ml. de esta solución por vía intraperitoneal (Dis/Apomorfina P0) y se comparan con los resultados obtenidos tras la administración de apomorfina intraperitoneal y antes de perfundir ninguna perilinfa (Apomorfina P0) y con los obtenidos antes de perfundir ninguna perilinfa (Perilinfina P0). Tras el estudio estadístico mediante el test del análisis de la varianza (ANOVA), donde se comparan las medias de la latencia y de la amplitud, se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas y que los valores obtenidos tras el empleo del vehículo de apomorfina (Dis/Apomorfina P0), de la apomorfina (Apomorfina P0) o la perilinfa (Perilinfina P0),

tanto en lo referente a la latencia como a la amplitud, están muy próximos (gráfico 6 de la página 159 y gráfico 9 de la página 162). En el estudio morfológico no se aprecian diferencias en los órganos de Corti que se han comparado (Fig. 19. Pag. 163).

Por lo tanto, igual que en el caso de la bromocriptina, se puede concluir que cualquier efecto detectado electrofisiológicamente o morfológicamente en la cóclea, tras el empleo intraperitoneal de apomorfina, se deberá atribuir al empleo del principio activo y no al vehículo empleado para disolverlo.

En el caso del agonista dopaminérgico  $D_1$ , SKF 77434, no se ha hecho el mismo estudio ya que para su administración intraperitoneal se puede disolver fácilmente en agua destilada, considerándose que la cantidad y el vehículo empleados tienen nula repercusión en los registros, ya que al comparar los resultados electrofisiológicos obtenidos entre el control sin perilinfa (Perilinf P0) con los obtenidos tras la administración de SKF y sin perfundir perilinfa (SKF P0), se aprecia que no existen diferencias estadísticamente significativas, y que los valores obtenidos de las medias de la latencia y de la amplitud son muy similares (gráfico 7 de la página 160 y gráfico 10 de la página 163).

**Del análisis estadístico y del estudio morfológico y descartando un posible efecto de los vehículos de los agonistas dopaminérgicos, se puede concluir que todos los efectos derivados del empleo de las sustancias dopaminérgicas se deberán única y exclusivamente al uso de las mismas y no a los diferentes disolventes empleados para vehiculizarlas.**

**Una vez concluido el análisis de los resultados obtenidos con el empleo de los agonistas de la dopamina, se aprecia que con la utilización de la apomorfina se consiguen mejores respuestas que empleando aisladamente un agonista  $D_1$  o un agonista  $D_2$ , y además los resultados son estadísticamente significativos, a**

**diferencia de lo ocurrido con la bromocriptina o el SKF, donde se aprecian mejoras en los resultados electrofisiológicos e incluso morfológicos, pero estos no son significativos según el test de análisis de la varianza (ANOVA). De ello se puede deducir que el mayor efecto protector conseguido con el uso de los agonistas dopaminérgicos, frente a la ototoxicidad inducida experimentalmente, se lograría actuando conjuntamente sobre dos tipos de receptores dopaminérgicos, los D<sub>1</sub> y los D<sub>2</sub>.**

La localización de estos receptores está en discusión, habiendo autores que defienden que ambos tipos de receptores podrían tener localización postsináptica (Drescher y cols.,1994; Safieddine y Eybalin, 1994; D'Aldin y cols., 1995), consiguiéndose mayores efectos con la estimulación sinérgica de los mismos (Fig. 20. Pag.175). Al potenciar la actividad conjunta de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, mediante el empleo de los agonistas correspondientes, se lograría evitar las lesiones morfológicas y las alteraciones electrofisiológicas debidas a la sobreestimulación ocasionada con el empleo de altas concentraciones de un agonista sintético del glutamato (ácido kaínico), que generaría una cascada de alteraciones iónicas, que acabaría con la pérdida de la homeostasis del calcio y con la muerte celular. La sobreestimulación lograda con el empleo de altas dosis de ácido kaínico o con la liberación excesiva del neurotransmisor que se produce en situaciones patológicas (hipoxia-isquemia, trauma acústico, etc.), podría estimular la liberación de dopamina del sistema eferente lateral de manera dosis-dependiente (Gil-Loyzaga y cols., 1992 y 1993; Vicente-Torres y cols., 1993; Gil-Loyzaga y cols., 1994-a).

Las lesiones provocadas por los aminoácidos excitotóxicos se producirían al superarse la actividad de todo el sistema eferente lateral, ya sea por la falta de reservas suficientes de neurotransmisores, por falta de afinidad por los receptores ionotrópicos

correspondientes, o por la incapacidad de estos para ser activados o bien, si son activados, son incapaces de mantener a su través un flujo suficiente de  $\text{Cl}^-$  que hiperpolarice la célula, evitando con ello la despolarización neuronal y la génesis de un potencial de acción, logrando la homeostasis celular.

### **INTERES CLINICO-EXPERIMENTAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.**

Diversas patologías cocleares como la hipoxia-isquemia, el trauma acústico, la presbiacusia y la sordera brusca, parecen tener un mecanismo fisiopatológico común con las lesiones observadas tras la administración de aminoácidos excitotóxicos derivados del ácido glutámico (Puel y Pujol, 1993; Pujol y cols., 1993; Puel y cols., 1994, 1995 y 1997). El glutamato está considerado el neurotransmisor excitador más abundante en las sinapsis excitatorias rápidas del sistema nervioso central, y sus propiedades excitotóxicas son usadas con mucha frecuencia para explicar algunas de las lesiones cerebrales relacionadas con la hipoxia y con la isquemia, sobre todo aquellas que ocurren con la edad (Maragos y cols., 1987; Pujol y cols., 1991).

Ciertas patologías neurológicas parecen tener una fisiopatología común, con un origen excitotóxico, como es el caso de la hipoxia-isquemia cerebral aguda (Benveniste y cols., 1984; Meldrum, 1985), algunas crisis comiciales, la enfermedad de Alzheimer (Maragos y cols., 1987), donde se objetiva una elevación de los niveles del glutamato tras un periodo de isquemia. Las áreas más afectadas por la isquemia serían las que reciben un mayor número de aferencias mediadas por aminoácidos excitotóxicos, y las consecuencias patológicas se evitarían mediante la lesión de estas fibras.

Los procesos hipóxico-isquémicos producirían una elevación de los niveles del  $\text{K}^+$  extracelular que provocarían una despolarización y activación neuronal, que acabaría con la liberación del glutamato de las vesículas presinápticas, en cantidades elevadas

(Drejer y cols., 1985; Jenison y cols., 1985), lo que provocaría la despolarización de la fibra aferente tipo I, al actuar sobre receptores glutamatérgicos postsinápticos. Habitualmente el sistema eferente lateral, sistema inhibitorio, a través de sus neurotransmisores y neuromoduladores (dopamina, GABA, acetil-colina, CGRP, serotonina, encefalinas y dinorfinas), evitaría la lesión del sistema aferente al producir una hiperpolarización de la terminal postsináptica mediante la apertura de los canales iónicos para el  $Cl^-$  (Fig. 20. Pag. 175), permitiendo el paso de este ion al interior de la neurona, restableciéndose la homeostasis celular; a su vez, existiría un sistema de limpieza del exceso del neurotransmisor liberado a la hendidura sináptica, bien por recaptación a la célula presináptica, bien por metabolización enzimática en la hendidura sináptica, o bien por captación por las células gliales (Schousboe, 1981), con lo que se evitarían las estimulaciones excesivas de las células postsinápticas (Fig. 4. Pag. 79).

Durante las crisis comiciales, en los episodios de hipoxia-isquemia y en las hipoglucemias se produciría una disminución de la recaptación del glutamato liberado (Drejer y cols., 1985) y un aumento en su liberación (Kauppinen y cols., 1988), ya que al tratarse de un proceso activo precisaría de un aporte elevado de ATP, que se obtiene de la glicolisis, que es un proceso aerobio y por lo tanto precisa de un aporte adecuado de glucosa y de oxígeno para su producción.

El glutamato sería liberado de la reserva intraneuronal de neurotransmisor, localizado en las vesículas presinápticas, y no desde las células gliales, como lo demuestra el que la liberación de glutamato neuronal es Ca-dependiente, mientras que la liberación de glutamato desde los astrocitos es K-dependiente y Ca-independiente y no se modifica por la isquemia (Drejer y cols., 1985). En modelos experimentales de isquemia en secciones de hipocampo, la liberación de glutamato se hallaría completamente abolida al perfundir el modelo con medios sin  $Ca^{2+}$  y que contengan

$\text{Co}^{2+}$  (Benveniste y cols. 1984), o elevando la concentración de iones  $\text{Mg}^{2+}$ , que actuarían de modo semejante al  $\text{Co}^{2+}$ , disminuyendo la liberación sináptica del neurotransmisor (Schurr y Rigor, 1993). A su vez, el aumento de este aminoácido en el espacio extracelular provocaría la liberación de ácido araquidónico que también inhibe la recaptación de aquel.

La suma de todos estos factores produciría una despolarización prolongada de la terminal postsináptica, que tendría como consecuencia la apertura prolongada de los canales iónicos asociados a los receptores postsinápticos, induciendo un gran influjo de cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) y una entrada pasiva de  $\text{Cl}^-$ . La modificación del flujo de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana hace desaparecer el equilibrio osmótico celular, y el resultado final de este proceso sería la entrada masiva de agua, con el consiguiente edema de dendritas y soma neuronal (Rothman, 1985; Olney y cols., 1986; Mayer y Westbrook, 1987; Choi, 1987 y 1988; Hernández-Ortiz, 1992).

Parece probable que la neurotoxicidad aguda (edematización de la terminal postsináptica) debida a los aminoácidos excitotóxicos análogos del glutamato sea dependiente del  $\text{Cl}^-$ , mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  sería el responsable de una neurotoxicidad de desarrollo más lento (pérdida de las neuronas del ganglio espiral), probablemente debido a una entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales NMDA (Rothman y Olney, 1987). Se ha postulado también la posibilidad de que descargas sincrónicas en los canales NMDA provocadas por pequeñas disminuciones de la eficacia del sistema inhibitor puedan ocasionar la muerte celular (Luhmann y Prince, 1990).

Diversos estudios morfológicos realizados con microscopía óptica y electrónica permiten observar los cambios degenerativos producidos por los fenómenos hipóxico-isquémicos agudos, consistentes en edema dendrítico, rotura de las membranas celulares, degeneración edematosa aguda de los cuerpos celulares neuronales y cambios

picnóticos nucleares (Puel, 1995). Estas lesiones son indistinguibles de las generadas por los procesos degenerativos producidos por la administración exógena de glutamato o alguno de sus agonistas, el ácido kaínico o el AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico), ya sea durante el desarrollo (Ikomidou y cols., 1989; Janssen y cols., 1991; Janssen, 1992), o en el adulto (Pujol y cols., 1985; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Puel y cols., 1991), lo cual favorece la hipótesis de que estos efectos degenerativos serían debidos a la liberación masiva de glutamato en dichas sinapsis (Faden y cols., 1989).

Por último, la administración de MK-801, un antagonista específico de los receptores NMDA (Fig. 5. Pág. 81), protegería de la neurotoxicidad inducida por la administración exógena de NMDA y de la degeneración neuronal demostrada en un modelo hipobárico/isquémico (Gill y cols., 1987; Kochhar y cols., 1988; Olney y cols., 1989). También se plantea la hipótesis de que los efectos neuroprotectores de la hipotermia, bien documentados en condiciones experimentales (Bertman y cols.; 1981), sean debidos a los mecanismos celulares que implican disminución de la excitabilidad neuronal y disminución de la liberación de glutamato (Busto y cols., 1989; Duhaime y Ross, 1990).

El daño coclear producido por la hipoxia-isquemia y el traumatismo acústico agudo presentan características comunes. En ambas situaciones se observan algunas alteraciones similares, que podrían implicar la intervención de un proceso patogénico común, de hecho se ha propuesto que la exposición excesiva a ruidos produciría hipoxia-isquemia coclear (Misrahy y cols., 1958; Hawkins, 1971). La exposición durante un periodo superior a 30-60 minutos a sonidos de intensidades por encima de 110 dB produciría una disminución significativa del flujo coclear (Okamoto y cols., 1990; Scheibe y cols., 1990) y de la presión parcial de oxígeno en los fluidos del oído

interno, y en particular de la endolinfa (Scheibe y cols. 1990), sin modificar la presión arterial en otros territorios del organismo (Okamoto y cols., 1990; Scheibe y cols., 1990). No existiría sin embargo una correlación significativa entre la disminución del flujo sanguíneo coclear, la presión parcial de oxígeno endolinfática y la extensión del daño morfológico y funcional encontrado (Thorne y Nuttall, 1987).

Diferentes experimentos realizados en ratones (Saunders y Hirsch, 1976), ratas, (Lenoir y cols., 1979), hamsters (Bock y Saunders, 1977) y gatos (Price, 1976) demuestran la susceptibilidad de la cóclea, de cada uno de estos mamíferos, a los estímulos auditivos mantenidos durante cierto tiempo, sobre todo en épocas precoces del desarrollo de la función auditiva, considerando que existe un “periodo crítico” donde las lesiones cocleares podrían ser más importantes. Los estudios morfológicos de estas cócleas demuestran la pérdida de un 80% de las células ciliadas externas en la espira basal (región de las altas frecuencias), y también degeneración de las células ciliadas internas y de las fibras nerviosas (Lenoir y Pujol, 1980). Sin embargo en los animales adultos la pérdida de la función auditiva o sería menos importante o únicamente sería temporal (Henley y Rybak, 1995).

El primer cambio morfológico que aparecería en la cóclea después de veinte minutos de isquemia o tras el mismo tiempo sometida a un ruido intenso, consistiría en una dilatación de las terminales postsinápticas que se encuentran bajo las células ciliadas internas, con una balonización de las mitocondrias existentes en las neuronas del ganglio espiral (Nadol y Burgess, 1985; Puel, 1995). Sin embargo, estas lesiones serían reversibles si cede el estímulo que las ha provocado, y además serían similares a las causadas de manera inmediata con el empleo de aminoácidos excitotóxicos, el glutamato monosódico, el kainato o el ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA). A los diez días de la aplicación de la noxa se producirían lesiones

en un porcentaje próximo al 33% de las células del ganglio espiral (Juiz y cols., 1988 y 1989; Pujol y cols., 1991).

