

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID



**NEUROTOXICIDAD
INDUCIDA POR GLUTAMATO
MONOSODICO EN LA
COCLEA DE LA RATA EN
DESARROLLO**

FERNANDO SIMON LUIS

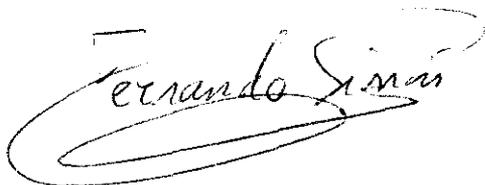
Madrid, Junio de 1995

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID

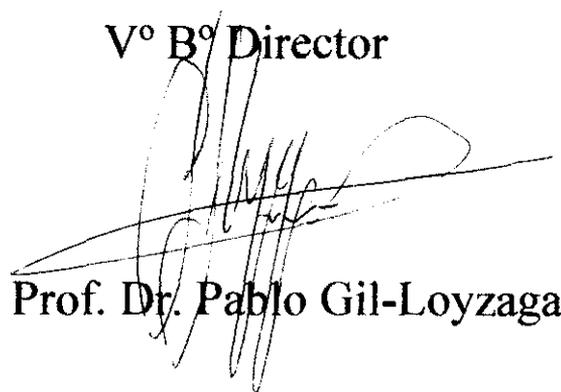
**NEUROTOXICIDAD
INDUCIDA POR GLUTAMATO
MONOSÓDICO EN LA
COCLEA DE LA RATA EN
DESARROLLO**

**Memoria presentada por FERNANDO SIMÓN
LUIS para la obtención del grado de doctor**

Fernando Simón Luis



Vº Bº Director



Prof. Dr. Pablo Gil-Loyzaga

Madrid, Junio de 1995

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han intervenido de alguna forma en la realización de este trabajo en el marco del equipo de investigación en Neurobiología Sensorial y Audiología del Centro de Cultivos Celulares (CAI-UCM) y Departamento de Cirugía II (Otorrinolaringología). Al Prof. Dr. Pablo Gil-Loyzaga; a las Dras. M^a Angeles Ibáñez Olías, M^a Visitación Bartolomé Pascual, M^a José Hernández-Ortíz y Pilar Fernández-Mateos; a los Drs. Angel Merchán-Pérez, Manuel Remezal Solano y José Gabriel López-Sánchez; a las licenciadas Alicia Rodríguez Ramos, M^a Angeles Vicente Torres, Mar Lasso de la Vega, Esther Hernández-Martínez, Pilar López, M^a José Gimeno Longas, Esther Tapia Corrales y Belén Ruíz; a los licenciados Francisco Valderrama-Canales, Alberto de las Heras, Francisco Carricondo Orejana, Manuel García Bonacho, Luis Jiménez y Manuel Campos; a las técnico de laboratorio Teresa Rodríguez y Olga Iglesias Ariza y a la secretaria Mayte Blázquez.

Esta Memoria de Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo desinteresado de mis amigos: Karol, Lourdes, Susi, Antonio, Luis y Agustín.

Por último este trabajo está dedicado especialmente a mis padres y hermanos Tere y Juan.

Esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido financiada por un Ayuda a la Investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (F.I.S./95/1540).

a mis padres

ABREVIATURAS

AAE= Aminoácidos excitotóxicos	l=litros
ACPD= Trans-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxilato	M= Molar
Ach= Acetilcolina	mGLUR= Receptor metabotrópico de GLU
AChE= Acetilcolinesterasa	NMDA= N-metil-D-Aspartato
AK= Acido kaínico	NMDAR= Receptor de NMDA
AMP= Adenosina 3'-5' monofosfato	p= Probabilidad
AP4= Acido 2-amino-5-fosfono butirato	PAC= Potencial de acción compuesto
AP5= Acido 2-amino-4-fosfono valerato	PCP= fenciclidina
AP7= Acido 2-amino-7-fosfono pentanato	PEAC= Potencial evocado auditivo cortical
AMPA= Acido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico	PEALM= Potencial evocado auditivo de latencia media
CCEs= Células ciliadas externas	PEATC= Potencial evocado auditivo de tronco cerebral
CCIs= Células ciliadas internas	PN= Postnatal
ChAt= Colin-acetiltransferasa	pO ₂ = Presión parcial de oxígeno
CGRP= Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	PMC= Potencial microfónico coclear
CNQX= 6-nitro,7-cyanoquinoxalina-2,3-dion	PS= Potencial de sumación
CPP= 3-(2-carboxipiperazin-4-il) propil-1-fosfonato	QUI= Acido quisquálico
dB= decibelios	s= segundos
DNQX= 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-dion	SEOCL= Sistema eferente olivococlear lateral
ECG= Electrocolegrafía	SEOCM= Sistema eferente olivococlear medial
Eq= Equivalentes	SPL= (Sound Pressure Level) Nivel de presión de sonido
g= gramos	V= Voltios
GABA= Acido gamma amino butírico	
GAD= Glutamato descarboxilasa	
GDEE= Ester dietílico de glutamato	
GLU= Glutamato	
GLUR= Receptor ionotrópico de GLU	
GMS= Glutamato monosódico	
Hz= Hercios	
HPLC= Cromatografía líquida de alta presión	
IBO= Acido iboténico	

AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS	vi
INDICE	viii
INTRODUCCION	1
I. ANATOMIA DEL OÍDO	2
A. GENERALIDADES	2
B. LA COCLEA	3
B.1. La rampa media	5
B.2. El órgano de Corti	7
B.2.1. Sistema de soporte	7
B.2.2. Membrana tectoria	10
B.2.3. Células ciliadas internas (CCIs)	10
B.2.4. Células ciliadas externas (CCEs)	12
II. INERVACION DEL RECEPTOR AUDITIVO	13
A. INERVACION AFERENTE COCLEAR	13
A.1. Neuronas tipo I	13
A.1.1. El neurotransmisor de las CCIs	14
A.2. Neuronas tipo II	14
A.2.1. El neurotransmisor de las CCEs	16
B. INERVACION EFERENTE COCLEAR	17
B.1. Sistema eferente olivococlear lateral (SEOCL)	17
B.2. Sistema eferente olivococlear medial (SEOCM)	18
B.3. Sustancias neuroactivas eferentes cocleares	18
B.3.1. Acetilcolina	18
B.3.2. GABA	19
B.3.3. Dopamina	20
B.3.4. Péptidos opioides	21
B.3.5. CGRP	22
C. INERVACION SIMPATICA	23
III. FISILOGIA DE LA AUDICION	24
A. TRANSDUCCION COCLEAR	27
B. FISILOGIA COCLEAR	28
B.1. Mecánica coclear pasiva	29
B.2. Mecánica coclear activa	30
B.3. Fisiología de las CCIs	31
B.4. Fisiología de las CCEs	33
C. POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS	34
C.1. Potenciales cocleares	36
C.1.1. Potencial endococlear	36

C.1.2. Electrocoqueografía (ECG)	37
C.2. Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC)	39
IV. DESARROLLO DEL RECEPTOR AUDITIVO	41
A. DESARROLLO ESTRUCTURAL	41
A.1. Origen y diferenciación de las neuronas del ganglio auditivo	41
A.2. Sinaptogénesis coclear	43
A.3. Sinaptogénesis en la rata	44
B. DESARROLLO DE LA FUNCION AUDITIVA	46
B.1. Desarrollo del oído externo y medio	46
B.2. Desarrollo del receptor	46
B.3. Desarrollo de los potenciales cocleares	48
V. NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR AMINOACIDOS EXCITOTOXICOS (AAE)	51
A. EXCITOTOXICIDAD	51
A.1. Subtipos de receptores de glutamato	53
A.2. Ontogenia de las vías mediadas por AAE	57
B. ESTUDIOS EXCITOTOXICOS	59
B.1. Administración localizada	59
B.2. Administración sistémica	62
B.2.1. Administración de glutamato (GLU)	62
B.2.2. Administración de ácido kaínico (AK)	63
B.3. Estudios in vitro	64
C. AAE EN LA COCLEA	66
C.1. El neurotransmisor de las CCIs	66
C.2. Receptores de glutamato en la cóclea	69
C.3. Neurotoxicidad de los análogos del glutamato	71
JUSTIFICACION	74
MATERIAL Y METODOS	76
A. ANIMALES	77
B. MATERIAL DE LABORATORIO	78
C. MATERIAL ELECTROFISIOLOGICO	79
D. ADMINISTRACION DE GMS	83
E. TECNICA ELECTROFISIOLOGICA	84
F. TECNICA MORFOLOGICA	86
G. ESTUDIO ESTADISTICO	87
RESULTADOS	88
A. ANIMALES CONTROL	89
B. ANIMALES TRATADOS	95
B.1. Grupo I	96
B.2. Grupo II	103

B.3. Grupo III	110
B.4. Grupo IV	117
B.5. Grupo V	124
B.6. Grupo VI	130
B.7. Grupo VII	136
B.8. Grupo VIII	143
B.9. Grupo IX	150
B.10. Grupo X	156
B.11. Grupo XI	163
DISCUSION	169
A. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE GMS EN ANIMALES ADULTOS	170
A.1. Sobre la técnica utilizada	170
A.2. Sobre los resultados obtenidos	172
A.3. La hipótesis glutamatérgica	175
A.4. Efectos clínicos	180
A.5. Comparación del modelo con patologías relacionadas	180
B. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE GMS EN ANIMALES EN DESARROLLO	188
B.1. Sobre otros modelos experimentales	188
B.2. Administración única	194
B.3. Administración a partir del día 2 PN	204
B.4. Administración a partir del día 6 PN	210
B.5. Administración a partir del día 9 PN	215
B.6. Efectos clínicos	220
C. IMPLICACIONES EN LA CLINICA HUMANA	223
CONCLUSIONES	225
BIBLIOGRAFIA	229

INTRODUCCION

I. ANATOMIA DEL OIDO

A. GENERALIDADES

Anatómicamente el sistema auditivo se compone de tres partes principales: oído externo, oído medio y oído interno.

La función del oído externo es recoger las ondas sonoras, actuando como una antena, y conducir las al oído medio. Está constituido por el pabellón auricular y el conducto auditivo externo. El pabellón auricular es un apéndice cartilaginoso recubierto por la piel situado a ambos lados de la cabeza. Presenta muchas variaciones entre las diferentes especies animales en cuanto a su forma, tamaño o capacidad de movimiento. Como ejemplos extremos están algunas especies de murciélagos, en los que el pabellón auricular es desproporcionadamente grande con respecto al tamaño de la cabeza, mientras que los topos carecen por completo de pabellón auricular. El conducto auditivo externo es un canal tubular que llega hasta el oído medio, del cual se separa por medio del tímpano, que es una doble membrana ectodermo-endodérmica.