Todo esto sugiere que debe existir alguna relación entre el proceso degenerativo neuronal del ganglio espiral que ocurre en situaciones de hipoxia/isquemia y en el trauma acústico, con la liberación de glutamato a la hendidura sináptica desde la célula ciliada interna (Eybalin y Pujol, 1989; Eybalin, 1993).

También la liberación inadecuada de glutamato podría estar relacionada con la pérdida neuronal que se produce en la presbiacusia (Pujol y cols., 1991). De los cuatro tipos patológicos de presbiacusia existentes, y que dependen de la localización de la lesión, sensorial, neural, estrial o coclear conductiva, el primero es el que se encuentra con mayor frecuencia, tanto de manera aislada o en asociación con el resto de lesiones. Existiría una pérdida de células sensoriales, células ciliadas internas y externas, que afectaría predominantemente a la región de la base coclear y, por lo tanto, estaría en relación con la pérdida de audición para las frecuencias agudas.

La atrofia de los vasos espirales afectaría predominantemente y de forma más intensa al área basal coclear, por lo que las células de esta área serían las más expuestas a la afectación hipóxica. De hecho, en la presbiacusia, se observa la pérdida de células ciliadas internas con una distribución preferentemente basal que se correlaciona estrechamente con la distribución de las lesiones glanglionares en cobayas y en ratas (Pujol y cols. 1991), o en humanos (Bredberg 1968).

El área afectada por este tipo de lesión raramente iría más allá del área basal (Bredberg 1968), sin embargo en cócleas humanas se observan lesiones en la región correspondiente, tonotópicamente, a la frecuencia de 4 kHz., que serían atribuibles a traumatismos sonoros; esta lesión podría extenderse hacia la región basal, para fundirse con las alteraciones patológicas de la presbiacusia sensorial, no pudiéndose determinar

la diferencia o frontera entre una y otra. De hecho la etiología de las diferentes formas de presbiacusia es desconocida, siendo importante determinar si la presbiacusia es una consecuencia normal de la edad o el resultado de la exposición durante toda la vida a microtraumas sonoros, a fatiga auditiva, o a una variedad de eventos ototraumáticos (Nadol 1980).

La comparación entre cócleas humanas y las de modelos experimentales de presbiacusia, con animales mantenidos en ambientes exentos de contaminación acústica, demuestra que el daño encontrado en humanos sería la suma de los efectos de la edad y de la exposición a traumatismos sonoros, no pudiendo distinguirse morfológicamente unos de otros, ni tampoco de los ocasionados por la hipoxia-isquemia por atrofia de los vasos espirales o de los modelos neurotóxicos, y en particular de los creados con aminoácidos excitotóxicos.

Se postula que las alteraciones anóxicas o sonoras locales, al afectar a la célula glutamatérgica, desencadenarían la cascada de eventos neurotóxicos que concluirían con la muerte celular (Pujol y cols., 1991). Estos eventos podrían ser la producción de radicales libres, ya que se ha demostrado que la liberación de estas moléculas producirían un aumento de la liberación de aminoácidos excitotóxicos (Pellegrini-Giampietro y cols., 1990).

Numerosos estudios demuestran la similitud existente entre los daños producidos en modelos creados con neurotóxicos y los presentes en fenómenos hipóxico-isquémicos (Pujol y cols., 1991, 1992-a y 1993; Puel y Pujol, 1992; Puel y cols., 1994), en los traumatismos sonoros (Pujol y cols., 1991), y en las lesiones cocleares generadas en la presbiacusia sensorial, a nivel de las células ciliadas internas (Bredberg, 1968; Coleman, 1976; Keithley y Feldman, 1982; Schuknecht, 1989; Bohne y cols., 1990; Pujol y cols., 1991; Schuknecht y Gaceck, 1993). Esta similitud se vería apoyada por la

protección frente el daño isquémico llevada a cabo por antagonistas de los receptores glutamatérgicos (Puel y Pujol, 1992; Pujol y cols., 1993; Puel y cols., 1994); con respecto a esta protección, se llega a la conclusión de que la lesión producida por la isquemia sería bloqueada casi totalmente por la administración de un antagonista de los receptores no-NMDA, la DNQX (6-7-dinitroquinoxalino-2, 3-diona), no obstante esta protección no sería total al seguir apareciendo fibras lesionadas en la zona modiolar, bajo las células ciliadas internas; con la administración de AP-5 (2-amino-5-fosfopentanoato), un antagonista de los receptores NMDA, no se conseguía protección ninguna, pero al ser administrados ambos antagonistas conjuntamente, el resultado sería la ausencia completa de daños por el fenómeno isquémico (Puel y Pujol, 1992; Puel y cols., 1994).

Nuestros datos sobre las lesiones producidas por la administración intracoclear del ácido kaínico, agonista del ácido glutámico, nos llevarían a pensar que este método es válido para modelizar algunos de los mecanismos que se ponen en marcha en síndromes tanto de hipoxia-isquemia, como de trauma acústico o de presbiacusia.

### **FUTURAS APLICACIONES CLÍNICAS DEL PRESENTE ESTUDIO**

Aunque las principales aplicaciones clínicas ya han sido comentadas en el apartado anterior, una vez validado el modelo experimental, sería necesario valorar los usos potenciales del mecanismo de acción propuesto y su viabilidad para la utilización en la clínica como tratamiento de diversas patologías.

Los fenómenos hipóxicos/isquémicos han sido propuestos durante mucho tiempo como causa de las hipoacusia cocleares y retrococleares, mediante mecanismos crónicos en el caso de la presbiacusia, o agudos, en el caso de la hipoacusia súbita neurosensorial; también han sido asociados a la propia presbiacusia coclear y a los

traumatismos por energía acústica. En numerosos experimentos se ha demostrado que los traumas acústicos repetidos y de baja intensidad podrían formar parte de la etiopatogenia de la presbiacusia, siendo evidente que el mecanismo de lesión definitivo había de ser común, o al menos afín para todos ellos.

La hipoacusia súbita neurosensorial, aunque de etiología desconocida, podría tener un origen vírico, relacionado con infecciones recientes por virus de la parotiditis, citomegalovirus, herpes varicela-zoster, virus de la rubeola o de la gripe, que por vía hematógica o por contigüidad desde las cavidades craneales podrían llegar a la cóclea, provocando la degeneración de la estría vascular, de la membrana tectoria y del órgano de Corti (Bosch, 1992); también podría ser originada por la oclusión parcial o total de la vascularización coclear (Quirk y cols., 1991), de hecho los pacientes con by-pass cardiaco tendrían una incidencia mucho mayor de esta patología (Plasse y cols. 1980). Los pacientes con síndromes de hiperviscosidad sanguínea que ocurren en las macroglobulinemias, pueden sufrir sorderas súbitas que serían reversibles con plasmaféresis; también aparecen obstrucciones reversibles, con su consiguiente hipoacusia, en la policitemia vera o en la anemia falciforme (Urban, 1973), y en otros estados de hipercoagulabilidad. En la leucemia pueden ocurrir hemorragias en el oído interno que provocarían situaciones anóxico-isquémicas (Schuknecht, 1965).

Otra posible etiología de la hipoacusia súbita neurosensorial sería la ruptura de la membrana de Reissner (Gussen, 1983), que también parece ser la causa de la hipoacusia fluctuante en la enfermedad de Ménière (Gussen, 1983-a), que daría lugar a una intoxicación por  $K^+$  de las células ciliadas, lo que desencadenaría la liberación masiva de neurotransmisores por parte de las células ciliadas internas, iniciándose la cascada de efectos neurotóxicos descritos con anterioridad (Jenison y cols., 1985; Bobbin y cols., 1990; Drescher, 1992). Por último, otra causa de sordera brusca neurosensorial podría

tener un origen autoinmune, en relación con enfermedades como el síndrome de Cogan, la policondritis crónica atrofiante, el síndrome de Vogt-Koyanagy-Harada (Bosch, 1992).

En los casos de traumatismos mecánicos, acústicos o barotraumas del oído interno interactúan varios mecanismos, ya que pueden provocar rupturas del laberinto membranoso y también hemorragias por desprendimiento de la estría vascular (Drescher y cols., 1983 y 1992); en dichas situaciones el correcto funcionamiento del sistema eferente podría frenar el proceso patogénico mediante la hiperpolarización de las terminales postsinápticas, evitando la producción de lesiones permanentes.

El empleo de los agonistas dopaminérgicos en la clínica se limita casi exclusivamente a ciertas patologías neurológicas, como la enfermedad de Parkinson y ciertos parkinsonismos sintomáticos, donde se han probado los efectos beneficiosos de la dopamina de manera sobrada. La bromocriptina también está indicada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, aunque puede emplearse para el tratamiento de la galactorrea, de la amenorrea, del hipogonadismo, de ciertos prolactinomas y de la acromegalia. La apomorfina se ha empleado con cierta frecuencia para el tratamiento de algunas intoxicaciones, debido a los intensos vómitos que se provocan con su empleo.

Como efectos secundarios más destacados, observados en la clínica tras el empleo de estos agonistas, están las náuseas y los vómitos, la hipotensión arterial y las arritmias cardíacas, la excitación psicomotriz, alucinaciones y reacciones psicóticas, así como movimientos anormales involuntarios de tipo coreiforme o atetósicos.

La potenciación del sistema eferente como controlador y regulador de la homeostasis iónica y del potencial de reposo de membrana, mediante el uso de agonistas dopaminérgicos, se establece como una posibilidad terapéutica y profiláctica, única o coadyuvante frente a patologías cocleares en las que median los canales iónicos

y neurotransmisores de la sinapsis auditiva periférica.

Es necesario extender el conocimiento neurobiológico y electrofisiológico del sistema eferente, de los neurotransmisores y neuromoduladores de este sistema, de los receptores para estas sustancias neuroactivas, con el fin de lograr un control lo más fisiológico posible de las patologías, evitando así los efectos secundarios que se observan en la clínica y que son derivados del uso de estas sustancias neuroactivas.

## **CONCLUSIONES**

1 - El **ácido kaínico**, agonista del glutamato, posee una acción excitotóxica muy potente y de acción rápida, provocando lesiones neurosensoriales en el receptor auditivo. La excitotoxicidad del ácido kaínico como sustancia exógena sirve para analizar la fisiopatología de ciertas lesiones cocleares derivadas de la liberación excesiva del glutamato. Se aprecian similitudes en las lesiones morfológicas del trauma acústico, las sorderas bruscas y la hipoxia/isquemia coclear con las observadas en el presente estudio (ácido kaínico) y tienen como expresión morfológica más característica la edematización de los terminales dendríticos de las fibras aferentes auditivas tipo I bajo las células ciliadas internas.

2 - Las lesiones morfológicas descritas por la administración de ácido kaínico se acompañan de alteraciones electrofisiológicas como reducción de la amplitud y aumento de la latencia de la onda  $N_1$  del potencial de acción compuesto del nervio auditivo. Estas características permiten presentar este estudio como modelo experimental de sordera de origen coclear.

3 - La **dopamina**, neurotransmisor del sistema eferente lateral, podría modular postsinápticamente la actividad de las fibras aferentes auditivas de tipo I a través de los receptores  $D_1$  y  $D_2$ , como lo demuestra el presente estudio. Este mecanismo de regulación postsináptico actuaría en situaciones patológicas (como la administración de ácido kaínico aquí estudiada) lo que se demuestra por la reducción de las lesiones en las dendritas de las fibras aferentes, que se obtiene mediante la administración de agonistas dopaminérgicos.

4 - Los resultados obtenidos con el empleo de la **bromocriptina**, un agonista dopaminérgico  $D_2$ , demuestran que no existe significación estadística en el estudio de la latencia y de la amplitud, al compararlos con los resultados obtenidos en los experimentos de los controles y del tóxico. En el estudio de microscopía óptica de este

experimento se aprecia una vacuolización intensa bajo las células ciliadas internas, más importante en las espiras medias y en el ápex coclear.

5 - El estudio de la latencia y de la amplitud tras el empleo de la **apomorfina**, un agonista dopaminérgico  $D_1/D_2$ , y al compararlo con los resultados de los mismos parámetros obtenidos de los experimentos del ácido kaínico y de los controles, indica que no existe diferencia estadísticamente significativa con los controles, pero si que existe esta diferencia con el ácido kaínico. Las lesiones morfológicas del órgano de Corti en este experimento con apomorfina son escasas o inexistentes.

6 - En el experimento con el **SKF**, un agonista dopaminérgico  $D_1$ , la significación estadística en el estudio de la amplitud únicamente se produce a altas intensidades de estimulación sonora, al compararla con los resultados obtenidos de los controles y del ototóxico; no existe significación estadística en el estudio de la latencia. Las lesiones microscópicas en este experimento son evidentes en las espiras basales y medias de la cóclea.

7 - El estudio estadístico del experimento con los **vehículos de los agonistas dopaminérgicos** no demuestran diferencias con los correspondientes controles de perilinfa, ni tampoco se aprecian alteraciones morfológicas en el estudio microscópico.

8 - Los agonistas de la dopamina que ofrecen mayor protección, frente a la neurotoxicidad inducida experimentalmente por el ácido kaínico, son los que ejercen su acción conjuntamente sobre los receptores  $D_1$  y  $D_2$ , a diferencia de los agonistas que actúan solo sobre uno de los dos receptores ( $D_1$  o  $D_2$ ) en los que la protección sobre la terminal postsináptica es incompleta o inexistente.

9 - La localización sináptica más probable de ambos receptores es en las fibras aferentes auditivas de tipo I (situación postsináptica), con independencia de la existencia de receptores  $D_2$  también en la fibra presináptica.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abou-Madi, L.; Pontarotti, P.; Tramu, G.; Cupo, A. and Eybalin, M. (1987): Coexistence of putative neuroactive substances in lateral olivocochlear neurons in guinea pig and rat. *Hear. Res.* 30: 135-146.
- Adams, JC.; Mroz, EA. and Sewell, WF. (1987): A possible neurotransmitter role for CGRP in a hair-cell sensory organ. *Brain Res.* 419: 347-351.
- Alonso-Solís, R. (1992): Neurotransmisores y Neuromoduladores. En: *Fisiología Humana*. J.A.F. Tresguerres. Ed. McGraw Hill-Interamericana. Pag. 63-86.
- Altschuler, RA.; Parakkal, MH.; Rubio, JA.; Hoffman, DW. and Fex, J. (1984): Enkephalin-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti: ultrastructural and lesion studies. *Hear. Res.* 16: 17-31.
- Altschuler, RA.; Kachar, B.; Rubio, JA.; Parakkal, MA. and Fex, J. (1985): Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res.* 338: 1-11.
- Altschuler, RA.; Sheridan, CE.; Horn, JW. and Wenthold, RJ. (1989): Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 42: 167-174.
- Amara, SG.; Arriza, JL.; Leff, SE.; Swanson, LW.; Evans, RM. and Rosenfeld, MG. (1985): Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science Wash. DC* 229: 1094-1099.
- Andersen, PH. and Jansen, JA. (1990): Dopamine receptor agonists: selectivity and D1 receptor efficacy. *Eur. J. Pharmacol.* 188: 335-347.
- Andrea, M. (1992): Anatomía de la caja timpánica y del sistema tímpano-oscicular. En: *Otorrinolaringología*. P. Abelló y J. Traserra. Ed. Doyma. Barcelona. Pag. 17-24.
- Aran, JM. y Harrison, R-V. (1985): Fisiología de la cóclea. En: *Fisiología Neurosensorial en ORL*. Ed. Masson SA. París. Pag. 75-102.
- Aran, JM.; Dancer, A.; Dolmazon, JM.; Pujol, R. et Tran Ba Huy, P. (1988): *Physiologie de la Cochlée*. Editions EMI et INSERM. Paris. Pag. 1-176.
- Arnold, F. (1951): *Handbuch der anatomie des menschen*. Vol 2. Freiburg im Breisgan. Herdersche Verlagohandlung.
- Ashmore, JF. (1987): A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: The cellular basis of the cochlear amplifier. *J.Physiol.* 388: 323-347.
- Bancaud, J.; Bloch, V. and Paillard, J. (1953): Contribution EEG á l'étude des potentials évoqués chez l'homme au niveau du vertex. *Rev. Neurol.* 89: 382-399.
- Barajas, JJ. (1992): Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral. Descripción y características normales de la respuesta. En: *Potenciales Evocados somatosensoriales, visuales y auditivos*. Pag. 421-439. Ed. Ciges, Artieda, Sáiz, Stinge de Méndez. Granada.

- Bargmann, CI. (1994): Molecular Mechanisms of Mechanosensation?. In: Cell. Vol. 8: 729-731. Edited by Cell Press.
- Bartolami, S.; Planche, M. and Pujol, R. (1993-a): Characterization of muscarinic binding sites in the adult and developing rat cochlea. *Neurochem. Int.* 23: 419-425.
- Bartolami, S.; Ripoll, C.; Planche, M. and Pujol, R. (1993-b): Localization of functional muscarinic receptors in the rat cochlea: evidence for efferent presynaptic autoreceptors. *Brain Res.* 626: 200-209.
- Bartolomé, MV.; Ibáñez, MA.; López-Sánchez, JG.; Merchán-Pérez, A. y Gil-Loyzaga, P. (1993): Synaptophysin Immunoreactivity in the Cochlear Nuclei of Mammals: A Comparative Study. *ORL and its Related Specialities* 55: 317-332..
- Baust, W.; Berlucchi, G. and Moruzzi, G. (1964): Changes in the auditory input during arousal in cats with tenotomised unidirectional ear muscle. *Arch. Ita. Biol.* 102: 675.
- Beattie, J. and Moore, JK. (1991): Immunohistochemical demonstration of neurotransmitter characteristics of olivocochlear neurons (Abstract). Pag. 20. *Proc. Annu. Meet. Assoc. Res. Otolaryngol.* 14<sup>th</sup> St. Petersburg Beach. FL.
- Békésy, G. von (1932): Über den Einfluss der durch den Kopf und den Gehörgang bewirkten Schallfeldverzerrungen auf die Hörschwelle. *Ann. Physik.* 14: 51.
- Békésy, G. von (1941): Über die Resonanzkurve und die Abklingzeit der verschiedenen Stellen der Schneckenwand. *Akust. Z.* 8: 66-67.
- Békésy, G. von (1950): D.C.: Potentials and energy balance of the cochlear partition. *J.S.A.* 22: 576-582.
- Békésy, G. von. (1960): *Experiments in Hearing.* McGraw-Hill. New York.
- Békésy, G. von (1968): DC potentials and energy balance of the cochlear partition. *J. Acous. Soc. Am.* 44: 951.
- Bekkers, JM. and Stevens, CF. (1989): NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. *Nature Lond.* 341: 230-233.
- Benson, TE. and Ryugo, DK. (1987): Axons of presumptive type-II spiral ganglion neurons synapse with granule cells of cat cochlear nucleus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17: 1258.
- Benveniste, H.; Drejer, J.; Schousboe, A. y Diemer, NH. (1984): Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* 43: 1369-1374.
- Bergman, J.; Rosenzweig-Lipson, S. and Spelman, RD. (1995): Differential effects of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor agonists on Schedule-controlled behavior of squirrel monkeys. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* Vol. 273.

N° 1. Pag. 40-48.

- Berlin, ChI. (1984): Hearing Science. Recent advances. Coll. Hill Press. Pag. 1-499.
- Bernhard, JD. and Volkmar, B. (1993): The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear. Res.* 66: 8-22.
- Bertman, L.; Welch, FA. and Harp, JR. (1981): Cerebral protective effect of low grade hypothermia. *Anesthesiology.* 55: 495-498.
- Billet, TE.; Thorne, PR. and Gavin, JE. (1989): The nature and progression of injury in the organ of Corti during ischemia. *Hear Res.* 41: 189-198.
- Bledsoe Jr, SC.; Bobbin, RP. and Chihal, DM. (1981): Kainic acid: An evaluation of its action on cochlear potentials. *Hear. Res.* 4: 109-120.
- Bledsoe Jr, SC.; Bobbin, RP. and Puel J-L. (1988): Neurotransmission in the inner ear. In: *Physiology of the Ear.* Pag. 385-406. Eds. AF. Jahn and JR Santos-Sacchi. Raven Press: NY.
- Bobbin, RP. (1979): Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 34: 389-393.
- Bobbin, RP. and Kisiel, DL. (1981): Physiology of hearing. In: *Pharmacology of Hearing.* Pag. 19-49. Eds. R.D. Brown and E.A. Daigneault. Wiley-Interscience New-York.
- Bobbin, RP. and Konishi, T. (1974): Action of cholinergic and anticholinergic drugs at the crossed olivo-cochlear bundle-hair cell junction. *Acta Otol.* 77: 55-65.
- Bobbin, RP. and Thompson, MH. (1978): Effects of putative transmitters on afferent cochlear transmission. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 87: 185-190.
- Bobbin, RP.; Bledsoe Jr, SC. and Jenison, GL. (1984): Neurotransmitter of the cochlea and lateral line organ in: *Hearing Sciences: Recent advances.* Pag. 159-180 Ed. C.I. Berlin College Hill Press: San Diego.
- Bobbin, RP.; Caesar, G. and Fallon, M. (1990): Potassium induced release of GABA and other substances from the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 46: 83-94.
- Bock, GR. and Saunders, JC. (1977): A critical period for acoustic trauma in the hamsters and its relation to cochlear development. *Science.* 197: 396-398.
- Bock, RM. and Steel, KP. (1984): Use of albino animals for auditory research. *Hear. Res.* 13: 201-202.
- Bodian, D. (1978): Synapses involving auditory nerve fibers in primate cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4582-4586.
- Bodian, D. (1980): Presynaptic bodies of auditory hair cell in Old World monkeys. *The Anatomical Records.* 197: 379-386.
- Bohne, BA.; Gruner, MM. and Harding, GW. (1990): Morphological correlates of aging

- in the chinchilla cochlea. *Hear-Res.* 48: 79-91.
- Borg, E. (1972): Acoustic middle ear reflexes: a sensory-control system. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.) Suppl. 304: 1-34.
- Borg, E. (1973): On the neuronal organization of the acoustic middle ear reflex. A physiological and anatomical study. *Brain Res.* 49: 101-123.
- Bosch, J. (1992): Síndromes neurosensoriales. En: *Otorrinolaringología*. Abelló, P. y Traserria, J. Ed. Doyma. Capítulo 41. Pag. 192-198.
- Brannan, T.; Martínez-Tica, J.; Di Rocco, A. and Yahr, MD. (1993): Low and high dose bromocriptine have different effects on striatal dopamine release: an in vivo study. *J. Neural. Transm.* 6: 81-87.
- Bredberg, G. (1968): Cellular pattern and nerve supply of the human organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* Suppl. 236: 1.
- Bredberg, G. (1977): Innervation of the organ of Corti as revealed in the scanning electron microscope. *Psychophysics and Physiology of Hearing*. Pag. 1. E.F. Evans & J.P. Wilson (eds) Academic. Press. London.
- Brown, MC. (1987-a): Morphology of labeled afferent fibers in the guinea pig cochlea. *J. Comp. Neurol.* 260: 591-604.
- Brown, MC. (1987-b): Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J. Comp. Neurol.* 260: 605-618.
- Brown, MC. and Nuttall, AL. (1984): Efferent control of cochlear inner hair cell responses in the guinea pig. *J. Physiol. London.* 354: 625-646.
- Brown, MC.; Berglund, AM.; Kiang, AS. and Ryugo, DK. (1988): Central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 278: 581-590.
- Brown, MC.; Nuttall, AL.; Masta, RI. and Lawrence, M. (1983): Cochlear inner hair cells: Effects of transient asphyxia on intracellular potentials. *Hearing Res.* 1: 131-144.
- Brownell, WE. (1983): Observations on a motile response in isolated hair cells. In: *Mechanisms of Hearing*. Edited by Webster and Aitkin. Pag. 5-10. Monash University Press. Clayton, Victoria. Australia.
- Brownell, WE.; Bader, CR.; Bertrand, D. and de Ribanpierre, Y. (1985): Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 277: 194-196.
- Busto, R.; Globus, MYT.; Dietrich, E.; Martínez, E.; Valdés, I. and Ginsberg, MD. (1989): Effect of mild hypothermia on hypoxia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke.* 20: 904-910.
- Carrasco, VN.; Prazma, JE.; Faber, RJ.; Triana, HC. and Pillsbury, T. (1990): Cochlear microcirculation. Effect of adrenergic agonists on arteriole diameter. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 116: 411-417.

- Carricondo, F. (1995): Neurotoxicidad inducida por el glutamato monosódico en la cóclea de la rata. Efectos protectores del Diltiazem. Tesina de Licenciatura. 1995.
- Carricondo, F.; Gil-Loyzaga, P.; Sanjuán-Juaristi, J. and Poch-Broto, J. (2001): Cochlear microphonic potentials: a new recording technique. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* (en prensa).
- Carricondo, F.; San Román, J.; del Castillo, E.; Sanjuán-Juaristi, J.; Poch-Broto, J. y Gil-Loyzaga, P. (1999): Potenciales microfónicos cocleares. Nuevos datos. Congreso extraordinario 50º aniversario de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial. Madrid. 1999.
- Caton, R. (1875): The electric current of the brain. *Br. Med. J.* 2: 278.
- Cazals, Y. (1985): Psicoacústica. En: *Fisiología Neurosensorial en ORL* Pag. 119-136. Ed. Masson S.A. París.
- Ciges, M. (1992): Potenciales evocados auditivos. Correlaciones morfofuncionales. En: *Potenciales Evocados somatosensoriales, visuales y auditivos.* Ciges, Artieda, Sáiz, Stinge de Méndez. ISBN: 84-7755-035-2. Dep. Legal: GR.1040/1992. Granada. Pag. 321-338.
- Ciges, M. (1997): Maduración de la cóclea humana. *Vertére.* 24: 21-22
- Cody, AR. and Russell, IJ. (1985): Outer hair cells in the mammalian cochlea and noise-induced hearing loss. *Nature Lond.* 315: 662-664.
- Cole, KS. (1968): *Membranes, Ions and Impulses: a Chapter of Classical Biophysics.* Berkeley. University of California Press.
- Coleman, JW. (1976): Hair cell loss as a function of age in the normal cochlea of the guinea pig. *Acta-Otolaryngol.* 82: 33-40.
- Collingridge, GL.; Herron, CE. and Lester, RAJ. (1988): Frequency-dependent N-Methyl-D-Aspartate receptor mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *J. Physiol.* 383: 551-569.
- Collins, GGS.; Anson, J. and Surtees, L. (1983): Presynaptic kainate and N-methyl-D-aspartate receptors regulate excitatory release in the olfactory cortex. *Brain. Res.* 265: 157-159.
- Comis, SD. and Leng, G. (1979): Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea. *Exp. Brain Res.* 36: 119-128.
- Corey, D.P. and Hudspeth, A.J. (1983): *J. Neurosci.* 3: 962-976.
- Corwin, JT. and Warchol, ME. (1991): Auditory Hair cells: Structure, function, development and regeneration. *Ann. Rev. Neurosci.* 14: 301.
- Cousillas, H.; Cole, KS. and Johnstone, BM. (1988): Effect of spider venom on cochlear nerve activity consistent with glutamatergic transmission of hair cell-afferent dendrite synapse. *Hearing Res.* 36: 213-220.