En el oído medio se lleva a cabo una amplificación de los sonidos antes de transmitirlos al oído interno. Está formado por una cavidad, denominada caja del tímpano, situada en el interior del hueso temporal, a través de la cual, y gracias a la presencia de la membrana timpánica y la cadena de huesecillos, se transmite el sonido desde el oído externo al interno. La cadena de huesecillos está constituida por tres huesos, el martillo, el yunque y el estribo, suspendidos en el interior de la caja del tímpano por medio de ligamentos y músculos. El martillo está insertado en el tímpano, el yunque une al martillo con el estribo y éste último se apoya en la

membrana de la ventana oval. Por otra parte, el oído medio comunica con la nasofaringe a través de la trompa de Eustaquio y con el oído interno a través de dos orificios que existen en su pared interna: la ventana oval y la ventana redonda.

El oído interno o laberinto se encarga de transformar la energía mecánica en impulsos nerviosos. Está constituido por un conjunto de cavidades localizadas en el seno del peñasco del hueso temporal. Se divide en laberinto posterior o vestibular, donde reside el órgano del equilibrio, y laberinto anterior o coclear, con el receptor auditivo.

El laberinto óseo se compone básicamente de una cavidad central, el vestíbulo, desde la que se originan hacia atrás tres conductos semicirculares y hacia delante un conducto arrollado en espiral que recibe el nombre de cóclea o caracol. El vestíbulo comunica con la caja del tímpano a través de las ventanas redonda y oval.

El laberinto membranoso se encuentra en el interior de la cóclea y es un conjunto de membranas que forman tres cavidades llamadas rampas: vestibular, timpánica y coclear o media. Las rampas vestibular y timpánica (rampas laterales) del laberinto membranoso se encuentran llenas de un líquido, la perilinfa, de características similares al líquido cefaloraquídeo; la rampa media por su parte contiene otro líquido, la endolinfa, muy diferente al resto de los líquidos extracelulares por su alto contenido en potasio y escaso en sodio (Salt y Konishi, 1986).

B. LA COCLEA

La cóclea se encuentra situada en el laberinto óseo por delante, por debajo y ligeramente medial con respecto al

aparato vestibular. Para la descripción de la cóclea haremos dos grandes apartados: cóclea ósea y cóclea membranosa.

La cóclea ósea está formada por un cono hueco, el modiolo o columela, sobre el que se arrolla en espiral un tubo que da varias vueltas dependiendo de la especie (2,5 espiras en el hombre y la rata y 3,5 en el cobaya). En el interior de este tubo hueco hay tres compartimentos espirales separados por membranas que constituyen el laberinto membranoso. Dos son perilinfáticos (rampas vestibular y timpánica), mientras que el central (rampa media o conducto coclear) es endolinfático y aloja al receptor auditivo (Richany y cols., 1949).

La porción más ancha de la cóclea, base coclear, está en comunicación con la cavidad vestibular. El ápex coclear es el vértice del modiolo. Podemos definir el eje coclear como la línea que pasa por el centro de la base y por el ápex. Las estructuras cocleares se localizan en el espacio tomando como referencia este eje puesto que la situación anatómica de la cóclea (el eje coclear tiene una dirección de arriba a abajo, de dentro a fuera y de atrás a delante) hace difícil una descripción tomando como referencia los ejes principales del organismo. Las representaciones gráficas de la cóclea se realizan siempre situando la base hacia abajo y el ápex hacia arriba (Richany y cols., 1949).

Dentro del modiolo distinguimos una parte central, donde se encuentran las fibras nerviosas del nervio coclear y los principales vasos sanguíneos que irrigan la cóclea; y una parte periférica, en forma de canal espiral (canal de Rosenthal), que aloja a las neuronas del ganglio espiral de Corti. Alrededor del modiolo se fija una lámina ósea aplanada que recorre toda la espiral coclear desde la base hasta el ápex. Se denomina

lámina espiral ósea y por ella las fibras nerviosas alcanzan el receptor auditivo u órgano de Corti (Richany y cols., 1949).

Las conductos del laberinto membranoso se localizan con respecto a la lámina espiral ósea del siguiente modo: la rampa timpánica está por debajo y separada de la rampa media por la membrana basilar, en la parte superior encontramos las rampas media y vestibular separadas por la membrana de Reissner. Las rampas timpánica y vestibular se comunican a nivel apical a través de un espacio denominado helicotrema, de forma que la perilinfa que rellena la rampa timpánica está siempre en comunicación con la de la rampa vestibular (Richany y cols., 1949).

La rampa media termina apicalmente de forma ciega. En su porción más basal, denominada gancho, presenta un estrecho conducto, *canalis reuniens*, que pone en comunicación el espacio endolinfático vestibular con el coclear. Por su parte, la rampa vestibular desemboca basalmente en el vestíbulo (ventana oval), mientras que la rampa timpánica aboca a la caja del tímpano a través de la ventana redonda (Richany y cols., 1949).

B.1. La rampa media

El conducto coclear se encuentra limitado por las membranas de Reissner y basilar y por la pared lateral ósea que está recubierta de una estructura epitelial denominada *estria vascular*.

La región infero-interna del conducto coclear está ocupada por una estructura conjuntiva denominada *limbo espiral* (Merchán y cols., 1980; Merchán y Ludeña, 1983). En la parte más interna del limbo espiral se inserta la membrana de Reissner, mientras que sobre su superficie se apoya la membrana tectoria.

La membrana de Reissner (Reissner, 1851) se dirige desde el limbo espiral hacia la pared lateral, insertándose en la parte superior del ligamento espiral. Está formada por dos monocapas celulares separadas por una membrana basal, las células de la monocapa interna son de origen epitelial y poseen uniones ocluyentes (Hunter-Duvar, 1978; Shinozaki y Kimura, 1980; Uziel, 1985).

La estria vascular está situada en la pared lateral ósea (Fujimoto y cols., 1981; Shinozaki y Kimura, 1980) y está compuesta por un epitelio multiestratificado que pierde la membrana basal durante el desarrollo, lo que permite la entrada de vasos sanguíneos. Estas células epiteliales son las encargadas de la generación y el mantenimiento de la endolinfa por medio de un transporte activo de sustancias desde los vasos sanguíneos a la rampa media (Gil-Loyzaga y cols., 1987; Marcus, 1986). El límite inferior de la estria vascular está formado por la prominencia espiral (Kolmer, 1927).

La membrana basilar es una membrana fibrosa que se inserta por un lado en el labio timpánico de la lámina espiral ósea y por el otro en el ligamento espiral. Su anchura va aumentando desde la base al ápex, mientras que su grosor va disminuyendo siguiendo el mismo gradiente (Cabezudo, 1978; Wada, 1923). En cada nivel se puede dividir en dos partes: pars arcuata y pars pectinata. La pars arcuata es la más interna y de menor longitud y está constituida por una matriz fibrilar. La pars pectinata o estriada está formada por dos capas fibrilares entre las cuales existe un material amorfo (Gil-Loyzaga y cols., 1987; Lavsdowskii, 1874). La parte de la membrana basilar en contacto con la rampa timpánica está recubierta por células mesoteliales que dejan entre ellas abundantes espacios

vacíos. La otra cara está recubierta por una fina membrana basal sobre la que se apoyan los elementos epiteliales constituyentes del órgano de Corti y del surco espiral externo. En su porción más interna existe una zona perforada por las fibras nerviosas llamada habénula perforada.

El surco espiral externo está recubierto por células epiteliales cuboides: células de Hensen, la más internas y células de Claudius, más externas, y se extiende desde el límite externo del órgano de Corti hasta la pared lateral. Existe otro surco, el surco espiral interno, que se sitúa entre las elevaciones formadas por el limbo espiral interno y por el órgano de Corti, y está cubierto por la membrana tectoria.

B.2. El órgano de Corti

El órgano de Corti o papila auditiva es el receptor auditivo propiamente dicho. Se encuentra cubierto por una estructura acelular que no forma parte de él, llamada membrana tectoria. Está formado por células sensoriales y de soporte

Las células sensoriales (células ciliadas) son de dos tipos: células ciliadas internas (CCIs) y externas (CCEs). Las CCIs están dispuestas en una sola hilera interna y las CCEs se organizan en tres hileras externas. Los dos tipos de células están sustentadas por células de soporte especializadas como las células de Deiters para las CCEs, o poco especializadas como las células internas de soporte para las CCIs.

B.2.1. Sistema de soporte

El sistema de soporte del órgano de Corti está constituido fundamentalmente por: los pilares o arcos de Corti, las células internas de soporte y las células de Deiters.

Los pilares de Corti (Corti, 1851; Merchán y cols., 1982) forman dos hileras paralelas situadas entre las CCI's y CCE's. Son células muy especializadas que constan de tres partes: pie o base, cuerpo y cabeza. La base de los pilares es la porción más ensanchada de la célula, donde se encuentra el núcleo celular y por la que se apoya sobre la membrana basal. El cuerpo celular es más estrecho y está dotado de numerosos filamentos de actina y microtúbulos (Arima y cols., 1983; Slepecky y Chamberlain, 1983). La cabeza es la porción ensanchada terminal.

Las células de los pilares de la hilera interna contactan con las de la hilera externa solamente por la base y la cabeza celular, delimitando así un espacio triangular que recorre toda la longitud de la espira coclear y que recibe el nombre de túnel de Corti. Los cuerpos de los pilares internos son aplanados y están adosados en forma de empalizada dejando paso sólo a las fibras nerviosas que inervan las CCE's (Merchán y cols., 1982). Los cuerpos de los pilares externos son más estrechos, permitiendo la existencia de espacios vacíos entre ellos.

Las cabezas de los pilares internos se sitúan por encima de las de los pilares externos, y están unidas por un desmosoma de gran tamaño. Las cabezas de los pilares internos alcanzan la superficie apical de la primera fila de CCE's. Por su parte, las prolongaciones apicales de los pilares externos alcanzan la segunda hilera de CCE's (Gil-Loyzaga y Merchán, 1983).

Las CCI's contactan por su lado más externo por los pilares internos, por su base por las células internas de soporte y por el lado interno por otro tipo de células epiteliales de soporte menos especializadas, las denominadas células marginales

internas, que forman el límite entre el órgano de Corti y el surco espiral interno (Ludeña y cols., 1980; Merchán y Ludeña, 1983).

Las células de Deiters o falángicas se disponen en tres filas paralelas situadas sobre la membrana basilar y envolviendo los polos basales de las CCEs. Las células de Deiters emiten una prolongación, la prolongación falángica, que se dirige hacia la superficie del órgano de Corti. Una vez en la superficie estas prolongaciones se extienden hasta contactar con otras prolongaciones falángicas, con las cabezas de los pilares externos y con la superficie apical de las CCEs. La superficie del órgano de Corti queda así formada por varios tipos celulares que le dan un aspecto de embaldosado al que Kölliker (1854) denominó membrana reticular.