- Coyle, JT. (1983): Neurotoxic action of kainic acid. *J. Neurochem.* 41: 1-11.
- Cull-Candy, SG. and Usowicz, MM. (1987): Multiple-conductance channels activated by excitatory aminoacids in cerebellar neurons. *Nature Lond.* 325: 525-528.
- Charachon, G. and Eybalin, M. (1990): Putative dopaminergic efferent (olivocochlear) innervation of the cochlea: Immunoelectron microscopy and effects of 6-OHDA. *Eur. J. Neurosci.* 3 (suppl): 152.
- Chiveralls, K. and Fitz Simons, R. (1973): Stapedial reflex action in normal subjects. *Brit. J. Audiol.* 7: 105-110.
- Choi, DW. (1987): Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7: 369-379.
- Choi, DW. (1988): Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11: 465-469.
- Choi, DW. (1990): The role of glutamate neurotoxicity in the hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 171-182.
- Choi, DW. and Rothman, SM. (1990): The role of glutamate neurotoxicity in the hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:171-182.
- D'Aldin, C.; Puel, JL.; Leducq, R.; Crambes, O.; Eybalin, M. and Pujol, R. (1995): Effects of a dopaminergic agonist in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 90: 202-211.
- Dallos, P. (1976): Cochlear receptor potentials. In: *Electrocochleography*. University Park Press. Baltimore.
- Dallos, P. and Wang, CY. (1974): Bioelectric correlates of kanamycin intoxication. *Audiology.* 13: 277-287.
- Dancer, A. (1979): Transmission et analyse du stimulus acoustique au niveau du récepteur périphérique, In: *Les Récepteurs Cochléaires*. Monographie du groupement des acousticiens de la langue française. Paris. Pag. 43-68.
- Dannhoff, BJ. and Bruns V. (1993): The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hearing Res.* 66: 8-22.
- Davis, H. (1958): A mechano-electric theory of cochlear action. *Ann Otol. Rhinol. Laryngol.* 67: 789-801.
- Davis, H. (1968): Mechanisms of the inner ear. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 77: 644-655.
- Davis, H. (1983): An active process in cochlear mechanics. *Hear. Res.* 9: 79-90.
- Davis, H.; Davis, PA.; Loomis, AL. y cols. (1939): Electrical relations of the human brain to auditory stimulus during sleep. *J. Neurophysiol.* 2: 500-514.
- Davis, H.; Deatherage, BH.; Rosenblut, B.; Fernández, C.; Kimura, R. and Smith, A.

- (1958): Modification of cochlear potentials produced by streptomycin poisoning and by extensive venous obstruction. *Laryngoscope*. 68: 596-627.
- Davis, H.; Fernández, C. and McAuliffe, DR. (1950): The excitatory process in cochlea. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 36: 580-587.
- Dawson, GD. (1951): A summation technique for detecting small signals in a large irregular background. *J. Physiology*. Pag. 115
- De Barry, J.; Langley, OK.; Vincendon, G. and Gombos, G. (1982): L-Glutamate and L-glutamine uptake in the adult rat cerebellum: an autoradiographic study. *Neuroscience*. 7: 1289-1297.
- De los Santos, G.; Sanjuán, J. and Gavilán, J.(1998): New method for recording cochlear microphonic potentials in human beings. *Acta Otorrinolaringológica Española*. 49: 341-345.
- Densert, O. and Flock, A. (1974): An electron microscopic study of adrenergic innervation in the cochlea. *Acta Otolaryngol*. 77: 185-197.
- Djupesland, G.; Flollorp, G. and Winther, FO. (1967): Size and duration of acoustically elicited impedances changes in man. *Acta Otolaryng. (Stockh) Suppl*. 224: 220-228.
- Drejer J.; Benveniste, H.; Diemer NH. and Schousboe A. (1985): Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J Neurochem*. 45: 145-141.
- Drenckhahn, D.; Kellner, J.; Mannherz, HG.; Groschel-Stewart, U.; Kendrick-Jones, J. and Scholey, J. (1982): Absence of myosin-like immunoreactivity in stereocilia of cochlear hair cell. *Nature*. 300: 531-532.
- Drescher, MJ.; Drescher, DG. and Medina, JE. (1983): Effects of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates in perilymph of the guinea pig inner ear. *J. Neurochem*. 41: 309-320.
- Drescher, DG.; Upadhyay, S.; Wilcox, ER. and Fex, J. (1992): PCR analysis and molecular cloning of neurotransmitter receptor subtypes from the mouse cochlea (Abstract). *Proc. Symp. Mol. Biol. Hearing and Deafness*. La Jolla. CA. Pag. 46.
- Drescher, DG.; Lasak, JM.; Chomchai, J.; Drescher, MJ. and Khan, KM. (1994): Dopamine receptor subtype messages in the mouse cochlea. *Soc. Neurosci*. 20: 972.
- Duhaine, AC. and Ross, DT. (1990): Degenerations of hippocampal CA1 neurons following transient ischemia due to raised intracranial pressure: evidence for a temperature-dependent excitotoxic process. *Brain Res*. 512: 169-174.
- Durrant, JD. and Lovrinic, JH. (1995): *Bases of Hearing Science*. Baltimore. Williams and Wilkins. 3er Edition. Pag. 138-255.
- Eggermont, JJ. (1983): Tinnitus: some thoughts about its origin. *J. Laryngol. Oto*.

Suppl. 9: 31-37.

- Ehrenberger, K. and Felix, D. (1991): Glutamate receptors in the afferent cochlear neurotransmission in the guinea pigs. *Hear.Res.* 52: 73-80.
- Engström, H. (1960): Electron microscopic studies of the receptor cells of the organ of Corti. In: *Neural Mechanism of the Auditory and Vestibular Systems*. Pag. 48-64. C.C. Thomas. Springfield. IL.
- Erdo, S.L.; Cai, N. and Lakics, V. (1993): Medium dependent dissociation of cytotoxic and GABA-releasing effects of N-Methyl-D-Aspartate (MNDA). *Neurosci. Lett.* 152(1-2): 82.
- ErosteGUI, C.; Norris, CH. and Bobbin, RP. (1994): In vitro pharmacologic characterization of a cholinergic receptor of outer hair cells. *Hearing Res.* 74:135-147.
- Eybalin, M. (1993): Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiological Revs. USA*. Vol 73, N° 2: 309-337.
- Eybalin, M. and Altschuler, RA. (1990): Immunoelectron microscopic localization of neurotransmitters in the cochlea. *J. Electron Microsc.* 15: 209-224.
- Eybalin, M. and Pujol, R. (1983): A radioautographic study of [<sup>3</sup>H] Lglutamate and [<sup>3</sup>H] Lglutamine uptake in the guinea pig cochlea. *Neuro-Science.* 9: 863-871.
- Eybalin, M. and Pujol, R. (1984): Ultrastructural localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the organ of Corti. *Neurosci. Lett. Suppl.* 18: 5244.
- Eybalin, M. and Pujol, R. (1984-a): Immunofluorescence with Met-enkephalin and Leu-enkephalin antibodies in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 13: 135-140.
- Eybalin, M. and Pujol, R.(1987): Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. *Exp. Brain Res.* 65: 261-270.
- Eybalin, M. and Pujol, R. (1989): Cochlear neuroactive substances. *Arch. Oto-rhino-laryngol.* 246: 228-234.
- Eybalin, M.; Charachon, G. and Renard, N. (1993): Dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: Immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine. *Neurosci.* 54: 133-142.
- Eybalin, M.; Parnaud, C.; Geffard, M. and Pujol, R. (1988): Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA-containing efferent synapses in the guinea-pig organ of Corti. *Neuroscience.* 24: 29-38.
- Eybalin, M.; Pujol, R. and Bockaert, J. (1987): Opioid receptors inhibit the adenylate-cyclase in guinea pig cochleas. *Brain Res.* 421: 336-342.

- Eybalin, M.; Renard, N.; Ottersen, OP.; Storm-Mathisen, J. and Pujol, R. (1990): Immunoelectron microscopic localization of glutamate in the organ of Corti (Abstract). *Eur. J. Neurosci.* 2, Suppl. 3: 118.
- Eybalin, M.; Renard, N.; Ottersen, OP.; Storm-Mathisen, J. and Pujol, R. (1991): Ultrastructural immunolocalization of glutamate in the guinea pig organ of Corti. (Abstract). Pag. 18. *Proc. Annu. Meet. Assoc. Res. Otolaryngol.* 14<sup>th</sup> St. Petersburg Beach. FL.
- Faden, AI.; Demediuk, P.; Panter, SS and Vink, R. (1989): The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science Wash. DC.* 244: 798-800.
- Felix, D.; Ambühl, P. and Ehrenberger, K. (1991): The efferent modulation of inner hair cell afferent (Abstract). *Proc. Workshop Inner Ear Biol.* 28<sup>th</sup>. Pag. 42. Tübingen.
- Felix, D. and Ehrenberger, K. (1992): The efferent modulation of mammalian inner hair cell afferents. *Hear. Res.* 64: 1-5.
- Ferkany, JW.; Zaczek, R. and Coyle, JT. (1982): Kainic acid stimulates excitatory amino-acid neurotransmitter release at presynaptic receptor. *Nature* 298: 863-872.
- Fernández, C. (1951): The innervation of the cochlea. *Laryngoscope.* 61: 1152-1172.
- Fex, J. and Altschuler, RA. (1981): Enkephalin-like immunoreactivity of olivocochlear nerve fibres in cochlea of guinea pig and cat. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 125-159.
- Fex, J. and Altschuler, RA. (1984): Glutamic acid decarboxylase immunoreactivity of olivocochlear neurons in the organ of Corti of guinea pig and rat. *Hear. Res.* 15: 123-131.
- Fex, J.; Altschuler, R.A.; Wenthold, R.J. and Parakkal, M.H. (1982): Aspartate aminotransferase immunoreactivity in the cochlea of guinea pig. *Hear. Res.* 7: 149-160.
- Fisch, U. et von Schulthess, G. (1963): Electromyographic studies on the human stapedial muscle. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 56: 287-297.
- Fonnum, F. (1991): Neurochemical studies on glutamate-mediated neurotransmission. In: *Excitatory amino Acids.* Edited by Meldrum, Morini and Wood. New York. Raven. Pag. 15-25.
- Fuchs, PA. (1992): Ionic currents in Cochlear Hair Cells. *Prog. Neurobiol.* 39: 493-505.
- Gavilán, C. and Sanjuán, J. (1961): Variations in guinea-pig cochlear potentials caused by experimental alterations in the middle ear. *Acta Otorrinolaringológica Iberoamericana.* 1: 101-109.
- Gavilán, C. and Sanjuán, J. (1964): Microphonic potential picked up from the human tympanic membrane. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngology.* 73: 101-109.

- Geijo, E. (1992): Transmisión sináptica. En: Fisiología Humana. J.A.F. Tresguerres. Ed. McGraw Hill-Interamericana. Pag. 42-61.
- Geisler, CD.; Frishkopf, LS. and Rosenblith, WE. (1958): Extracranial responses to acoustic clicks in man. *Science* 128: 1210-1211.
- Gerfen, CR.; Engber, TM.; Mahan, LC.; Susel, Z. and Chase, TN. (1990): D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1432.
- Gersdorff, MCH. (1978): L'impédance acoustique ou audiologie. Mémoire de l'Université Catholique de Louvain. Pag. 189.
- Gibson, WPR. (1978): Essentials of clinical electric response audiometry. Churchill Livingstone; Edimburgo.
- Gil-Carcedo, LM. (1995): Ontogenia y Filogenia del oído. En: Otología. ISBN. 84-89316-03-1. Barcelona.
- Gill, R.; Foster, AC. and Woodruff, GN. (1987): Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J. Neurosci.* 7: 3343-3349.
- Gil-Loyzaga, P. (1995): Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: With an emphasis on dopamine. *Acta Otolaryngol. (Stockh).* 115: 222-226.
- Gil-Loyzaga, P. (1997): Histochemistry of glycoconjugates of the auditory receptor: Glycoconjugates of the tectorial membrane of the mammalian cochlea. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.* Gustav Fischer Verlag. (Stuttgart-Jena-Lübeck-Ulm). Vol. 32. Cap. 1: 1-43.
- Gil-Loyzaga, P. and Brownell, WE. (1988): Wheat germ agglutinin and Helix pomatia agglutinin lectins binding on cochlear hair cells. *Hear. Res.* 34: 149- 156.
- Gil-Loyzaga, P. and Parés-Herbute, N. (1986): Presence of noradrenaline and dopamine in the adult and developing rat cochlea. *Neurosci. Lett.* 26 (suppl): 134.
- Gil-Loyzaga, P. and Parés-Herbute, N. (1989): HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. *Brain Res. (Devl. Brain Res.)*. 48: 157-160.
- Gil-Loyzaga, P. y Poch-Broto, J. (2000-a): El oído interno: El laberinto óseo. Anatomía e histología de la cóclea. En: Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Ed. C. Suarez, LM. Gil-Carcedo y cols. Proyectos Médicos S.L. Tomo II; Parte I, 60: 688-697.
- Gil-Loyzaga, P. y Poch-Broto, J. (2000-b): Fisiología del sistema auditivo periférico. En: Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Ed. C. Suarez, LM. Gil-Carcedo y cols. Proyectos Médicos S.L. Tomo II; Parte I, 66: 762-774.
- Gil-Loyzaga, P. and Pujol, R. (1987): Synaptophysin in the developing cochlea. *Int. J. Devl. Neuroscience.* Vol. 6: 155-160.

- Gil-Loyzaga, P. and Pujol, R. (1990-a): Neurotoxicity of kainic acid in the rat cochlea during early developmental stages. *Eur. Arch. Oto-rhino-laryngol.* 248: 40-48.
- Gil-Loyzaga, P. and Pujol, R. (1990-b): Kainic acid toxicity on cochlear type I neurons. In: *Proceedings of the Fourteenth World Congress of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery*. Madrid. 1989. Amsterdam: Kluger, 1990. Pag. 37-39.
- Gil-Loyzaga, P. y Pujol, R. (1999): Fisiología del receptor y la vía auditiva. En: *Fisiología Humana*; 2ª Ed. J.A.F. Tresguerres y cols. Ed. McGraw Hill-Interamericana. Pag. 231-244.
- Gil-Loyzaga, P.; Bartolomé, MV. and Ibáñez, MA. (1998): Synaptophysin immunoreactivity in the cat cochlear nuclei. *Histol. Histopathol.* 13: 415-424.
- Gil-Loyzaga, P.; Bartolomé, MV. and Vicente-Torres, MA. (1997-a): Serotonergic innervation of the organ of Corti of the cat cochlea. *NeuroReport.* 8: 3519-3522.
- Gil-Loyzaga, P.; Cupo, A. and Eybalin, M. (1988): Met-enkephalin and Met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> immunofluorescence in the developing guinea-pig organ of Corti. *Dev. Brain Res.* 42: 142-145.
- Gil-Loyzaga, P.; Gabrion, J. and Uziel, A. (1985): Lectins demonstrate the presence of carbohydrates in the tectorial membrane of the mammalian cochlea. *Hear. Res.* 20: 1-8.
- Gil-Loyzaga, P.; Merchán, M. and Collía, F. (1987): The ultrastructure of the spiral ligament of the rodent cochlea. *Acta Microscópica* 10/3: 399-409.
- Gil-Loyzaga, P.; Merchán-Pérez, A. and Remezal, M. (1994-b): Selective <sup>3</sup>H-GABA uptake by olivocochlear efferent fibers of the developing rat cochlea. *Proc. Workshop Inner Ear Biol.* 31<sup>st</sup> Montpellier. France.
- Gil-Loyzaga, P.; Bartolomé, MV.; Vicente-Torres, MA. and Carricondo, F. (2000-c): Serotonergic innervation of the organ of Corti. *Acta Otolaringol. (Stockh).* 120: 128-132.
- Gil-Loyzaga, P.; Fernández-Mateos, P.; Vicente-Torres, MA.; Remezal, M.; Cousillas, H.; Arce, A. and Esquifino, A. (1993): Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism. *Brain Res.* 623: 177-180.
- Gil-Loyzaga, P.; Hernández, E.; Carricondo, F.; Simón, F. and Poch-Broto, J. (1999-a): Trimetazidine prevents cochlear lesions induced by intraperitoneal and perilymphatic administration of kainic acid. *Brain Res.* 826: 95-103.
- Gil-Loyzaga, P.; Poch-Broto, J.; Vicente-Torres, MA.; Bartolomé, MV.; Carricondo, F.; San Román, J. and Jiménez, L. (1999-b): GABA, dopamine and serotonin in cochlear innervation. Models of protection against neurotoxicity. In: *Cochlear pharmacology and noise trauma*. NRN Publisher. London. 3: 23-42.
- Gil-Loyzaga, P.; San Román, J.; Carricondo, F.; Vicente-Torres, MA. and Bartolomé, MV. (1998-b): Effects of dopamine agonists on the compound action potential of the auditory nerve. 35<sup>th</sup> Workshop on Inner Ear Biology. Innsbruck. Austria.

- Gil-Loyzaga, P.; Vicente-Torres, MA.; Arce, A.; Cardinali, DP. and Esquifino, A. (1998-c): Effect of superior cervical ganglionectomy on catecholamine concentration in the rat cochlea. *Brain Res.* 779: 53-57.
- Gil-Loyzaga, P.; Vicente-Torres, MA.; Arce, A.; Fernández, MP. and Esquifino, A. (1992): The normal decrease of cochlear dopamine concentration during noise stimulation is modified by piribedil (Abstract). *Proc. Int. Catecholamine Symp.* 7<sup>th</sup> Amsterdam. Pag. 111.
- Gil-Loyzaga, P.; Vicente-Torres, MA.; Fernández-Mateos, P.; Arce, A. and Esquifino, A. (1994-a): Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise. *Hear. Res.* 79: 178-182.
- Gil-Loyzaga, P.; Vicente-Torres, MA.; García-Bonacho, M. and Esquifino, A. (1997-b): Presence of catecholamines and serotonin in the rat vestibule. *Brain Res.* 746: 265-268.
- Gingrich, JA. and Caron, MG. (1993): Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 299-321.
- Godfrey, DA.; Carter, JA.; Berger, SJ. and Matschinsky, FM. (1976): Levels of putative transmitters amino acids in the guinea pig cochlea. *J. Histochem.* 24: 468-470.
- Goldstein, R. (1954): Analysis of summing potentials in cochlear responses of guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 178: 331.
- Goldstein, A. (1984): Biology and chemistry of the dynorphin peptides. In: *The peptides*. Edited by S. Udenfriend and J. Meienhofer. Orlando. FL Academic. Vol. 6: 95-145.
- Gordon, JH.; Borinson, RL. and Diamond, BI. (1980): Modulation of dopamine receptor supersensitivity by estrogen. *Biol. Psychiat.* 115: 389-396.
- Guerrier, Y. y Uziel, A. (1985): El sistema auditivo central. En: *Fisiología Neurosensorial en ORL*. Ed. Masson SA. Barcelona.
- Guinan, JJ.; Warr, WB. and Norris, BE. (1983): Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 221: 358-370.
- Guinan, JJ.; Warr, WB. and Norris, BE. (1984): Topografic organization of the olivocochlear projections from the lateral and medial zones of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 226: 21-27.
- Gulley, RL.; Fex, J. and Wenthold, RJ. (1979): Uptake of putative neurotransmitters in the organ of Corti. *Acta Oto-laryngol.* 88: 177-182.
- Gussen, R. (1983): Sudden deafness associated with bilateral Reissner`s membrane ruptures. *Am-J-Otolaryngol.* 4: 27-32.
- Gussen, R. (1983-a): Vascular mechanisms in Ménière`s disease. *Otolaryngol-Head-Neck-Surg.* 91: 68-71.

- Harris, GG. (1968): Brownian motions in the cochlear partition. *J. Acous. Soc. Am.* 44: 176-186
- Hasimoto, J.; Ishiyama, Y. and Yoshimoto, T. (1981): Brainstem auditory evoked potential recorded directly from the brainstem and thalamus. *Brain* 104: 841-857.
- Hawkins, JE-Jr. (1971): The role of vasoconstriction in noise-induced hearing-loss. *Ann. Otol. Rhinol Laryngol.* 80: 903-913.
- Helmholtz, H. (1868): Die Mechanik der Gehorknochenchen und des Trommelfelk Pflueger. *Arch. I:* 1-60.
- Helmholtz, HLF. (1885): Die lehre von der tonempfindungen als physiologische grundlage fur die theorie der musik. In: *The sensations of tone.* Longmans et Green. London.
- Henley, CM. and Rybak, LP. (1995): Ototoxicity in developing mammals. *Brain. Res. (Reviews)* 20: 68-90.
- Hernández-Martínez, E. (1993): Efecto protector de los antagonistas del calcio frente a las lesiones cocleares inducidas por ácido kaínico. Tesina de licenciatura.
- Hernández-Ortiz, P. (1992): Estudio morfológico de las lesiones inducidas por aminoácidos excitotóxicos en la cóclea de la rata. Tesis doctoral.
- Hill, DR. and Bowery, NG. (1981): <sup>3</sup>H-Baclofen and <sup>3</sup>H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA<sub>B</sub> sites in rat brain. *Nature.* 290: 149-152.
- Hodgkin, AL. and Huxley, AF. (1952): A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500-544.
- Hoffman, DW.; Edkins, RD. and Jones-King, KL. (1989): Release of enkephalins and dynorphins at the olivocochlear synapses in the cochlea (Abstract). *Proc. Annu. Meet. Assoc. Res. Otolaryngol.* 12<sup>th</sup> St. Petersburg Beach FL. Pag. 344.
- Hoffman, IS. and Cubeddu, LX. (1984): Differential effects of bromocriptine on dopamine and acetylcholine release modulatory receptors. *J Neurochem.* Vol. 42. N° 1. Pag. 278-282.
- Hoffman, DW.; Zamir, N.; Rubio, J.; Altschuler, RA. and Fex, J. (1985): Proenkephalin and prodynorphin-related neuropeptides in the cochlea. *Hear. Res.* 17: 47-50.
- Hollmann, M.; O'Shea-Greenfield, A.; Rogers, SW. and Heinemann, S. (1989): Cloning by functional expression of a member of glutamate family. *Nature* 342: 643-648.
- Holst, H.; Ingelstedt, S. and Örtengren, V. (1962): Eardrum movements following stimulation of middle ear muscles. *Acta Otolaryngol (Suppl).* 182: 73.
- Honrubia, V. and Ward, PH. (1969): Properties of the summing potential of the guinea pig's cochlea. *J. Acoust. Soc. Am.* 45: 1443-1450.
- Housley, GD. and Ashmore, JF. (1991): Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc. R. Soc.*

- Lond. (Biol) 244: 161-167.
- Howard, J. and Hudspeth, AJ. (1988): Compliance of the hair bundle associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron*. 1: 189-199.
- Hudspeth, AJ. (1982): Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells. *J. Neurosci*. 2: 1-10.
- Hudspeth, AJ. (1985): The cellular basis of hearing: The biophysics of hair cells. *Science*, 230: 187-215.
- Hudspeth, AJ. (1989): How the ear's works work. *Nature*. 341: 397-404.
- Hudspeth, AJ. and Corey, DP. (1977): Sensitivity, polarity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 2407-2411.
- Hughes, J.; Smith, TW.; Kosterlitz, MW.; Fothergill, LA.; Morgan, BA. and Morris, HR. (1975): Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature Lond*. 258: 577-579.
- Hulcrantz, E.; Nuttall, AL.; Brown, MC. and Lawrence, M. (1982): The effect of cervical sympathectomy on cochlear electrophysiology. *Acta Oto-laryngol* 94: 439-444.
- Ikonomidou, C.; Mosinger, JL.; Shahid Sales, K.; Labruyere, J. and Olney, JW. (1989): Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *J. Neurosci*. 9: 2809-2818.
- Imperato, A.; Tanda, G.; Frau, R. and Di Chiara, G. (1988): Pharmacological profile of dopamine receptor agonist as studied by brain dialysis in behaving rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 245. N° 1.: 257-264.
- Iurato, S. (1962): Efferent fibers to the sensory cells of Corti's organ. *Exp. Cell. Res*. 27: 162-163.
- Iversen, LL. (1994): MK-801 (Dizocilpine Maleate) NMDA Receptor Antagonist. *Neurotransmission. RBI*. Vol. X. N° 1.
- Jackson, DM.; Jenkins, OF. and Ross, SB. (1988): The motor effects of bromocriptine - a review. *Psychopharmacol*. 95: 433-446.
- Jackson, DM.; Ross, SB. and Edwards, SR. (1989): Dopamine D<sub>2</sub> agonist-induced behavioural depression is reversed by dopamine D<sub>1</sub> agonists. *J. Neural. Transm*. 75: 213-220.
- Jackson, DM.; Martin, LP.; Larsson, L-G.; Cox, RF.; Waszczak, BL. and Ross, SB. (1990): Behavioural, biochemical and electrophysiological studies on the motor depressant and stimulant effects of bromocriptine. *Arch. Pharmacol*. 342: 290-299.

- Janaky, R.; Saransaari, O. and Oja, SS. (1993): Release of GABA from rat hippocampal slices: involvement of quisqualate/N-Methyl-D-Aspartate-gated ionophores and extracellular magnesium. *Neurosci.* 53(3): 779-785.
- Janssen, R. (1991): Glutamate neurotoxicity in the rat cochlea is antagonized by kinurenic acid and MK-801. (Abstract). *Proc. Annu. Meet. Assoc. Res. Otolaryngol.* 14<sup>th</sup> St. Petersburg Beach, FL. Pag. 127.
- Janssen, R.; Schweitzer, L. and Jensen KF. (1991): Glutamate neurotoxicity in the developing rat cochlea. physiological and morphological approaches. *Brain. Res.* 552: 255-264.
- Jenison, GL.; Bobbin, RP. and Thalmann, R. (1985): Potassium-induced release of endogenous amino acids in the guinea pig cochlea. *J. Neurochem.* 44: 1845-1853.
- Jenison, GL; Winbery, S and Bobbin, RP.(1986): Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acid agonists, on guinea-pig cochlear potentials. *Comp. Biochem. Physiol.* 84 C: 385-389.
- Jerger, H. (1970): Clinical experience with impedance audiometry. *Arch. Otolaryngol.* 92: 311-324.
- Jewet, DL.; Roman, MN. and Willinston, JS. (1970): Human auditory evoked potentials: Possible brainstem components detected on the scalps. *Science* 167: 1517-1518.
- Jiménez-Ferreres, L. (1996): Efecto protector de dos benzodiazepinas, clonazepam y flunitrazepam, frente a la hipoacusia neurosensorial inducida experimentalmente por el ácido kaínico en la rata. Tesis doctoral.
- Johnstone, BM. and Boyle, AJF. (1967): Basilar membrane vibration examined with the Mössbauer technique. *Science.* 158: 389.
- Jones, N.; Fex, J. and Altschuler, RA. (1987): Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti. *Hear. Res.* 30: 33-38.
- Juiz, JM.; Rueda, J. and Merchán, JA (1988): Reversible damage to the nerve fibers in the organ of Corti after surgical opening of the cochlea in the rat. *Act. Otolaryngol. (Stock).* 106: 29-33
- Juiz, JM.; Rueda, J.; Merchán, JA., and Sala, ML. (1989): The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear. Res.* 40: 65-74.
- Kabebian, JW. and Calne, DB. (1979): Multiple receptors of dopamine. *Nature.* 277: 93-96.
- Takehata, S.; Nakagawa, T.; Takasaka, T. and Akaike, N. (1993): Cellular mechanism of acetyl-choline-induced response in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *J. Physiol. (Lond.)* 463: 227-234.
- Kanterman, RY.; Mahan, LC.; Briley, EM.; Monsma, FJ. and Sibley, DR. (1991):