Quedan así espacios vacíos entre las CCEs y las prolongaciones falángicas. Estos espacios, que se denominan espacios de Nuel, comunican internamente con el túnel de Corti, a través de los espacios que existen entre los cuerpos de los pilares externos. Los espacios de Nuel están cerrados externamente por las células de Hensen (Hensen, 1863; Merchán y cols., 1980).

El líquido que rellena el túnel de Corti y los espacios de Nuel es de características similares a la perilinfa, a pesar de su localización en el interior de la rampa media. Esto se debe a que toda la superficie del órgano de Corti, al igual que el resto de la rampa media, se encuentra sellada por uniones intercelulares de tipo ocluyente (Merchán y Ludeña, 1983), lo cual impide el intercambio libre de iones entre endolinfa y perilinfa.

B.2.2 Membrana tectoria

La membrana tectoria es una estructura glicoproteica acelular que, desde su anclaje interno en la superficie del limbo espiral, salta por encima del surco espiral interno para cubrir al órgano de Corti. Al igual que la membrana basilar su anchura se incrementa siguiendo un gradiente base-ápex (Steel, 1983; Wada, 1923). No se apoya directamente sobre la superficie del órgano de Corti, sino sólo sobre los cilios más altos de las CCEs, que forman en ella unas impresiones digitiformes en forma de "V" o de "W" (Hunter-Duvar, 1978). Externamente parece anclarse sobre la porción más alta de las células de Hensen (Steel 1983). No obstante, la presencia de estos anclajes en el animal adulto no ha sido totalmente confirmada.

Está compuesta de glicoproteínas y glicosaminglicanos, distribuidos de diferente manera según las zonas de la membrana (Gil-Loyzaga y cols., 1985a, 1985b; Gil-Loyzaga y cols., 1991; Menoyo-Bueno y cols., 1990; Remezal y Gil-Loyzaga, 1993).

B.2.3 Células ciliadas internas (CCIs)

Las CCIs son las verdaderas células receptoras del órgano de Corti. Se sitúan en la región interna del órgano de Corti, rodeadas por las expansiones de las células internas de soporte y entre las células limitantes y los pilares internos.

El cuerpo celular es piriforme y se halla ligeramente inclinado sobre la cara medial de los pilares internos. El núcleo se encuentra en la porción más ensanchada de la célula, la región media, donde se encuentran la mayor parte de las organelas citoplásmicas (revisión en Merchán y Ludeña, 1983).

En el polo apical encontramos una zona de mayor densidad electrónica en forma de franja paralela (placa cuticular) a la

superficie celular en la que se anclan las raicillas ciliares. La placa cuticular deja libre la porción más externa del ápex celular donde existe un corpúsculo basal, testigo de la presencia de un quinetocilio que desaparece durante la maduración (Gil-Loyzaga y Merchán, 1983; Nielsen y Slepecky, 1986). Se ha demostrado a nivel de la placa cuticular la presencia de filamentos de actina y miosina (Slepecky y Chamberlain, 1983).

Los estereocilios se disponen en varias hileras paralelas en sentido longitudinal, siguiendo la dirección de la espiral coclear. Los cilios más externos son los de mayor longitud, mientras que los de la hilera más interna son los más cortos. Cada cilio individual presenta un esqueleto fibrilar constituido fundamentalmente por filamentos de actina (Anniko y cols., 1988; Flock y cols., 1982) y microtúbulos (Corey y Hudspeth, 1979) que le proporcionan rigidez y cierta capacidad contráctil. Presentan, además, un estrechamiento en la base (Kimura, 1965) de manera que cuando el estereocilio se ve sometido a una fuerza tendente a flexionarlo, la deformación tiene lugar casi exclusivamente en la región estrecha, permaneciendo rígido el resto (Flock y cols., 1977). Por otro lado, cada estereocilio se encuentra unido a los que le rodean por unos puentes de naturaleza glicoproteica (Furness y Hackney, 1986; Pickles, 1982). La presencia de tales uniones interciliares, que afectan a todos los cilios de una misma célula, tiene como consecuencia el que el desplazamiento de un sólo cilio arrastre tras de sí al resto (Flock y cols., 1977).

B.2.4. Células ciliadas externas (CCEs)

Las CCEs son alargadas y cilíndricas, situándose el núcleo en posición basal. Se disponen en tres filas longitudinales a lo largo de la espiral coclear presentando un aumento gradual en su longitud y en la de sus estereocilios desde la base al ápex (Liberman, 1982b; Müller, 1991; Pujol y cols., 1992). Así mismo, parece haber una gradación en longitud de las tres CCEs de distintas filas en espiras más apicales, siendo más largas las externas, esta situación no se presentaría en la espira basal (Pujol y cols., 1992).

Tanto los cilios como la placa cuticular son de estructura muy similar a los de las CCIs. Sin embargo, existe una diferencia importante en la disposición de los cilios en la superficie apical ya que no se disponen longitudinalmente sino formando una "V" o una "W" con el vértice orientado externamente (Furness y Hackney, 1986; Kimura, 1965). Por otra parte, los cilios más altos (los más externos) entran en contacto directo con la superficie inferior de la membrana tectoria, a la que se hallan anclados (Hunter-Duvar, 1978).

Las CCEs presentan una especialización típica, son las denominadas cisternas sublemmales dispuestas paralelamente a su superficie lateral. Aunque se desconoce su función, se ha propuesto su participación en los fenómenos de motilidad celular (Gil-Loyzaga y Brownell, 1988).

II. INERVACION DEL RECEPTOR AUDITIVO

El receptor auditivo recibe tres tipos de inervación: aferente, eferente y simpática.

a) Inervación aferente: llevada a cabo por las neuronas del ganglio espiral de Corti, que ponen en comunicación el receptor con los núcleos cocleares.

b) Inervación eferente: procede de neuronas cuyos somas se localizan en el tronco cerebral, en el complejo olivar superior.

c) Inervación simpática: llega desde el ganglio estrellado y el ganglio cervical superior.

A. INERVACION AFERENTE COCLEAR

Las neuronas del ganglio espiral de Corti se encuentran en el canal de Rosenthal y son de dos tipos, tipo I y tipo II, diferenciados tanto morfológica como fisiológicamente.

A.1. Neuronas tipo I

Representan la gran mayoría (alrededor del 95%) de las neuronas que componen el ganglio espiral. Son grandes, bipolares y se encuentran cubiertas, incluso en su soma, por varias capas de mielina.

Del soma celular parten dos prolongaciones, originadas en polos opuestos de la célula. La prolongación periférica, dendrita, se dirige hacia el órgano de Corti atravesando radialmente y sin ramificarse la lámina espiral ósea hasta alcanzar la habénula perforada, donde pierden su vaina mielínica. Siguiendo un trayecto radial alcanzan el polo basal de las CCIs.

Una sola neurona del tipo I contacta con una sola CCI, si bien cada CCI recibe prolongaciones de unas veinte neuronas de tipo I. El botón terminal de la dendrita tipo I se apone al cuerpo celular de la célula ciliada formando una sinapsis asimétrica de tipo Gray I, de mayor engrosamiento postsináptico. En proximidad al engrosamiento presináptico se observan cuerpos sinápticos rodeados de vesículas sinápticas. Suele existir un solo cuerpo sináptico por cada sinapsis aferente tipo I, aunque en determinadas circunstancias como el envejecimiento y el desarrollo embrionario su número puede ser mayor (Pujol y Lenoir, 1986).

A.1.1. El neurotransmisor de las CCIs

Se cuenta con muchas pruebas indirectas de que el GLU actúa como neurotransmisor en la sinapsis entre la CCI y las dendritas de las neuronas tipo I del ganglio espiral. Sin embargo, el reconocimiento del GLU como el mejor candidato a neurotransmisor aferente coclear no excluye la posibilidad de que otras sustancias neuroactivas, particularmente el aspartato, coexistan con él en las mismas sinapsis (Eybalin, 1993).

En el apartado **V.C.1.** veremos con más detalle las pruebas experimentales a favor del GLU como el principal neurotransmisor entre las CCIs y las dendritas de las neuronas tipo I del ganglio espiral coclear.

A.2. Neuronas tipo II

Constituyen alrededor del 5% del total de neuronas del ganglio espiral. Son neuronas generalmente pseudomonopolares, más pequeñas que las neuronas de tipo I. A diferencia de las

neuronas tipo I son amielínicas, aunque están cubiertas por expansiones de las células de Schwann. Su prolongación periférica se dirige hacia el órgano de Corti a través de la lámina espiral ósea. Después de atravesar la habénula perforada alcanzan el polo basal de las CCIs donde forman parte del plexo espiral interno. Tras un trayecto de longitud variable cruzan el túnel de Corti, normalmente por su parte baja, alcanzando así la zona de las CCEs y tomando de nuevo una dirección espiral entre las células falángicas, constituyendo los fascículos espirales externos (Schwartz y Ryan, 1986).

Las prolongaciones periféricas de las neuronas tipo II, a diferencia de las de tipo I, se ramifican en diferentes puntos de su recorrido, estableciendo contacto con un número variable de CCEs (Simmons y Liberman, 1988a); según Brown (1987) parece existir un gradiente en el patrón de inervación en el que CCEs de distintas filas, pero con igual longitud serían inervadas por la misma neurona.

La sinapsis se realiza a través de un pequeño botón terminal adosado a la base de la CCEs. Las únicas especializaciones sinápticas consisten en las densidades pre y postsinápticas, de aproximadamente el mismo grosor (tipo II de Gray), y en un escaso número de vesículas sinápticas cercanas a la membrana presináptica (Pujol y Lenoir, 1986; Simmons y Liberman, 1988b).

Una sola neurona tipo II realiza contactos sinápticos con muchas CCEs. Cada CCEs recibe contactos de un escaso número de neuronas tipo II. Este patrón de inervación representa, contrariamente a lo anteriormente expuesto para las neuronas tipo I, un ejemplo de convergencia. Dado el trayecto espiral de

las dendritas tipo II, esto significa que cada neurona tipo II recibe información procedente de un amplio sector coclear.

A.2.1. El neurotransmisor aferente de las CCEs

Las CCEs no parecen despolarizarse como respuesta al estímulo sonoro. Al menos esto se desprende del único estudio disponible hasta la fecha en el que se han registrado neuronas de tipo II (Robertson, 1984). Este hecho lleva a descartar que estas células y las neuronas que las inervan estén implicadas primariamente en la recepción auditiva.

El único neurotransmisor que cuenta con evidencia a su favor es el GLU. Este se ha detectado en las CCEs usando técnicas inmunocitoquímicas (Altschuler y cols., 1989; Eybalin y cols., 1991).

Los estudios de neurotoxicidad por AK sugieren que, al menos durante la maduración (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a y b), y en el ápex coclear del animal adulto (Pujol y cols., 1985), las CCEs podrían utilizar GLU como neurotransmisor, dado que se observan terminales severamente dilatados que contactan con la base de estas células. Sin embargo, al lado de estos terminales dañados se encuentran otros, con las características ultraestructurales de los terminales aferentes tipo II, que no resultan afectados por el kainato (Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a, 1990b; Pujol y cols., 1985, 1987) o por el AMPA (Puel y cols., 1991b). Esto ha llevado a sugerir que las dendritas afectadas pertenecen a neuronas tipo I, que inervarían a las CCEs durante el desarrollo para desaparecer en el animal adulto, excepto en la zona terminal del ápex coclear (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a y b; Pujol y cols., 1985, 1987).

B. INERVACION EFERENTE COCLEAR

La inervación eferente coclear se divide en dos sistemas independientes atendiendo a la localización de sus neuronas de origen y a las zonas de proyección dentro del órgano de Corti (Warr y cols., 1986).

B.1. Sistema eferente olivococlear lateral (SEOCL)

Las neuronas que dan origen al SEOCL se encuentran alrededor o en el interior del núcleo olivar superior lateral (Warr, 1975).

Las proyecciones del SEOCL a la cóclea son mayoritariamente ipsilaterales, entre el 85% en el gato y el 100% en la rata (Robertson, 1984). Siguen una distribución tonotópica sobre la cóclea. Las neuronas del núcleo olivar superior lateral que proyectan ipsilateralmente lo hacen de modo que las más mediales proyectan a la base coclear y las más laterales al ápex. Sin embargo, las que proyectan a la cóclea contralateral llegan únicamente al ápex.

Los axones de las neuronas del SEOCL salen del tronco cerebral acompañando a la raíz del nervio vestibular para alcanzar más tarde el nervio coclear a través de la anastomosis de Oort. Una vez en el interior de la cóclea se integran en el haz intraganglionar. Siguen después un trayecto espiral en el haz espiral interno y forman sinapsis en passant con las dendritas de las neuronas tipo I (Lieberman, 1980; Pujol y Lenoir, 1986).

B.2. Sistema eferente olivococlear medial (SEOCM)

El SEOCM está formado por neuronas grandes, multipolares, de soma fusiforme. Como en el SEOCL, estas neuronas emiten prolongaciones que se dirigen hacia la cóclea homolateral y contralateral pero, en este caso, el componente cruzado es el más importante (Warr y cols., 1986). Las prolongaciones de estas neuronas siguen el mismo trayecto hacia la periferia que sus homólogas del SEOCL. Sin embargo se dirigen hacia las CCEs de forma radial, cruzando el túnel de Corti y ramificándose a diferentes alturas hasta alcanzar el polo basal de éstas células (Robertson, 1984). Terminan formando sinapsis axosomáticas sobre el polo basal de las CCEs.

B.3. Sustancias neuroactivas eferentes cocleares

El término sustancia neuroactiva abarca a los neurotransmisores clásicos y a los neuromoduladores, es decir, aquellas sustancias que no tienen un efecto postsináptico inmediato sino que ejercen un efecto modulador de la acción de un neurotransmisor (Hucho, 1986).

B.3.1. Acetilcolina (Ach)

La acetilcolina, así como su enzima de síntesis, la colinacetil transferasa (ChAT), se han detectado mediante métodos radioquímicos (Fex y Wenthold, 1976; Hoffman y cols., 1988). Estudios inmunocitoquímicos ponen de manifiesto que la ChAT se encuentra tanto en el sistema olivococlear medial como en el lateral. Sólo contamos con información indirecta acerca de la posible liberación de acetilcolina en respuesta a la estimulación de la inervación eferente coclear (Fex, 1973; Norris y Guth, 1974).

La inactivación de la acetilcolina liberada al espacio intersináptico se lleva a cabo por mediación de la acetilcolinesterasa (AChE). Se ha demostrado, por medio de métodos histoquímicos, su presencia en las fibras eferentes del haz espiral interno y en las que alcanzan las CCEs (Merchán-Pérez y cols., 1994; Sobkowicz y Emmerling, 1989).

La estimulación de las fibras olivococleares a nivel del suelo del cuarto ventrículo provoca una disminución de la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio coclear y un incremento del potencial microfónico coclear (Eybalin, 1993; Wiederhold, 1986). Estos resultados se pueden reproducir usando Ach o sus agonistas y bloquearse con sus antagonistas.

La estimulación eléctrica del componente cruzado del haz olivococlear provoca una disminución del potencial receptor de las CCIs (Brown y cols., 1983; Brown y Nutall, 1984). Este hecho podría tal vez explicar la menor respuesta al sonido de las neuronas del ganglio espiral ante este mismo tipo de estimulación (Comis y Leng, 1979; Robertson y Johnstone, 1978).

Parece probable la presencia en las CCEs de receptores colinérgicos tanto para los nicotínicos como para los muscarínicos (Plinkert y cols., 1991). En estudios electrofisiológicos realizados sobre CCEs aisladas se ha observado que la acetilcolina provoca una corriente de salida de potasio en estas células al actuar sobre receptores nicotínicos (Housley y Ashmore, 1991).

B.3.2. Acido gamma amino butírico (GABA)

La utilización de métodos inmunocitoquímicos ha puesto de manifiesto la presencia de inmunoreactividad tipo GABA en el haz espiral interno, formando contactos sinápticos con las

fibras aferentes tipo I. También bajo las CCEs se encuentran terminales inmunoreactivos. La reacción se limita, en este caso, a las espiras apicales de la cóclea (Merchán-Pérez y cols., 1990a y b, 1993). El enzima que cataliza la síntesis de GABA a partir del ácido glutámico, glutamato decarboxilasa (GAD), se encuentra también en las varicosidades del haz espiral interno y en terminales que contactan con las CCEs de las espiras altas (Merchán-Pérez y cols., 1990a, b y 1993; Ylikoski y cols., 1989).

El GABA, o una sustancia muy similar, se libera a la perilinfa tras estimulación sonora (Drescher y cols., 1983) o tras despolarización por altas concentraciones de potasio (Bobbin y cols., 1990a, 1991). El mecanismo más probable de aclaramiento del GABA es su recaptación por las terminaciones nerviosas (Schwartz y cols., 1988). La perfusión intracoclear de antagonistas del GABA provoca un descenso de la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio coclear (Bobbin y Thompson, 1978). Además, estos antagonistas bloquean parcialmente los efectos de la estimulación del haz olivococlear cruzado (Klinke y Oertel, 1977a). Se ha determinado la presencia de receptores tipo GABA-A en el polo sináptico de CCEs (Plinkert y cols., 1991). La inmunoreactividad es más intensa cuanto más apicales son las CCEs, aunque no desaparece en las CCEs procedentes de la espira basal. Se desconoce la presencia de receptores GABA-B.

B.3.3. Dopamina

Se ha demostrado la presencia de dopamina en la cóclea utilizando técnicas de HPLC con detección electroquímica (Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, 1989; Gil-Loyzaga y cols., 1993a; Gil-

Loyzaga, 1995). Los estudios inmunocitoquímicos en los que se han localizado los enzimas de síntesis sugieren que la dopamina podría encontrarse en los terminales del sistema eferente lateral en el haz espiral interno, además, los estudios ultraestructurales indican que ambas enzimas se encuentran en varicosidades que forman sinapsis con las dendritas aferentes tipo I (Eybalin y cols, 1993).

La administración perilinfática de dopamina prácticamente no afecta al potencial de acción compuesto ni al potencial microfónico coclear (Bobbin y Thompson, 1978). Sin embargo, muy recientemente, se ha demostrado que el metabolismo de la dopamina coclear aumenta con la estimulación acústica (Gil-Loyzaga y cols., 1993a). Por otra parte, la liberación y turnover de dopamina coclear parece estar modulada por receptores presinápticos de tipo D2 (Gil-Loyzaga y cols., 1994; Vicente-Torres y cols., 1993).

B.3.4. Péptidos opioides

En la cóclea se han identificado péptidos opioides de la familia de la proencefalina y de la familia de la prodinorfina.

Entre los derivados de la proencefalina se han localizado en la cóclea la Met-encefalina, la Leu-encefalina y el octapéptido Met-encefalina-Arg6-Gly7-Leu8 tanto por métodos inmunocitoquímicos como por HPLC (Eybalin, 1993). También durante el desarrollo coclear se han identificado por métodos inmunocitoquímicos la Met-encefalina y el octapéptido Met-encefalina-Arg6-Gly7-Leu8 (Gil-Loyzaga y cols., 1988). Los estudios ultraestructurales indican que estos péptidos se encuentran en las varicosidades eferentes del haz espiral interno. Además, al menos la Met-encefalina se libera en la

cóclea en respuesta a la estimulación sonora (Drescher y cols., 1983; Eybalin y cols., 1987). La presencia de receptores para péptidos opioides en la cóclea parece probable, ya que algunos de sus agonistas y antagonistas sintéticos tienen sitios de unión específicos en homogeneizados cocleares (Hoffman, 1986).

Entre los derivados de la prodinorfina o proencefalina B se cuentan la dinorfina A, la dinorfina B y la alfa-neoendorfina (Eybalin, 1993). Las tres han sido identificadas inmunocitoquímicamente en la región del haz espiral interno. El posible papel funcional de las dinorfinas presentes en la cóclea es desconocido.

B.3.5. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

El CGRP es un péptido que se expresa en las células nerviosas. Este péptido recibe su nombre debido al hecho de que se encuentra codificado en la misma secuencia que el gen de la calcitonina.

En la cóclea se ha detectado la presencia de CGRP tanto por métodos bioquímicos como inmunocitoquímicos. En cuanto a su localización a nivel celular, parece claro, según se desprende de los resultados de numerosos estudios, que se halla presente en las varicosidades del haz espiral interno y en los terminales que contactan con las CCEs (Merchán-Pérez y cols., 1990c).

Los estudios ultraestructurales a nivel coclear confirman la presencia de inmunoreactividad tipo CGRP tanto en varicosidades del haz espiral interno que realizan sinapsis con las dendritas tipo I, como en la mayor parte de los terminales eferentes que contactan con las CCEs (Eybalin y Pujol, 1989).

Se ha descrito que la perfusión intracoclear de CGRP provoca una disminución dosis-dependiente de la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio coclear (Eybalin, 1993).

Además de los arriba descritos se han propuesto otras muchas sustancias como el GLU, aspartato, taurina, ATP, etc. que podrían tener un efecto neuromodulador (Eybalin, 1993). En la actualidad se maneja la hipótesis de un sistema eferente formado por varios fascículos con efectos activadores o inhibidores tanto sobre la acción de las CCEs como las CCIIs (Gil-Loyzaga, 1995).