- Transfected D<sub>2</sub> dopamine receptors mediate the potentiation of arachidonic acid release in chinese hamster ovary cells. *Mol. Pharmacol.* 39: 364-369.
- Karadaghy, AA.; Lasak, JM.; Chomchai, JS.; Khan, KM.; Drescher, MJ. and Drescher, DG. (1997): Quantitative analysis of dopamine receptor messages in the mouse cochlea. *Mol. Brain Res.* 44:151-156.
- Kauppinen, RA.; McMahon, HT. and Nicholls, DG. (1988): Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: Possible relevance to hypoglycaemia and anoxia. *Neurosci.* 27: 175-182.
- Keinanen, K.; Winsden, W.; Sommer, B.; Werner, P.; Herb, A.; Verdoorn, TA.; Sakman, P. and Seeburg, PH. (1990): A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science.* 249: 556-560.
- Keithley, EM. and Feldman, ML. (1982): Hair cell counts in an age-graded series of rat cochleas. *Hear-Res.* 8: 249-269.
- Kelly, JB. and Masterton, B. (1977): Auditory sensitivity of the albino rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91: 930-936.
- Kemp, DT. (1978): Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J. Acoust. Soc. Am.* 64: 1386-1391.
- Kiang, NYS.; Rho, JM.; Northrop, CC.; Liberman, MC. and Ryugo, DK. (1982): Hair cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science.* 217: 175-177.
- Kimura, RS. (1975): The ultrastructure of the organ of Corti. *Int. Rev. Cytol.* 42: 173-222.
- Kimura, RS. and Wersall, J. (1962): Termination of the olivo-cochlear bundle in relation to the outer hair cells of the organ of Corti in guinea pig. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 55: 11-32.
- Kirikae, I. (1959): An experimental study of the fundamental mechanism of bone conduction. *Acta Otolaryngol (suppl)* 145: 1.
- Kitojiri, M.; Yamashita, T.; Tohyama, Y.; Kumazawa, T.; Takeda, N. y cols. (1985): Localization of calcitonin gene-related peptide in the organ of Corti of the rat: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 358: 541-554.
- Klinke, R. (1981): Neurotransmitters in the cochlea and the cochlear nucleus. *Acta Otolaryngol.* 91: 541-554.
- Klinke, R. and Galley, N.(1974): Efferent innervation of vestibular and auditory receptors. *Physiol. Rev.* 54: 316-357.
- Klinke, R. and Oertel, W. (1977): Amino acid-putative afferent transmitter in the cochlea?. *Exp. Brain Res.* 30: 145-148.
- Kochhar, A.; Zivin, JA.; Lyden, PD and Mazarella, V. (1988): Glutamate antagonist

- therapy reduces neurologic deficits produced by focal central nervous system ischemia. *Arch. Neurol.* 45: 148-153.
- Konishi, T. (1972): Action of tubocurarine and atropine on crossed olivocochlear bundles. *Acta Oto-laryngol.* 74: 252-264.
- Konishi, T. and Hamrick, PE. (1978): Ion transport in the cochlea of guinea pig. I: Potassium and sodium transport. *Acta Otolaryngol. (Stockh).* 86: 22-34.
- Konishi, T.; Butler, RA. and Fernández, C. (1961): Effects of anoxia on cochlear potentials. *J. Acous. Soc. Am.* 33: 349.
- Kosterlitz, HW. (1985): Opioid peptides and their receptors. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 225: 27-40.
- Kronester-Frei, A. (1979): The effect of changes in endolymphatic ion concentrations on the tectorial membrane. *Hear. Res.* 1: 81-94.
- Kujawa, SG.; Glatke, TJ.; Fallon, M. and Bobbin, RP. (1993): Contralateral sound suppresses distortion product otoacoustic emissions through cholinergic mechanisms. *Hearing Res.* 68: 97-106.
- Kumar, AM.; Kumar, M.; Deepika, K. et al. (1990): *Life Sci.* 47: 1751-1759.
- Kuriyama, H.; Albin, RL. and Altschuler, RA. (1993): Expression of NMDA-receptor messenger RNA in the rat cochlea. *Hearing Res.* 69: 215-220.
- Kuriyama, H.; Shiosaka, S.; Sekitani, M.; Tohyama, Y.; Kitajiri, M.; Yamashita, T.; Kumazawa, T. and Tohyama, M. (1990): Electron microscopic observation of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the organ of Corti of the rat. *Brain. Res.* 517: 76-80.
- Kusakari, J; Arakawa, E.; Rokugo, M; Ohyama, K. and Inamura, M.(1984): Effect of kainic acid upon N<sub>1</sub> latency. *Laryngoscope.* 94: 1365-1369.
- Leake-Jones, P. and Snyder, RL. (1982): Uptake and transport of horseradish peroxidase by cochlear spiral ganglion neurons. *Hearing Res.* 8: 199-223.
- Lefebvre, PP.; Weber, T.; Leprince, P.; Rigo, J-M; Delrée, P.; Rogister, B. and Moonen, G. (1991): Kainate and NMDA toxicity for cultured developing and adult rat spiral ganglion neurons: further evidence for a glutamatergic excitatory neurotransmission at the inner hair cell synapse. *Brain Res.* 555: 75-83.
- Lenoir, M.; Bock, GR. and Pujol. R. (1979): Supra-normal susceptibility to acoustic trauma of the rat pup cochlea. *J. Physiol.* 75: 521-524.
- Lenoir, M. and Pujol, R. (1980): Sensitive period to acoustic trauma in the rat pup cochlea. *Histological findings. Acta Otolaryngol. (Stockh.).* 405: 1-16.
- Lenoir, M.; Shnerson, A. and Pujol, R. (1980): Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat. Embryol.* 160: 253-263.
- Lepage, EL. (1989): Funcional role of the olivo-cochlear bundle: a motor unit control

- system in the mammalian cochlea. *Hear. Res.* 38: 177-189.
- Liberman, MC (1980-a): Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear. Res.* 3: 45-63.
- Liberman, M.C. (1980-b): Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: an electronmicroscopic study of serial sections. *Hear. Res.* 3: 189-204.
- Liberman, MC. (1982-a): Single-neuron labelling in the cat auditory nerve. *Science.* 216: 1239-1241.
- Liberman, MC. (1982-b): The cochlear frequency map for the cat: Labelling auditory-nerve fibers to known characteristic frequency. *J.Acoust. Soc. Am.* 72: 1441-1449.
- Liberman, MC. and Brown, MC. (1986): Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hearing Res.* 24: 17-36.
- Liberman, MC. and Oliver, ME. (1984): Morphometry of intracellularly labeled neurons of the auditory nerve: Correlation with functional properties. *J. Comp. Neurol.* 223: 163-176.
- Liberman, MC.; Dodds, MV. and Pierce, S. (1990): Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: Quantitative analysis with light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 223: 163-176.
- Lim, DJ. (1986): Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear. Res.* 22: 117.
- Littman, T.; Bobbin, RP.; Fallon, M. and Puel, J-L. (1989) The quinoxalinediones DNQX, CNQX and two related congeners suppress hair cell-to-auditory nerve transmission. *Hear. Res.* 40: 45-54.
- Loh, HH. and Smith, AP. (1990): Molecular characterization of opioid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 123-147.
- López-Barneo, J. (1992): Fundamentos de neurofisiología celular. Membrana y permeabilidad iónica. Excitación y conducción. En: *Fisiología Humana*. JAF. Tresguerres. Ed. McGraw Hill-Interamericana. Madrid. Pag. 23-40.
- López-Moya, JJ. (1992): Potenciales evocados auditivos. Introducción a su conocimiento y valoración clínica. Ed. *Ciencia 3*. Madrid.
- Lorente de No, R.(1933): Anatomy of the eighth nerve. III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope.* 43: 327-350. St Louis.
- Luhmann, HJ. and Prince DA. (1990): Control of NMDA receptor-mediated activity by GABAergic mechanism in mature and developing rat neocortex. *Dev. Brain Res.* 54: 287-290.
- Lucas, DR. and Newhouse, JP. (1957): The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.

- Lüscher, E. (1929): Die Funktion des Musculus Stapedius beim Menschen. *Z. Hals. Nasen Ohrenheilkd.* 25: 105-132.
- MacDermott, AB.; Mayer, ML.; Westbrook, GL.; Smith, SL. and Barker, JL. (1986): NMDA receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321: 519-522.
- Mania-Farnell, BL.; Farbman, AI. and Bruch, RC. (1993): Bromocriptine, a dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist, inhibits adenylyl cyclase activity in rat olfactory epithelium. *Neurosci.* Vol. 57. N° 1. Pag. 173-180.
- Mahan, LC.; Burch, RM.; Monsma, FJ. Jr. and Sibley, DR. (1990): Expression of striatae D<sub>1</sub> dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca<sup>+2</sup> mobilization in *Xenopus*, Oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2196-2200.
- Maragos, WF.; Greenamyre, JT.; Penney, JB. and Young AB. (1987): Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci.* 10: 65-68.
- Mast, JE. (1965): Short latency human evoked responses to clicks. *J. Appl. Physiol.* 20: 725-730.
- Matsunaga, T.; Doi, K.; Takeda, N.; Mori, N. and Tohyama, Y. (1986): Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on compound action potential of the auditory nerve of guinea pigs (Abstract). *Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum. Hakone. Japan.* Pag. 30.
- Mattingly, BA.; Rowlett, JK. and Lovell, G. (1993): Effects of SKF 38393, quinpirole, and SCH 23390 treatments on locomotor activity and subsequent sensitivity to apomorphine. *Psychopharmacol.* 110: 320-326.
- Mayer, ML.; Westbrook, GL. (1987): Cellular mechanism underlying excitotoxicity. *Trends Neurosci.* 10: 59-71.
- Meldrum, B. (1985): Excitatory amino acids and anoxic/ischaemic brain damage. *Trends Neurosci.* 8: 47-48.
- Mendel, MI. and Goldstein, R.: Stability of early components of the averaged electroencephalic response. *J. Speech. and Hearing Res.* 12: 351-361.
- Merchán, MA.; Merchán, JA. and Ludeña, MD. (1980): Morphology of Hensen's cells. *J. Anat.* 131: 519-523.
- Merchán-Pérez, A.; Gil-Loyzaga, P. and Eybalin, M. (1990-a): Immunocytochemical detection of calcitonin gene-related peptide in the postnatal developing rat cochlea. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8: 603-612.
- Merchán-Pérez, A.; Gil-Loyzaga, P. and Eybalin, M. (1990-b): Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat cochlea. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8: 613-620.
- Merchán-Pérez, A.; Gil-Loyzaga, P. and Eybalin, M. (1990-c): Ontogeny of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid immunoreactivities in the rat

- cochlea. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 248/1: 4-7.
- Merchán-Pérez, A.; Gil-Loyzaga, P.; López-Sanchez, J.; Eybalin, M. and Valderrama, FJ. (1993): Ontogeny of  $\gamma$ -aminobutyric acid in efferent fibers to the rat cochlea. *Dev. Brain Res.* 76: 33-41.
- Merchán-Pérez, A.; Gil-Loyzaga, P.; Eybalin, M.; Fernández-Mateos, P. and Bartolomé, MV. (1994): Choline-acetyltransferase-like immunoreactivity in the organ of Corti of the rat during postnatal development. *Dev. Brain Res.* 82: 29-34.
- Miller, RJ. (1984): How do opiates act?. *Trends Neurosci.* 7: 184-185.
- Misrahy, FA.; Shinabarger, EW. and Arnold, JE. (1958): Changes in cochlear endolymphatic oxygen availability, action potential and microphonics during and following asphyxia, hypoxia and exposure to loud sounds. *J. Acoust. Soc. Am.* 30: 701-704.
- Möller, AR: (1961): Bilateral contraction of the tympanic muscles in man, examined by measuring acoustic impedance changes. *Ann. Otol.*, 70: 735-753.
- Möller, AR.; Janetta, P. and Möller, MB. (1981): Neural generators of brainstem evoked potentials results from human intracranial recording. *Ann. Otol.* 90: 591-596.
- Murray, AM: and Waddington, JL. (1989): The induction of grooming and vacuous chewing by a series of selective D1 dopamine receptor agonists: two directions of D<sub>1</sub>: D<sub>2</sub> interaction. *Eur. J Pharmacol.* 160: 377-384.
- Nadol Jr, JB. (1981): Reciprocal synapses at the base of outer hair cells in the organ of Corti in man. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 90: 12-17.
- Nadol Jr, JB. (1983-a): Serial section reconstruction of the neural poles of hair cells in the human organ of Corti. I. Inner hair cells. *Laryngoscope.* 93: 599-614.
- Nadol Jr, JB. (1983-b): Serial section reconstruction of the neural poles of hair cells in the human organ of Corti. II. Outer hair cells. *Laryngoscope*, 93: 780-791.
- Nadol Jr, JB. (1984): Incidence of reciprocal synapse on outer hair cells of the human organ of Corti. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 93: 247-250.
- Nadol Jr, JB. and Burgess, B. (1985): A study of postmortem autolysis in the human organ of Corti. *J. Comp. Neurol.* 237: 333-342.
- Nakanishi, S. and Masu, M. (1994): Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 319-348.
- Niedzielski, AS. and Wenthold, RJ. (1995): Expression of AMPA, kainate and NMDA receptors subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J. Neurosci.* 15: 2338-2353.
- Nomura, Y. (1976): Nerve fibers in the human organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* 82: 317-324.

- Nowak, R.; Dorn, A.; Bernstein, HG.; Scholtz, HJ. and Koitschev, A. (1987): Distribution of some peptides in the guinea pig cochlea. An immunohistochemical study (Abstract). Proc. Annu. Meet. Assoc. Res. Otolaryngol. 10<sup>th</sup> Clearwater Beach FL. Pag. 149.
- Nuttall, AL. (1986): Physiology of Hair Cells. In: Neurobiology of Hearing: The Cochlea. Edited by Altschuler, Hoffman and Bobbin. Raven Press. New York.
- O'Boyle, KM. and Waddington, JL. (1989): New substituted 1-phenyl-3-benzazepine analogues of SKF 38393 and N-methyl-thienopyridine analogues of dihydroxynomifensine with selective affinity for the D<sub>1</sub> dopamine receptor in human post-mortem brain. Neuropharmacology. Vol. 26. N° 12. Pag. 1807-1810.
- O'Boyle, KM.; Gaitanopoulos, DE.; Brenner, M. and Waddington, JL. (1989): Agonist O'Boyle, KM.; Gaitanopoulos, DE.; Brenner, M. and Waddington, JL. (1989): Agonist and antagonist properties of benzazepine and thienopyridine derivatives at the D<sub>1</sub> dopamine receptor. Neuropharmacology. Vol. 28. N° 4. Pag. 401-405.
- Oestreicher, E.; Arnold, W.; Ehrenberger, K. and Felix, D. (1997): Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs. Hear. Res. 107: 46-52.
- Okamoto, A.; Tamura, T.; Yokoyama, K.; Kobayashi, N and Hasegawa, M. (1990): Effects of loud sound exposure on the cochlear blood flow. Acta Oto-laryngol. 109: 378-382.
- Olney, JW. (1978): Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: Kainic Acid as a Tool in Neurobiology. Ed. EG. McGeer. JW Olney. PL. McGeer. Pag. 95-171. New York. Raven.
- Olney, JW. and Sharpe, LG. (1969): Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium-glutamate. Science 166: 386-388.
- Olney, JW.; Price, MT.; Samson, L. and Labruyere, J. (1986): The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. Neurosci. Lett. 65: 65-71.
- Olney, JW.; Ikonomidou, C.; Mosinger, JL. and Frierdrich, G. (1989): MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain. J. Neurosci. 9: 1701-1704.
- Otte, J.; Schuknecht, HF. and Kerr, AG. (1978): Ganglion cell population in normal and pathological human cochlea. Implications for cochlear inplantation. Laryngoscope. Vol. 88: 1231.
- Palermo-Neto, J. and Dorce, VAC. (1990): Influences of estrogen and/or progesterone on some dopamine related bahavior in rats. Gen. Pharmacol. 21: 83-87.
- Palomar-García, V. (1992): Fisiología del oído externo y medio. En: Otorrinolaringología. Abelló, P. y Traserra, J. Eds. Pag. 49-53.
- Pellegrini-Giampietro, DE.; Cherici, G.; Alesiani, M.; Carla, V. and Moroni, F. (1990): Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J. Neurosci. 10: 1035-1041.

- Pickles, JO. (1979): An investigation on sympathetic effects on hearing. *Acta Otolaryngol.* 87: 69-71.
- Pickles, JO. (1985): Recent advances in cochlear physiology. *Prog. Neurobiol.* 24: 1-42.
- Pickles, JO. (1988): An introduction to the Physiology of Hearing. Academic Press. Pag. 1-367.
- Pickles, JO. and Corey, DP. (1992): Mechanoelectrical transduction by hair cells. *TINS.* Vol 15. N° 7: 254-259.
- Pickles, JO.; Comis, SD. and Osborne, MP. (1984): *Hear. Res.* 15: 103-112.
- Plasse, HM.; Spencer, FC.; Mittleman, M. and Frost, JO. (1980): Unilateral sudden loss of hearing: an unusual complication of cardiac. *J-Thorac-Cardiovasc-Surg.* 79: 822-826.
- Plinkert, PK.; Möhler, H. and Zenner, HP. (1989): A subpopulation of outer hair cells possessing GABA receptors with tonotopic organization. *Arch. Oto-rhinolaryngol.* 246: 417-422.
- Plinkert, PK.; Zenner, HP. and Heilbronn, E. (1991): A nicotinic acetylcholine receptor-like  $\alpha$ -bungarotoxin-binding site on outer hair cells. *Hear. Res.* 53: 123-130.
- Porter, JT. and McCarthy, KD. (1995): GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands increases in  $Ca^{2+}$ . *Glia.* 13: 101-112.
- Prazma, J. (1975): Electroanatomy of the lateral wall of the cochlea. *Arch Otorhinolaryngol.* 209: 1-13.
- Price, GR. (1976): Age as factor in susceptibility to hearing loss: young versus old rats. *J. Acoust. Soc. Am.* 60: 886-892.
- Prieto, J.; Merchán, J.; Gil-Loyzaga, P. and Rueda, J. (1986): Subsurface material in outer hair cells of the cochlea. *Hear. Res.* 21: 277-280.
- Puel, J-L. (1995): Chemical Synaptic Transmission in the Cochlea. *Prog. Neurobiol.* 47: 449-476.
- Puel J-L and Pujol, R. (1992): Selective glutamate antagonist block the excitotoxicity caused by either glutamate agonist or by ischemia. *Advances in Biosciences: Auditory Physiology and Perception.* Ed. Pergamon. UK. Vol. 83: 589-598.
- Puel J-L and Pujol, R. (1993): Recent advances in cochlear neurobiology: Cochlear efferents and acoustic trauma. In: *Noise and Man.* Vallet, M. Eds. INRETS. Actes N° 34: 136-145.
- Puel, J-L.; Bobbin, RP. and Fallon, M. (1989): Suppression of auditory nerve activity in the guinea pig cochlea by 1-(p-bromobenzoyl)-piperazine-2,3-dicarboxylic acid. *Brain Res.* 487: 9-15.
- Puel, J-L.; Gervais d'Aldin, C.; Pujol, R.; Ladrech, S. and Eybalin, M. (1992):

- Electrophysiological effect of a dopaminergic D<sub>2</sub> agonist (piribedil) in the guinea pig cochlea (Abstract). 29<sup>th</sup> Proc. Workshop Inner Ear Biol. Engelberg, Switzerland. Pag. 57.
- Puel, J-L.; Gervais d'Aldin, C.; Saffiedine, S.; Eybalin, M. and Pujol, R (1995): Neural regeneration and recovery in the cochlea after excitotoxic injury. In: *Advances in Hearing Research*. Eds. Manley, Klump, Köppl, Fastl and Oeckinghaus. World Scientific, Singapore. Pag. 63-72.
- Puel, J-L.; Gervais d'Aldin, C.; Ruel, J.; Ladrech, S. and Pujol, R (1997): Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 117: 1-5.
- Puel, J-L.; Pujol, R.; Ladrech, S. and Eybalin, M. (1991):  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) electrophysiological and neurotoxic effects in the guinea-pig cochlea. *Neuroscience*. 45: 63-72.
- Puel, J-L.; Pujol, R.; Tribillac, F; Ladrech, S. and Eybalin, M. (1994): Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity. *J. Comp. Neurol.* 341: 241-256.
- Pujol, R. (1985): Morphology, synaptology and electrophysiology of developing auditory periphery. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 421: 5-9.
- Pujol, R. (1989): Anatomie et physiologie de la cochlée. *Arch. Internat. Physiol. Bioch.* 97: 51-78.
- Pujol, R. (1990): Cochlear physiology and pathophysiology: Recent data. *Drugs of today*. 26 (suppl. 13): 43-57.
- Pujol, R. (1991): Sensitive developmental period and acoustic trauma: Facts and hypotheses. In: *Dancer AI; Henderson, D; Salvi, RJ; Hamernik, RP Eds. Noise-Induced Hearing Loss*. St. Louis, MO. Mosby Year Book. Pag. 196-203.
- Pujol, R. (1994): Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. *British J. Audiology* 28: 185-191.
- Pujol, R. and Lenoir, M. (1986): The four types of synapses in the organ of Corti. In: *Neurobiology of Hearing: The Cochlea*. Pag. 161-172. Raven Press. New York.
- Pujol, R., and Sans, A. (1986): Synaptogenesis in the cochlear and vestibular receptors. *Advances in Neural and Behavioral Development*. Pag. 1-18. Ablex Press, Nordwood, N.J.
- Pujol, R.; Carlier, E and Devigne, C. (1979): Significance of presynaptic formations in the very early stages of cochlear synaptogenesis. *Neurosci. Lett.* 15: 995-1007.
- Pujol, R.; Puel, J-L. and Eybalin, M (1992-b): Implication of non-NMDA and NMDA receptors in cochlear ischemia. *NeuroReport*. 3: 299-302.
- Pujol, R.; Gervais d'Aldin, C.; Eybalin, M.; Tribillac, F. and Puel, J-L. (1992-a): Effect

- of a dopaminergic D<sub>2</sub> agonist (piribedil) upon ischemia-induced neurotoxicity in the guinea pig cochlea (Abstract). 29<sup>th</sup> Proc. Workshop Inner Ear Biology. Pag. 58.
- Pujol, R.; Lenoir, M.; Robertson, D.; Eybalin, M. and Johnstone, BM. (1985): Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. *Hear. Res.* 18: 145-151.
- Pujol, R.; Puel, J-L.; Gervais d'Aldin, C. and Eybalin, M. (1993): Pathophysiology of glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 113: 330-334.
- Pujol, R.; Rebillard, G.; Puel, J-L.; Lenoir, M.; Eybalin, M and Recasens, M. (1991): Glutamate neurotoxicity in the cochlea: a possible consequence of ischaemic or anoxic conditions occurring in ageing. *Acta Otolaryngol.(suppl.)* 476: 32-36.
- Pussard, E.; Guigueneo, N.; Adam, O. and Giudicelli JF. (1996): *Clin. Chem.* 42: 1086-1091.
- Quirk, WS.; Shapiro, BD.; Miller, JM. and Nuttall, AL. (1991): Noise-induced changes in red blood cell velocity in lateral wall vessels of the rat cochlea. *Hear Res.* 52 (1): 217-223.
- Rasmussen, AT. (1940): Studies on the VIII<sup>th</sup> cranial nerve in man. *Laryngoscope.* 50: 67.
- Rasmussen, GL. (1942): An efferent cochlear bundle, abstracted. *Anat. Rec.* 82: 441.
- Rasmussen, GL. (1946): The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 84: 141-219.
- Rasmussen, GL. (1960): Efferent fibers in the cochlear nerve and cochlear nucleus. In: *Neural Mechanisms of the Auditory and vestibular Systems.* Pag. 105-115. Springfield, IL.
- Rebillard, G. and Bryant, GM. (1989): Effects of in vivo perfusion of glutamate dehydrogenase in the guinea pig cochlea on the VIIIth nerve compound action potential. *Brain Res.* 494: 379-382.
- Rehm, H.; Wiedenmann, B. and Betz, H. (1986): Molecular Characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO. J.* 5: 535-541.
- Reken, U. (1977): Normal values of the ipsilateral acoustic stapedius reflex threshold. *Arch. Otol. Rhinol. Laryngol.* 215: 25-34.
- Rhode, WS. (1971): Observations of the vibration of the basilar membrane in squirrel monkeys using the mössbauer technique. *J. Acoust. Soc. Am.* 49: 1218-1231.
- Richardson, GP.; Russell, IJ.; Dvance, VC.; Bailey, AJ. (1987): Polypeptide composition of the mammalian tectorial membrane. *Hear. Res.* 25: 45-60.
- Richrath, W.; Kraus, K. and Fromme, HG. (1974): Lokalization von <sup>3</sup>H-γ-

- Aminobuttersäure in der Cochlea. Licht und elektronenoptische Autoradiographie. *Arch.Oto-rhino-laryngol.* 208: 283-293.
- Robertson, D. (1984): Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion. *Hear. Res.* 15: 113-121.
- Robertson, D. and Gummer, M. (1985): Physiological and morphological characterization of efferent neurones in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 20: 63-77.
- Robertson, D.; Anderson, C.J. and Cole, K.S. (1987): Segregation of efferent projections to different turns of the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 25: 69-76.
- Rosenfeld, M.G.; Mermod, J.J.; Amara, S.G.; Swanson, L.W.; Sawchenko, P.E.; Rivier, J.; Vale, W.W. and Evans, R.M. (1983): Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature Lond.* 324: 129-135.
- Rossi, G. y Cortesina, G. (1962): Il sistema efferente colinergico cócleo vestibulare. *Minerva Otorinolaring.* 12: 173.
- Rothman, S.M. (1985): The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* 5: 1483-1489.
- Russell, I.J. (1987): The physiology of the organ of Corti. *British Medical Bulletin* Vol. 43 N° 4.
- Russell, I.J. and Sellick, P.M. (1978): Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J. Physiol. Lond.* 284: 261-290.
- Russell, I.J. and Sellick, P.M. (1983): Low frequency characteristics of intracellularly recorded receptor potentials in guinea pig cochlear hair cells. *J. Physiol. Lond.* 338: 179-206.
- Ryan, A.F. and Schwartz, I.R. (1984): Preferential glutamine up-take by cochlear hair cells: implications for the afferent cochlear transmitter. *Brain Res.* 290: 376-379.
- Sabater-Mata, F. (1992): Anatomía del oído externo. En: *Otorrinolaringología*. P. Abelló y J. Traserra. Ed. Doyma. Barcelona. Pp: 15-16.
- Safieddine, S. and Eybalin, M. (1992): Co-expression of NMDA and AMPA/kainate receptors mRNAs in cochlear neurons. *NeuroReport* 3: 1145-1148.
- Safieddine, S. and Eybalin, M. (1992-a): Coexistence of efferent neurotransmitters. Immunocytochemical and in situ hybridization studies. *Proc. Symp. Mol. Biol. Hearing and Deafness. La Jolla. CA.* Pag. 7.
- Safieddine, S. and Eybalin, M. (1992-b): Immunocytochemical and in situ hybridization studies of the coexistence of efferent cochlear neurotransmitters (Abstract). *Proc. Workshop Inner Ear Biol. 29<sup>th</sup> Engelberg.* Pag. 114.