C. INERVACION SIMPATICA

Esta inervación consta de dos componentes: uno perivascular, originado en el ganglio estrellado y otro independiente de vasos, posiblemente originado en el ganglio cervical superior (Spoendlin, 1981).

El componente perivascular probablemente controla el flujo sanguíneo (Carrasco y cols., 1990); con respecto al otro componente y debido a su localización en la habénula perforada, Spoendlin y Lichtensteiger (1966) propusieron su intervención en la generación de impulsos nerviosos.

Las sustancias neuroactivas implicadas en esta inervación incluyen la noradrenalina (Eybalin y Pujol, 1983; Gil-Loyzaga y Parés-Herbuté, 1989), la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo, el GABA y otros (Eybalin 1993).

III. FISILOGIA DE LA AUDICION

El estímulo que capta el receptor auditivo es el sonido, el cual consiste en un movimiento vibratorio producido por un cuerpo elástico en movimiento que se transmite a las moléculas constituyentes del medio con el que se encuentra en contacto. El sonido, por tanto, se puede transmitir a través de un cuerpo sólido, líquido o gaseoso con una velocidad en relación a la estructura molecular del medio. El modelo más simple de sonido son los movimientos armónicos simples que quedan definidos por su intensidad, medida en decibelios (dB), y su frecuencia, medida en Hercios (Hz). Todo sonido complejo se puede dividir en sus componentes más simples mediante transformadas de Fourier.

La audición es la capacidad que posee el oído para extraer un mensaje auditivo de un sonido complejo. El oído externo y el medio intervienen en el proceso de conversión de una vibración aérea en un vibración mecánica, mientras que en el oído interno la vibración mecánica se transforma en potenciales de acción que codifican la información sobre intensidades y frecuencias. Esta información permite localizar la fuente sonora y establecer comparaciones entre diferentes sonidos.

Daremos primero una visión general de la fisiología del aparato auditivo periférico (Gil-Loyzaga y Pujol, 1993), que, seguidamente detallaremos:

1.- El sonido recibido por el tímpano se transmite a la cadena de huesecillos del oído medio. El estribo hace vibrar a la membrana oval, la cual transmite dicha vibración a la perilinfa de la rampa vestibular, provocando en ella una onda de presión. Como los líquidos son incompresibles, la onda de

presión se transmite a través del helicotrema a la rampa timpánica, produciendo una deflexión de la membrana redonda, inversa a la de la membrana oval.

2.- La vibración de los líquidos se transmite a la membrana basilar o más concretamente al conjunto del receptor, que vibra desplazándose hacia arriba y hacia abajo. Esta vibración presenta una tonotopía grosera ligada a las propiedades elásticas del conjunto formado por la membrana basilar y el receptor (micromecánica pasiva). El sector de máxima excursión de la basilar se desplaza hacia el ápex a medida que la frecuencias del sonido estimulante disminuye.

3.- La membrana tectoria, que permanece fija por su anclaje interno a nivel del limbo espiral, realiza un movimiento de deslizamiento relativo sobre la superficie del receptor que implica la deflexión de los estereocilios largos de las CCEs. La deflexión de los estereocilios cuando la basilar se desplaza hacia arriba tiene carácter excitador, variando el potencial de membrana celular.

4.- Las CCEs activadas desarrollan contracciones rápidas (mecanismos activos) en fase con la frecuencia del sonido estimulador. Estas contracciones producen el acoplamiento entre la membrana basilar y la tectoria, lo que supone una amplificación de la vibración en una zona muy restringida de la espiral coclear. Es decir, producen un efecto de amplificación selectiva o filtro del sonido. No obstante, esta amplificación se realizaría sólo en los sonidos de baja intensidad; en los sonidos iguales o superiores a 70 dB la participación de las CCEs en la micromecánica coclear es progresivamente menor.

5.- Las CCIs de la zona estimulada selectivamente por la vibración pasiva y por los mecanismos activos de las CCEs, son excitadas con un máximo de sensibilidad.

6.- Las escasas CCIs despolarizadas liberan su neurotransmisor (GLU) por el polo basal, enviando el mensaje auditivo al sistema nervioso central por las fibras aferentes de las neuronas de tipo I. Gracias a los mecanismos de selectividad frecuencial derivados de las CCEs, dos CCIs contiguas pueden codificar y enviar dos mensajes discretamente diferentes.

7.- El mensaje auditivo que alcanza los núcleos cocleares sigue dos vías paralelas. Por una de ellas es enviado a centros superiores y por la otra es transmitido a los núcleos eferentes del complejo olivar superior, de donde parten los sistemas eferentes medial y lateral. Se ha sugerido que la función del sistema eferente medial sería la atenuación de los mecanismos activos de las CCEs, por estimulación de las contracciones lentas. Por su parte el sistema eferente lateral, cerraría un arco de control retrógrado clásico modulando los mensajes que circulan por las fibras aferentes de las neuronas tipo I. Dado que se han descrito numerosas sustancias neuroactivas y puede suponerse que parte de ellas tendrían una función facilitadora y otras inhibidora de dicho mensaje.

Una vez dada la visión general, pasamos a detallar la fisiología auditiva, comenzando con el mecanismo de transducción coclear, la fisiología del receptor y finalmente describiremos los potenciales eléctricos que se pueden registrar en la vía acústica con especial énfasis en los potenciales cocleares.

A. TRANSDUCCIÓN COCLEAR

En el sistema de transducción del sonido desde el exterior hasta las CCIs intervienen: el oído externo, el medio y el interno; este último lo detallaremos en un apartado dedicado a la fisiología coclear.

El pabellón auditivo, dotado de movilidad en la mayoría de los mamíferos, hace las funciones de antena acústica, además, debido a su morfología (junto con la del canal auditivo) es capaz de cambiar la presión del sonido, aumentándola, antes de que incida en el tímpano (Dancer, 1988).

En lo que se refiere al oído medio se distinguen tres misiones fundamentales:

1.- Se encarga de transformar las ondas acústicas en vibraciones mecánicas.

2.- Permite la adaptación de la impedancia entre el medio aéreo externo y el medio líquido del oído interno.

3.- Protege al oído interno modulando la cantidad de energía que recibe.

La cadena de huesecillos es la encargada de conducir las vibraciones producidas en la membrana timpánica, vibraciones muy complejas que dependen de la intensidad y de la frecuencia del sonido estimulante, hasta la cóclea.

Una vez transmitida la vibración aérea a la cadena de huesecillos, ésta vibración debe pasar a vibración líquida lo que conllevaría una pérdida de energía. El oído medio actúa como un adaptador de impedancias debido a la diferencia de tamaño entre el tímpano y la ventana oval por lo que la presión final en la membrana oval está muy incrementada, esta relación de transformación llega a ser de 24/1 con una ganancia de 27 dB en el hombre (Zwislocki, 1975). La ganancia de presión no es un

factor constante y depende de la frecuencia del sonido. Las diferencias entre las funciones de transferencia del oído externo y del oído medio explican, en su mayor parte, las diferencias entre las curvas de umbral de sensibilidad auditiva entre las diferentes especies de mamíferos (Dancer y Francke, 1982; Dancer, 1988).

Mediante el reflejo estapedial el oído medio protege de los sonidos intensos. Este reflejo consiste en la contracción refleja del músculo del estribo, y para sonidos de extrema intensidad del músculo del martillo, lo que supone una pérdida en la función de transferencia del oído medio. Este reflejo es operativo para sonidos de intensidad mayor a 80 dB y especialmente para los de baja frecuencia (Moller, 1974).

El papel funcional de la trompa de Eustaquio consiste en igualar las presiones aéreas entre el exterior y la caja timpánica. Por otra parte, el sonido puede también alcanzar la cóclea por medio de conducción ósea directa a través de las vibraciones del hueso temporal.

B. FISILOGIA COCLEAR

En la cóclea se transforman las vibraciones mecánicas de la ventana oval en mensaje neural y se realiza un primer análisis de la frecuencia y de la intensidad, con una discriminación temporal de 1 ms.

En cuanto al análisis de la frecuencia, ha sido un tema de debate intenso puesto que ningún modelo físico ni nervioso podía explicar la alta selectividad en este análisis que lleva a cabo la cóclea.

Hoy en día se acepta que la mecánica coclear incluye dos procesos, uno pasivo generado por la estructura y organización coclear y otro activo llevado a cabo por las CCEs.

B.1. Mecánica coclear pasiva

Se considera mecánica pasiva a las propiedades físicas que por su estructura y organización tiene la cóclea para llevar a cabo el análisis frecuencial. La gradación tanto en longitud como en grosor desde la base al ápex coclear de la membrana basilar es la principal característica estructural que interviene en la mecánica coclear pasiva.

Las vibraciones de la ventana oval se transmiten a la perilinfa en forma de onda de presión que se propaga por ella hasta llegar a la membrana redonda, donde se disipa la energía al producirse en ella movimientos contrapuestos a los ocurridos en la ventana oval, transmitiéndose estas vibraciones al medio aéreo de la caja del tímpano.

La mecánica coclear pasiva ha sido explicada por dos grandes teorías: de la resonancia (Hemholtz, 1863) y de la onda propagada (Békésy, 1960). Von Hemholtz propuso que las diferentes regiones de la membrana basilar se comportarían como unidades independientes que resonarían exclusivamente con una frecuencia característica. Von Békésy, utilizando cócleas procedentes de cadáveres, encontró que cada sonido no resonaba exclusivamente en una fina banda de la basilar sino que iniciaba una onda (onda viajera) que desde el estribo al helicotrema recorría toda la membrana basilar. Esta onda provocaba desplazamientos basilares progresivamente mayores hasta alcanzar el máximo en una región característica para cada frecuencia disminuyendo luego rápidamente. No obstante esta

región de máxima amplitud coincidía con la sugerida por von Helmholtz; así, para frecuencias agudas el máximo desplazamiento de la basilar se produce en la espira basal y para frecuencias graves en el ápex.

Por lo tanto, cada frecuencia está representada por un conjunto de desplazamientos (enveloppe de ondas) de la membrana basilar. Este envelope puede representar a una onda propagada o a la resonancia de una serie de resonadores dispuestos sobre una membrana elástica (Dancer 1988).

B.2. Mecánica coclear activa

Recientemente, con modernas técnicas de análisis como el efecto Mossbauer (Sellick y cols., 1982) o la interferometría óptica (Khanna y Leonard, 1982), se ha demostrado que la selectividad mecánica de la membrana basilar es superponible a la de las fibras del nervio auditivo con la condición de que el estado fisiológico de la cóclea sea perfecto (Johnstone y cols. 1982). El concepto de mecánica coclear activa engloba las propiedades que presentan tanto las CCIs como las CCEs para poder efectuar un análisis fino de la frecuencia.

Los estudios de Russell y Sellick (1977 y 1978) demostraron que las CCIs tenían una selectividad frecuencial semejante a las fibras del nervio auditivo, por lo tanto, debía existir un segundo mecanismo de filtrado entre la vibración de la membrana basilar, primer filtro de frecuencias y la generación de impulsos nerviosos. Davis (1983) propuso un modelo, en el que las CCEs tienen un papel amplificador, que permite la comprensión de la mayoría de las observaciones morfológicas y fisiológicas.

B.3. Fisiología de las CCIs

En cuanto a la transducción mecanoeléctrica, la mayoría de los estudios referentes al comportamiento de los estereocilios y de los canales iónicos asociados se ha llevado a cabo en anfibios y reptiles (Hudspeth 1982 y 1986). Aunque es probable que el proceso de transducción esté conservado a lo largo de la evolución (Dallos, 1991), también es muy probable que se hayan producido variaciones sobre un patrón común.

Actualmente se acepta la hipótesis propuesta por Hudspeth (1989) en la que canales iónicos no específicos situados en la parte apical de los estereocilios serían los responsables de la entrada de iones K^+ , por ser el más abundante en la endolinfa. La apertura y cierre de estos canales estaría causada por los movimientos de la endolinfa que los rodea. En estado de reposo algunos de los canales están abiertos debido, probablemente, al movimiento browniano de las partículas de la endolinfa (Howard y Hudspeth, 1988). Por otra parte la sensibilidad diferencial de apertura o cierre de estos canales dependiendo de la dirección de movimiento de los estereocilios se cree debida a la existencia de puentes de unión entre los estereocilios largos y cortos (Pickles, y cols., 1984; Pickles, 1985; Osborne y cols., 1984). Una vez producida la despolarización la célula debe recuperar su potencial de reposo y esto lo hace mediante los canales Ca^{++} voltaje dependientes y los canales de K^+ , situados en las membranas basolaterales que activados por el Ca^{++} permite la salida de K^+ (Ashmore y Meech, 1986; Hudspeth, 1986). En algunas células ciliadas se ha comprobado la existencia de un ritmo de despolarización coincidente con la frecuencia estimulante. Esta entonación se cree que es resultado de dos factores, la longitud de los cilios y el

número y dinámica de los canales de la membrana basolateral (Weiss y Leong, 1983).

En la fisiología de las CCIs hay tres aspectos importantes a tener en cuenta:

1. Actividad bioeléctrica de las CCIs

El potencial de reposo es de -30 a -45mV (Dallos, 1986; Nuttall, 1986; Santos-Sacchi, 1988) y el potencial de receptor que se ha puesto en relación con el potencial de sumación extracelular (ver C.1.2.b) (Aran y cols., 1988).

2. Sinapsis aferente

La despolarización de la CCIs provoca la liberación de neurotransmisores (GLU) por el polo basal e inicia la transmisión nerviosa. Cada fibra nerviosa responde con mayor sensibilidad (menor intensidad de sonido estimulante) a una frecuencia determinada que se define como característica.

Las fibras aferentes tipo I tienen una actividad espontánea y responden a los estímulos aumentando su patrón de descarga de forma significativa al comienzo del estímulo, disminuyendo a continuación y llegando a un período de inhibición al cesar el estímulo. Según su actividad espontánea se pueden dividir en tres tipos: de descarga alta, media y baja (Liberman, 1982b).

Cada fibra es estimulada sólo por su frecuencia característica en estímulos de baja intensidad y a medida que se incrementa la intensidad responde también a otras frecuencias. Gracias a esta propiedad, la cóclea efectúa un análisis de frecuencia que será transmitido al sistema nervioso central.

3. Sistema eferente lateral

No se conoce con precisión la función de este sistema sobre las fibras tipo I. Los últimos estudios abogan por un efecto

inhibidor en situaciones de sobrestimulación acústica. El SEOCL podría actuar sobre las dendritas aferentes de las neuronas tipo I, modulando los potenciales de acción; y el SEOCM sobre las CCEs, regulando la mecánica coclear activa mediante modificación de las contracciones.

B.4. Fisiología de las CCEs

Los cilios de las CCEs están implantados en la membrana tectoria. La membrana tectoria provocará un desplazamiento radial sobre los cilios cuando el receptor pivote en el plano vertical, provocando así la excitación de las CCEs. La membrana tectoria desplaza los cilios hacia el lado externo (dirección excitadora) cuando el receptor se incurva hacia arriba (Hudspeth, 1986; Pickles y cols., 1984)

Su potencial de reposo es de -70 mV y son incapaces de despolarizarse ante estímulos sonoros. Sin embargo las CCEs del ápex parecen tener unas características morfológicas similares a las de las CCIIs (Pujol, 1989). La expresión extracelular de su actividad bioeléctrica es el potencial microfónico.

La sinapsis aferente se realiza sobre las fibras tipo II y su neurotransmisor es desconocido. Reciben inervación eferente del SEOCM. Las hipótesis que se barajan sobre la sinapsis aferente apuntan a una función de información sobre la actividad mecánica de las CCEs que se cree es controlada por la inervación eferente.

Brownell (1984, 1985) describe la capacidad contráctil de las CCEs en cultivo ante estímulos eléctricos. Actualmente se acepta la existencia de dos tipos de contracciones que darían lugar a movimientos de todo el receptor debido al anclaje de los estereocilios en la membrana tectoria.

Las contracciones rápidas con duración de microsegundos se supone que son debidas a un mecanismo electro-osmótico (Kachar y cols., 1986) o de una transferencia rápida de cargas (Ashmore, 1987) a través de la membrana celular en la que estarían implicadas las estructuras membranosas de las caras laterales de las CCEs, cisternas sublemmales. El papel funcional que se les supone es el de amplificar estímulos de baja intensidad y el incremento de la selectividad frecuencial (Pujol, 1989). Estas contracciones rápidas podrían generar otoemisiones espontáneas o provocadas en situaciones normales y patológicas (Poch-Broto y Rodríguez-Gómez, 1990; Rodríguez-Gómez y cols., 1990).

La contracción lenta tienen una duración de milisegundos y es semejante a la contracción muscular (Flock y cols., 1986) se piensa que su función sería el mantenimiento del tono mecánico basal del sistema. El sistema eferente medial está probablemente implicado en el inicio o control de la contracción lenta de las CCEs, cuyo estímulo disminuiría las contracciones rápidas. Esto protegería ante sobrestimulaciones (Pujol, 1989). Las CCEs de la base y sus estereocilios son más cortas que las del ápex (Pujol y cols, 1992) y también existen diferencias en cuanto a la inervación por lo que se ha sugerido que las CCEs del ápex pueden participar en la transducción del mensaje sonoro.

C. POTENCIALES EVOCADOS AUDITIVOS

Se considera un potencial evocado, a todas las modificaciones de la actividad eléctrica del sistema nervioso, producidas por algún estímulo físico. Una característica que diferencia a los potenciales evocados con respecto a otras

exploraciones electrofisiológicas la constituye el hecho de que, mediante los mismos, no estamos registrando la actividad basal del sistema, sino que obtenemos una información generada en estado funcional, mediante la utilización de un estímulo idéntico al que fisiológicamente utiliza el sistema en su funcionamiento habitual (López-Moya, 1992). Los potenciales evocados se clasifican según el estímulo en: Auditivos (sonido), visuales (imágenes) y somestésicos (estímulo eléctrico o vibrotáctil).

Se sospechaba de la existencia de los potenciales evocados auditivos en el siglo XIX pero no es hasta los años treinta, con el desarrollo de la tecnología eléctrica sobre amplificadores y osciloscopios, que se logran los primeros registros de actividad eléctrica evocada (Fromm y cols., 1936). Con el desarrollo de las técnicas electrofisiológicas, en cuanto a la generación de estímulos y a la recogida de la señal biológica, se han ido perfeccionando las técnicas de estudio de estos potenciales evocados. Así, en 1960 Ruben describe el potencial microfónico coclear y el potencial de sumación; en 1966 Davis obtiene los potenciales corticales; Aran y Portman en 1967 ponen las bases de la electrococleografía; entre 1970 y 1972 Jewett obtiene los potenciales de tronco cerebral; y Picton en 1974 obtiene los potenciales de latencia media.

El origen de los potenciales evocados auditivos está en las estructuras nerviosas de la vía aferente auditiva aunque la generación anatómica de las distintas ondas de los diferentes potenciales auditivos es muy discutida en la actualidad, llegándose a consensos sobre muy pocas, este es el caso de la onda N1 de los PAC que se genera en el nervio auditivo y se corresponde con la onda I de los PEATC. La discrepancia es

debida a que las ondas se corresponden con la respuesta sincrónica de multitud de estructuras nerviosas situadas en el sistema nervioso central sobre cuyas conexiones no tenemos todavía un conocimiento claro.

Los principales potenciales evocados auditivos son:

- Potencial microfónico coclear (PMC)
- Potencial de sumación (PS)
- Potencial de acción compuesto del nervio auditivo (PAC)
- Potencial evocado auditivo de tronco cerebral (PEATC)
- Potencial evocado auditivo de latencia media (PEALM)
- Potencial evocado auditivo cortical (PEAC)

Estos potenciales se obtienen con estímulos auditivos de diferentes características, distinta colocación de los electrodos de registro y los filtros utilizados en su recogida. Los tres primeros se pueden registrar con una técnica llamada electrococleografía.

C.1. Potenciales cocleares

En la cóclea se pueden registrar cuatro tipos de potenciales, uno de ellos, el potencial endococlear es continuo, es decir, no cambia ante la estimulación, y los otros tres son dinámicos, cambian ante la presencia de un estímulo.

C.1.1. Potencial endococlear

Fue descrito por von Békésy (1951) y es la diferencia de potencial existente entre la rampa media, llena de endolinfa y otra de las rampas, llena de perilinfa. Esta diferencia de potencial, unos 150 mV, es debida a la distinta composición iónica entre la endolinfa (150mEq/l de K^+ y 12 mEq/l de Na^+) y la perilinfa (130 mEq/l de Na^+ y 5 mEq/l de K^+). Es la estria

vascular la encargada de generar y mantener este potencial endolinfático mediante un transporte activo de K^+ al interior y Na^+ al exterior de la endolinfa.

Este potencial es el responsable de la generación del potencial de receptor en las células ciliadas ya que es la fuerza que conduce la entrada de K^+ en ellas. Los otros tres potenciales se detallan en el siguiente apartado.