- Safieddine, S. and Eybalin, M. (1994): Expression of neurotransmitter receptors mRNAs in rat and guinea pig auditory system. Abstr. 59<sup>th</sup> Assoc. Res. Otolaryngol. St Petersburg Beach, FL.
- Sahley, TR.; Kalish, RB.; Musiek, FE. and Hoffman, DW. (1991): Effects of opioid be drugs on auditory evoked potentials suggest a role of lateral olivocochlear dynorphins in auditory function. *Hear. Res.* 55: 133-142.
- Sáinz, M. y González, MV. (1992): Electrocoeleografía: Potenciales eléctricos cocleares, el potencial de acción. En: Potenciales Evocados somatosensoriales, visuales y auditivos. Ciges, Artieda, Sáinz, Stinge de Méndez. Granada. Pag. 387-399.
- Sáinz, M. y González, MV. (1992-a): Electrocoeleografía en la práctica clínica. En: Potenciales Evocados somatosensoriales, visuales y auditivos. Ciges, Artieda, Sáiz, Stinge de Méndez. Granada. Pag. 401-419.
- Sando, I. (1964): The anatomical interrelationships of the cochlear nerve fibers. *Acta Otolaryngol.* 59: 417.
- Sanjuán-Juaristi, J.(1998): Study of hearing in premature infants. Evoked cochlear microphonics. *Acta Otorrinolaringológica Española.* 49: 525-531.
- Sasaki, K. and Sato, M. (1987): A single GTP binding protein regulates K<sup>+</sup> channels coupled with dopamine, histamine and acetylcholine. *Nature* 325: 259-262.
- Sargent, PB. (1993): The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 403-443.
- Saunders, JC. and Hirsch, KA. (1976): Changes in cochlear microphonic sensitivity after priming C57 B1/6J mice at various ages for audiogenic seizures. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 90: 212-220.
- Sauvage, JP. et Vergnolles, Ph. (1992): Anatomie de l'oreille moyenne. En: *Encycl. Med. Chir. Oto-rhino-laryngologie.* 20015 A10. Pag. 18. Paris.
- Scheibe, F.; Haupt, H.; Nuttall, AL. and Ludwig, C. (1990): Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound presentation. *Eur. Arch. Oto-rhino-laryngol.* 247: 84-88.
- Schoenfeld, RI.; Neumeyer, JL.; Dafeldecker, W. and Roffler-Tarlov, S. (1975): Comparison of structural and stereoisomers of apomorphine on stereotyped sniffing behavior of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 30: 63-68.
- Schoepp, DD. and Johnson, BG. (1989): Excitatory amino acid agonist-antagonist interactions at 2-amino-4-phosphonobutiric acid sensitive quisqualate receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis in the slices of rat hippocampus. *J. Neurochem.* 50: 1605-1613.
- Schon, F. and Kelly, JS. (1974): Autoradiographic localization of [<sup>3</sup>H]-GABA and [<sup>3</sup>H] glutamate over satellite glial cells. *Brain Res.* 66: 275-288.

- Schousboe, A. (1981): Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int. Rev. Neurobiol.* 22: 1-45.
- Schuknecht, HF. (1965): Recent advances in the treatment of deafness. *Can-Med-Assoc-J.* 93: 1313-1315.
- Schuknecht, HF. (1989): Congenital aural atresia. *Laryngoscope.* 99: 908-917.
- Schuknecht, HF. and Gaceck, MR. (1993): Cochlear pathology in presbycusis. *Ann-Otol-Rhinol-Laryngol.* 102: 1-11.
- Schuknecht, HF.; Churchill, JA. and Doran, R. (1959): The localization of acetylcholinesterase in the cochlea. *Arch. Otolaryngol.* 69: 549-559.
- Schurr, A.; Rigor, BM. (1993): Kainate toxicity in energy compromised rat hippocampal slices: differences between oxygen and glucose deprivation. *Brain. Res.* 614: 10-14.
- Schwartz, IR. and Ryan, AF. (1986): Amino acid labeling patterns in the efferent innervation of the cochlea: an electron microscopic autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 246: 500-512.
- Sewell, WF. and Starr, PA. (1991): Effects of calcitonin gene related peptide and efferent nerve stimulation on afferent transmission in the lateral line organ. *J. Neurophysiol.* 65: 1158-1169.
- Shigemoto, T. and Ohmori, H. (1990): Muscarinic agonist and ATP increase the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in chick cochlear hair cells. *J. Physiol. Lond.* 420: 127-148.
- Show, EAG. (1974): The external ear. In: Keidel, WD., Neff WD (Eds) *Hand book of sensory physiology.* Vol 5, part 2. New York. Springer Verlag.
- Siegel, JH. and Kim, DO. (1982): Efferent control of cochlear mechanics?. Olivocochlear bundle affects cochlear biomechanical nonlinearity. *Hear. Res.* 6: 171-182.
- Simmons, DD. and Liberman, MC. (1988-a): Afferent innervation of outer hair cells in the adult cats: I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270: 132-144.
- Simmons, DD. and Liberman, MC. (1988-b): Afferent innervation of outer hair cells in the adult cats: II. Electron microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270: 145-154.
- Simonds, WF. (1988): The molecular basis of opioid receptor function. *Endocr. Rev.* 9: 200-212.
- Slepecky, N. (1997): Outer hair cell morphology related to function. *Ear Nose Throat J.* 76: 145-150.
- Sohmer, H. and Feinmesser, M. (1970): Cochlear and cortical audiometry conveniently

- recorded in the same subject. *Israel. J. Med. Science* 6: 219-223.
- Sohmer, H.; Feinmesser, M. and Szabo, G. (1974): Sources of electrocochleographic responses studies in patient with brain damage. *Electroencephalographic clinic. Neurophysiol.* 37: 663-669.
- Spalteholz, W. (1974): *Atlas de anatomía humana. Tomo II y III.* Ed. Labor. Barcelona.
- Spoendlin, H. (1969): The innervation patterns of the organ of Corti of the cat. *Acta Oto-laryngol.* 67: 239-254.
- Spoendlin, H. (1971): Degeneration behavior of the cochlear nerve. *Arch. Klin. Exp. Ohren-Nasen-Kehlkopfheilk.* 200: 275-291.
- Spoendlin, H. (1972): Innervation densities of the cochlea. *Acta Oto-laryngol.* 73: 235-248.
- Spoendlin, H. (1976): Anatomical changes following various noise exposures. In: Henderson, D; Hamernik, RP; Dosanjh, DS; Mills, JH Eds. *Effects of noise on hearing.* New York. Raven Press. Pag. 69-89.
- Spoendlin, H. (1979): Neural connections of the outer hair cell system. *Acta Oto-laryngol. (Stockh.).* 87: 381-387.
- Spoendlin, H. (1984): Primary neurons and synapses. In: *Ultrastructural atlas of the inner ear.* Butterworths. London. Britain. Pag. 133-164.
- Spoendlin, H. and Baumgartner, C: (1977): Electrocochleography and cochlear pathology. *Acta Oto-laryngol.* 83: 130-135.
- Spoendlin, H. and Lichtensteiger, W. (1966): The adrenergic innervation of the labyrinth. *Acta Oto-laryngol.* 61: 423-434.
- Spoendlin, H. and Lichtensteiger, W. (1967): The sympathetic nerve supply to the inner ear. *Arch. Klin. Exp. Ohren-Nasen-Kehlkopfheilk.* 189: 346-359.
- Spoendlin, H. and Schrott, A. (1988): The spiral ganglion and the innervation of the human organ of Corti. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 105: 403-410.
- Steel, KP. (1983): The tectorial membrane of mammals. *Hear. Res.* 9: 927-959.
- Steinhäuser, Ch. and Gallo, V. (1996): News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 19: 339-345.
- Stoof, JC. and Kabebian, JW. (1984): Two dopamine receptors: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Life Sci.* 35: 2281-2296.
- Tasaki, I. (1954): Nerve impulse in individual auditory nerve fibres of guinea pig. *J. Neurophysiol.* 17: 97-105.
- Terayama, Y.; Yamamoto, K. and Sakamoto, T. (1968): Electron microscopic observations on the postganglionic sympathetic fibers in the guinea pig cochlea. *Ann. Otol Rhinol Laryngol.* 77: 1152-1170.

- Thorne, PR. and Nuttall, AL. (1987): Laser Doppler measurement of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear.Res.* 27: 1-10.
- Todd, RD. and O'Malley, KL. (1993): Family Ties: The Dopamine D<sub>2</sub>-Like Receptor Genes. In: *Neurotransmissions. Research Biochemical International. One Strathmore Road, Natick, Massachusetts. USA.*
- Tonndorf, J. and Khana, JM. (1972): Tympanic membrane vibrations in human cadaver ears studied by timeaveraged holography. *J. Acoust. Soc. Amer.* 32: 1221-1223.
- Tonndorf, J.(1987): Física del Sonido. En: *Otología. Vol. 1. Paparella, MA. y Shumrick, DA. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid.*
- Tresguerres, JAF. (1993): Capítulo 5: Neurotransmisores y neuromoduladores. En: *Fisiología Humana. Pag. 63-86. Ed. Interamericana-McGraw-Hill.*
- Uddman, R.; Ekman, R.; Hakanson, R.; Skagerberg, G. and Sundler, F. (1985): Calcitonin gene-related peptide in the inner ear. In: *INSERM Symposium. Regulatory Peptides in Digestive, Nervous and Endocrine Systems. Edited by M.J.M. Lewin and S. Bonfils. Amsterdam. Vol. 25: 285-288.*
- Urban, GE-Jr. (1973): Reversible sensori-neural hearing loss associated with sickle cell crisis. *Laryngoscope.* 83: 633-638.
- Usami, S.; Igarashi, M. and Thompson, GC. (1988): Light and electron-microscopic study of  $\gamma$ -aminobutyric-acid-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti. *ORL Basel.* 50: 162-169.
- Uziel, A. (1985): El oído externo y el oído medio. En: *Fisiología Neurosensorial en ORL. Ed. Masson SA. París. Pag. 66-74.*
- Vallar, L. and Meldolesi, J. (1989): Mechanism of signal transduction at the dopamine D<sub>2</sub> receptor. *Trends. Pharmacol. Sci.* 10: 74-77.
- Vicente-Torres, MA.; Gil-Loyzaga, P.; Fernández, P.; Arce, A. and Esquifino, A. (1993): Piribedil could modify dopamine turn-over in cochleas under noise stimulation. *ORL and Its Related Specialities.* 55: 322-325.
- Vicente-Torres, MA.; Gil-Loyzaga, P.; Bartolomé, MV. et al. (1996): 33<sup>rd</sup> Workshop on Inner Ear Biology. *Utrech. The Netherlands. Pag. 119.*
- Vicente-Torres, MA.; Bartolomé, MV.; Carricondo, F.; Esquifino, A. and Gil-Loyzaga, P. (1998): HPLC detection of serotonin within the rat cochlea. *NeuroReport* 9: 3699-3701.
- Walters, JR.; Bergstrom, DA.; Carlson, JH.; Chase, TN. and Brann, AR. (1987): D<sub>1</sub> dopamine receptor activation required for postsynaptic expression of D<sub>2</sub> agonist effects. *Science* 236: 719-722.
- Warr, WB. (1975): Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brainstem: their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J. Comp. Neurol.* 161: 159-

182.

- Warr, WB. (1992): Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. In: *The Anatomy of Mammalian Auditory Pathways. Vol. 1. The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy.* Pag. 197-214. Eds. Webster, Popper and Fay. Little, Brown and Co: Boston.
- Warr, WB. and Guinan Jr, JJ. (1979): Efferent innervation of the organ of Corti: two separate systems. *Brain Res.* 173: 152-155.
- Weber, EG. and Bray, CV. (1930): The nature of acoustic responses: The relations between sound frequency and frequency of impulses in the auditory nerve. *J. Exp. Psychol.* 13: 373-387.
- Wentholt, RJ.; Hoffman, DN. and Altschuler, RA. (1968): Neurotransmitters of the cochlea and cochlear nucleus: Immunocytochemical evidence. *Am. J. Otolaryngol.* 7: 100-106.
- Wickesberg, RE. and Oertel, D. (1989): Auditory nerve neurotransmitter acts on a kainate receptor: evidence from intracellular recordings in brain slices from mice. *Brain Res.* 486: 39-48.
- Wiederhold, ML. (1986): Physiology of the olivocochlear system. *Neurobiology of Hearing: The cochlea.* New York: Raven Press. Pag. 349-370.
- Whitlon, DS. and Sobkowicz, HM. (1989): GABA-like immunoreactivity in the cochlea of the developing mouse. *J. Neurocytol.* 18: 505-518.
- Wilson, JP. (1973): A subminiature capacitive probe for vibration measurements of the basilar membrane. *J. Sound Vib.* 30: 483.
- Wojcik, WJ. and Neff, NH. (1983):  $\gamma$ -Aminobutyric acid B receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in brain, and in the cerebellum these receptors may be associated with granule cells. *Mol. Pharmacol.* 25: 24-28.
- Ylikoski, J.; Pirvola, U.; Häppölä, O; Panula, P and Virtanen, I. (1989): Immunohistochemical demonstration of neuroactive substances in the inner ear of rat and guinea pig. *Acta Oto-laryngol.* 107: 417-423.
- Young, AB. and Fagg, GE. (1990): Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* Vol. 11: 126-133.
- Yudkoff, M.; Nissim, Y. and Pleasure, D. (1988): Astrocyte metabolism of [ $^{15}$ N]-glutamine: implications for the glutamine-glutamate cycle. *J. Neurochem.* 51: 843-850.
- Zenner, H-P.; Zimmermann, U. and Schmitt, U. (1985): Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear. Res.* 18: 127-133.
- Zetterström T. and Ungerstedt, U. (1984): Effects of apomorphine on the in vivo release of dopamine and its metabolites, studied by brain dialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 97:

29-36.

Zwislocki, JJ. (1975): The role of the external and middle ear in sound transmission. The nervous system (Vol. 3). Human communication and its disorders. Tower DB.; Ed. Raven Press. New York.

Zwislocki, JJ. (1986): Analysis of the cochlear mechanics. *Hear. Res.* 22: 155-169.