C.1.2. Electrocoqueografía (ECG)

Con esta técnica se registra la actividad bioeléctrica que produce el sonido utilizando para su recogida electrodos situados en la cóclea. Se obtienen tres potenciales evocados: microfónicos, de sumación y de acción compuesto.

a.- Potencial microfónico (PM)

Fue descrito por Wever y Bray 1930 y llamado así por reproducir el estímulo como si fuera un micrófono. Se recoge con un electrodo situado en la membrana de la ventana redonda no presenta latencia, y su amplitud crece cuando aumentamos la intensidad del estímulo hasta cierta intensidad, donde se satura y no presenta ningún incremento (Keidel, 1969). Su origen está en las CCEs, ya que si se dañan por ototóxicos o no están presentes, el MC se ve afectado.

No existe una relación directa entre el umbral auditivo y el umbral de los microfónicos cocleares. Asimismo se muestra muy sensible a la anoxia y a las variaciones en la concentración de potasio.

b.- Potencial de sumación (PS)

Fue descrito por Davis y cols. en 1950 y definido por Dallos y cols. en 1972 como un multicomponente originado en

cualquier estructura de origen no lineal en el interior de la cóclea.

Se obtiene únicamente con intensidades altas de estimulación. Actualmente se le relaciona con el potencial de receptor de las CCIs.

c.- Potencial de Acción Compuesto (PAC)

Constituye la modificación más visible registrada durante los primeros 5 milisegundos que siguen a la presentación de un estímulo auditivo. Está constituida por tres deflexiones negativas denominadas N1, N2, N3, apareciendo esta última con intensidades altas de estimulación. Las curvas representan la excitación sincrónica de todo el nervio auditivo o de parte de él según el estímulo utilizado (López-Moya, 1992).

Las ondas que componen el potencial de acción sufren cambios tanto en su amplitud como en su latencia con las variaciones de la intensidad del estímulo utilizado de forma que la amplitud decrece y la latencia aumenta con la disminución de la intensidad de estimulación.

Las mediciones se llevan a cabo siempre en función de la onda N1 que constituye la deflexión más llamativa y constante. Debido a las variaciones interindividuales en la amplitud se puede normalizar la prueba asignando el 100% de la amplitud a la obtenida con un estímulo de alta intensidad (100 dB) y el resto se expresaría como un múltiplo del mismo. La gráfica de amplitud/intensidad muestra dos pendientes: una muy inclinada correspondiente a altas intensidades y otra menos inclinada en las intensidades bajas. También hay cambios en la morfología dependiendo de la intensidad: a altas intensidades aparecen N1 y N2 pero a bajas intensidades sólo aparece N2 (López-Moya, 1992).

El PAC representa la actividad sincrónica de las fibras aferentes, esta actividad individual se puede registrar utilizando microelectrodos, donde la respuesta al estímulo se observa como un aumento en la descarga espontánea de la fibra, la representación gráfica se realiza con la curva de entonación (tunning curve) donde se representa la intensidad del estímulo frente a las frecuencias, obteniéndose un pico en la frecuencia a la que la fibra responde con mayor sensibilidad.

El estímulo acústico más usado es el click aunque también se utilizan clicks filtrados y tone pips. También se puede utilizar dos estímulos simultáneos, uno de los cuales a menor intensidad y constante que enmascara la respuesta de una zona de la cóclea y el otro de frecuencia conocida con el que estimulamos una parte determinada de la espira coclear. Con esta técnica se pueden obtener tuning curves semejantes a las recogidas de una sola fibra.

C.2. Potenciales Auditivos de Tronco Cerebral (PEATC)

Estos potenciales representan la actividad eléctrica sincrónica ocurrida en la vía auditiva en los primeros 10 ms. Es el más estudiado por tener una forma de onda invariante y una gran resistencia a la administración de drogas y a los estados de sueño y vigilia (Allen y Starr, 1978). Es un potencial de campo que se registra vértex positivo y está compuesto en la rata por cinco ondas principales que se corresponden con mucha probabilidad (Shaw, 1987) con:

- Onda I: Actividad del nervio auditivo
- Onda II: Actividad de los núcleos cocleares
- Onda III: Actividad del complejo olivar superior
- Onda IV: Actividad del núcleo del lemnisco lateral

- Onda V: Actividad del colículo inferior

El lugar de generación para las dos primeras ondas es aceptado por la mayoría de los autores, sin embargo existen muchas discrepancias con respecto a las siguientes. Estos potenciales dependen de muchos factores: tipo de filtros usados, estímulos, ritmo de repetición, registro unilateral/contralateral, situación de los electrodos, impedancia de los electrodos, etc. Además de estudiar la latencia y amplitud de las ondas es posible medir los intervalos entre ellas y compararlos entre sí (López-Moya, 1992).

IV. DESARROLLO DEL RECEPTOR AUDITIVO

A. DESARROLLO ESTRUCTURAL

En una primera parte expondremos el origen de las neuronas del ganglio espiral y a continuación el desarrollo de la inervación del órgano de Corti.

A.1. Origen y diferenciación de las neuronas del ganglio auditivo

Las neuronas del ganglio estatoacústico proceden de células que se desprenden de la cúpula ótica en estadios tempranos del desarrollo, siendo, por tanto, de origen placodal. No obstante, al menos una parte de las neuronas del ganglio acústico, tal vez las neuronas tipo II, podrían originarse de la cresta neural, como las células de glia del ganglio y nervio cocleares.

Las neuronas del ganglio auditivo empiezan a emitir sus prolongaciones poco después de haberse separado del epitelio de la cúpula ótica. Las neuronas emiten dos prolongaciones, una central y otra periférica, que avanzan dirigidas por sendos conos de crecimiento hacia el bulbo y hacia el epitelio coclear en desarrollo. Aparentemente, las prolongaciones centrales alcanzan antes su destino final que las periféricas (Knowlton, 1967; Whitehead y Morest, 1985). Las prolongaciones periféricas llegan a la porción basal del epitelio acústico y, tras un período durante el cual parecen buscar la zona apropiada a inervar, penetran a través de la membrana basal (Carney y Silver, 1983; Chandler, 1984; Whitehead y Morest, 1985). En ocasiones, pueden observarse citópodos emitidos por las células

epiteliales, que recogen y guían a las fibras nerviosas que llegan a la base del epitelio (Gil-Loyzaga y Merchán, 1983).

La ramificación de las fibras nerviosas durante los estadios tempranos del desarrollo auditivo es un hecho común, tanto en aves (Whitehead y Morest, 1985) como en mamíferos (Cajal, 1919; Perkins y Morest, 1975). Estas ramificaciones de las fibras nerviosas ascienden a través del epitelio hasta contactar con las células ciliadas.

El cuerpo celular de las neuronas del ganglio espiral sufre también modificaciones durante la maduración. En la rata albina, el ganglio coclear está compuesto al nacer por un grupo homogéneo de neuronas pequeñas. Durante la primera semana de desarrollo postnatal se produce un importante fenómeno de muerte celular en el ganglio espiral de la rata. Se ha calculado que el número de neuronas decrece en más de un 20% entre los días 4 y 6 después del parto (Rueda y cols., 1987), lo cual podría estar relacionado con los procesos de reestructuración sináptica que, como veremos luego, ocurren durante la maduración del receptor.

A partir del octavo día PN en la rata empiezan a apreciarse diferencias morfológicas entre las futuras neuronas tipo I y tipo II. Las neuronas son en general más grandes y no se hallan tan densamente empaquetadas como en edades más tempranas. Las neuronas tipo I se encuentran ya cubiertas por algunas capas de mielina (Schwartz y cols., 1983). Desde este momento hasta la total madurez del ganglio es de destacar la progresión de la mielinización de las neuronas tipo I y sus prolongaciones (Schwartz y cols., 1983).

A.2. Sinaptogénesis coclear

La sinaptogénesis es el proceso por el cual las fibras nerviosas forman sinapsis después de contactar con la célula diana. Durante la sinaptogénesis coclear se producen contactos nerviosos transitorios que desaparecen al alcanzarse la madurez auditiva. En las CCIs aparecen contactos eferentes axosomáticos alrededor de los días 6 a 9 del desarrollo PN de la rata (Lenoir y cols., 1980a y b). Este tipo de contactos sinápticos son raros en el animal adulto (Iurato, 1962; Liberman, 1980; Spoendlin, 1969).

En las CCEs aparecen sinapsis aferentes con cuerpos presinápticos que desaparecen casi totalmente en el animal adulto, permaneciendo los contactos aferentes tipo II, sin cuerpos presinápticos. Según Pujol y colaboradores (1979) estas sinapsis aferentes podrían estar genéticamente programadas y representar un estadio filogenéticamente antiguo de la inervación de las CCEs, dado que estas células, en los vertebrados inferiores, reciben fundamentalmente contactos aferentes. La presencia de cuerpos presinápticos múltiples durante las fases iniciales de la sinaptogénesis lleva a estos autores a proponer para ellos una función trófica sobre la llegada y el crecimiento de las fibras aferentes.

En cuanto a su origen, las sinapsis aferentes transitorias sobre las CCEs parecen provenir de neuronas tipo I, ya que además de las características morfológicas, responden de igual forma a la neurotoxicidad inducida por el AK (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a y b; Pujol y cols., 1985), lo cual parece indicar la presencia de receptores de GLU en estas fibras.

El sistema sináptico de las CCIs madura antes que el de las CCEs. La inervación que reciben las CCIs desde los primeros

momentos de la sinaptogénesis es muy similar a la del animal adulto, consistiendo las diferencias más en el número de sinapsis que en su naturaleza (Pujol y Sans, 1986; Pujol y Uziel, 1986). Por el contrario, las CCEs reciben en principio inervación fundamentalmente aferente. Para alcanzar el patrón de inervación adulto sufren un complejo proceso de reestructuración sináptica por el cual la gran mayoría de las sinapsis aferentes desaparecen al ser sustituidas por sinapsis eferentes.

En lo que se refiere específicamente a la inervación eferente, la afirmación de que el sistema olivococlear lateral madura antes que el medial cuenta con apoyo adicional en estudios recientes: por un lado las diferencias sobre la aparición de sinaptofisina, una proteína implicada en la liberación de neurotransmisores, que se expresa inicialmente en los terminales eferentes bajo las CCIs (Gil-Loyzaga y Pujol, 1988), por otro lado la expresión de neurotransmisores presentes en los dos sistemas (Merchán-Pérez y cols., 1990c y d).

Por último, el inicio de la audición coincide aproximadamente con el momento en el cual podemos considerar maduro al sistema sináptico de las CCIs. Por otra parte, las capacidades discriminativas de la cóclea sólo alcanzan los niveles adultos cuando la inervación de las CCEs ha terminado su proceso madurativo.

A.3. Sinaptogénesis en la rata

Describiremos detalladamente la sinaptogénesis coclear en la rata (Gil-Loyzaga y Merchán 1983; Gil-Loyzaga y Pujol, 1988;

Lenoir y cols., 1980a y b), por ser el animal de experimentación utilizado en este estudio.

En el día del nacimiento de la rata albina pueden ya identificarse contactos entre fibras nerviosas aferentes y las CCIs (Lenoir y cols., 1980a y b). Es también posible identificar sinapsis eferentes axodendríticas a este nivel. En la región de las CCEs solamente pueden identificarse contactos aferentes, algunos de los cuales, en el ápex coclear, presentan especializaciones presinápticas.

En el sexto día del desarrollo el número de terminaciones sobre las CCIs ha aumentado, siendo la mayoría de ellas aferentes. Aparecen ahora terminaciones eferentes que realizan contacto directo con la CCIs. En el área de las CCEs se observa la ausencia de especializaciones presinápticas en las sinapsis aferentes y la aparición de fibras eferentes. Estas fibras eferentes dan lugar a dos tipos de contactos, axodendríticos, sobre las fibras aferentes, y axosómicos sobre la CCEs.

En el noveno día PN la inervación de la CCI se caracteriza por una disminución de los terminales eferentes, de tal forma que ahora la mayor parte de la inervación que reciben es aferente. En la zona de las CCEs aumenta progresivamente el número de contactos eferentes sobre la célula ciliada, mientras disminuye el número de contactos aferentes. Persisten aún contactos eferentes axodendríticos.

A partir del día 10 de desarrollo PN no se observan cambios significativos en el patrón de inervación de las CCIs. En el lado externo se da un proceso de maduración entre los días décimo y duodécimo de las sinapsis eferentes axosómicas.

Desde el decimosexto día del desarrollo PN de la rata albina el proceso sinaptogénico puede considerarse

prácticamente finalizado, al menos desde el punto de vista ultraestructural, dado que los patrones sinápticos, tanto en el lado interno como en el externo, son en todo semejantes a los del adulto.

B. DESARROLLO DE LA FUNCION AUDITIVA

El sistema auditivo periférico de muchos mamíferos no termina de desarrollarse hasta varios días o semanas (dependiendo de la especie) después del nacimiento. Sin embargo otros mamíferos, entre ellos los primates, presentan un sistema auditivo casi totalmente desarrollado en el momento del nacimiento (Walsh y McGee, 1986).

Veremos el desarrollo postnatal del oído externo, medio e interno de los mamíferos y su relación con la maduración de las respuestas nerviosas.

B.1. Desarrollo del oído externo y medio

Tanto el oído externo como el medio determinan la llegada de sonidos al oído interno, por lo tanto hasta que no se desarrollan no hay un estímulo efectivo en la cóclea. Huangfu y Saunders (1983) estudiando las dimensiones del oído medio del ratón llegaron a concluir que la obtención de potenciales maduros coincidía con la adquisición de las dimensiones y características adultas (absorción de los fluidos embrionarios que rellenan la bulla) del oído medio.

B.2. Desarrollo del receptor

La cóclea inmadura se caracteriza por: mayor grosor de la membrana basilar, rigidez mecánica (debida a las conexiones entre la membrana tectoria y las células de soporte), volumen

reducido de las rampas, presencia del órgano de Kolliker, por tanto menor espacio subtectorial, y sistemas aferentes y eferentes inmaduros (Pujol y cols., 1979; Shnerson y cols., 1982). Por otra parte, el crecimiento coclear se efectúa principalmente debido al crecimiento de las células y no a su incremento en número, excepto en zonas apicales preexistentes (Kaltenbach y Falzarano, 1994).

El tiempo necesario para alcanzar la madurez funcional depende de la especie. La inervación coclear es inmadura al nacimiento en muchos mamíferos (Ginzberg y Morest, 1984; Jones y Eslami, 1983; Rebillard y Pujol, 1983). Se ha visto que las CCIs establecen contactos sinápticos antes que las CCEs y antes del nacimiento, la significación funcional que ha sido sugerida por Pujol es la de una primitiva forma de audición (Lenoir y cols., 1980 a y b; Pujol y cols., 1978). Durante el desarrollo de la inervación de las CCIs el número de contactos sinápticos con el soma disminuye durante la primera semana PN, las CCEs alcanzan su maduración durante la tercera semana PN.

Las células del ganglio espiral maduran durante la primera semana PN, comenzando por la base y terminando en el ápex (Romand y Romand, 1984; Schwartz y cols., 1983). También se produce un incremento en la mielinización aunque de forma más lenta (Romand y cols., 1980; Romand y Romand, 1982) y un aumento en el grosor de las fibras. Parece ser que la mielinización no influye de manera significativa en el desarrollo de los potenciales auditivos por estudios comparando la latencia y la amplitud de la onda I de los PEATC con el grado de mielinización (Walsh y McGee, 1986). Estos autores proponen la eficacia en la sinapsis de las CCIs como el proceso

que establece la latencia y amplitud de los potenciales evocados.

Carlier y cols. (1975) fueron los primeros en estudiar la respuesta de las fibras del nervio auditivo durante el desarrollo. Estos estudios y otros posteriores han demostrado que durante el desarrollo se produce un aumento de la frecuencia de descarga espontánea, una disminución del umbral (desde 120 dB SPL al nacimiento), un aumento de la selectividad frecuencial (influido por el desarrollo morfológico y de la inervación eferente sobre las CCEs), un cambio en las características de descarga temporal y un aumento progresivo de la capacidad de responder en fase con el estímulo.

Durante el desarrollo del receptor también se produce un cambio en la composición iónica de los fluidos y en la presencia de diversas enzimas como la ATPasa Na^+/K^+ , adenilato ciclasa, anhidrasa carbónica, ornitina decarboxilasa, etc. (Henley y Rybak, 1995).

B.3. Desarrollo de los potenciales cocleares

El inicio de la audición en la rata ha sido fijado entre los 9 y 12 días después del nacimiento mediante estudios del reflejo de Preyer (Wada, 1923). Crowley y Hepp-Reymond (1966) registraron el potencial microfónico a los 8-9 días después del nacimiento y el potencial de acción compuesto entre los 11-12 días (Carlier y cols., 1979).

El desarrollo del potencial endococlear ha sido estudiado en gatos por Fernández e Hinojosa (1974) y en rata por Boshier y Warren (1971) que encuentran dos períodos de aumento de potencial primeramente uno lento, seguido de uno rápido. Ambos lo correlacionan con la maduración de la estría vascular,

generadora de este potencial. Estas mismas características han sido encontradas en muchas otras especies (Henley y Rybak, 1995).

La aparición del potencial microfónico coclear se ha fijado entre los 8 y 9 días en la rata y la del potencial de sumación el día 5 en el conejo, mientras que el inicio del PAC se ha fijado entre los días 11 y 12 en la rata (Henley y Rybak, 1995).

Las condiciones necesarias para la aparición del PAC son:

- Composición madura de la endolinfa.
- Maduración de las células ciliadas y su capacidad de producir un potencial de receptor.
- Presencia de sinapsis eficientes.

El oído medio reabsorbe el fluido y se llena de aire en el onceavo día. Por lo tanto se puede atribuir la maduración del PMC, a los 15 días, al desarrollo del oído medio. Sin embargo la total maduración del PAC no se alcanza hasta el día 25, por lo que se debe atribuir a procesos neurales (Uziel y cols., 1981).

En la maduración del PAC la amplitud aumenta y la latencia disminuye. En los primeros estadios del desarrollo las gráficas de input-output presentan un crecimiento de la amplitud con la intensidad sin ningún cambio en la pendiente, esto se ha atribuido al retardo en la maduración de la inervación de las CCEs, cuyos terminales eferentes alcanzan su maduración en la segunda semana PN (Pujol y cols., 1978; Carlier y Pujol, 1978).

Los cambios en la latencia parece que reflejan el incremento en la eficacia de la transmisión sináptica (Romand y cols., 1976).

Las características adultas del PAC se observan diez días después de su primera aparición en la rata. Este período es muy variable dependiendo de la especie, así en gatos dura un mes, en cobaya quince días y en ratón cinco días. Esto es debido a la relativa inmadurez del sistema nervioso al nacimiento producido por los diferentes períodos de gestación (Uziel y cols., 1981).

V. NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR AMINOACIDOS EXCITOTOXICOS (AAE)

Los procesos tóxicos que afectan al receptor auditivo son de índole muy diversa y actúan tanto sobre células sensoriales como sobre otros elementos cocleares (Poch-Broto, 1983)

El L-glutamato (L-GLU) ha sido identificado como el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso, participa en procesos de transferencia rápida de información y está implicado en circuitos de aprendizaje y memoria. (Mayer y Westbrook, 1987; Monaghan y cols., 1989; Nicholls, 1993).

A. EXCITOTOXICIDAD

El concepto de excitotoxicidad proviene, principalmente, de los experimentos de Olney (1969, 1983) que demostraron que la administración de dosis altas de GLU o análogos del GLU a roedores en días postnatales producía una degeneración neuronal en la retina y en órganos periventriculares donde no existe la barrera hematoencefálica. El daño neuronal observado era específico de los terminales postsinápticos, definiéndose como conservación de los axones (axon sparing). Se postuló entonces que el mismo neurotransmisor que activaba la neurona postsináptica era capaz, a altas dosis, de producir la muerte de la misma. Los fenómenos de excitotoxicidad están implicados en numerosas patologías del sistema nervioso como la hipoxia-isquemia, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington).

El mecanismo de la excitotoxicidad ha sido muy estudiado in vitro (Choi, 1987; Mayer y Westbrook, 1987; Meldrum y Garthwaite, 1990) implica dos procesos consecutivos, cada uno de ellos mediado, muy probablemente, por un subtipo específico

de receptor de GLU en la postsinapsis. El primero es la entrada masiva de Na^+ al interior celular a través de los receptores AMPA/AK o AK sometidos a alta estimulación, esta entrada masiva da lugar a un desbalance osmótico que implica la entrada de iones Cl^- y H_2O que provoca un edema de la terminación postsináptica. El segundo proceso que implica la entrada de Ca^{2+} al interior celular a través de los receptores NMDA que, debido a la despolarización provocada por la activación de los receptores AMPA/KA o KA, se encuentran desbloqueados. El aumento del Ca^{2+} intracelular da lugar a la activación de una amplia gama de enzimas (proteasas, fosfatasas, etc) que producen la degeneración celular.

A partir de este mecanismo general de muerte celular se pueden plantear cuatro posibles formas de actuación de un compuesto con propiedades excitotóxicas, en las tres primeras se consigue un aumento de la concentración de neurotransmisor en la hendidura sináptica, mientras que en la cuarta estaría afectado el metabolismo de la célula postsináptica.

1. La sustancia podría provocar la activación de receptores postsinápticos y actuar como un neurotransmisor excitotóxico.

2. Podría iniciar en la célula presináptica una descarga continua de neurotransmisor.

3. Podría actuar sobre el mecanismo de recaptación.

4. Podría actuar sobre el metabolismo de la neurona postsináptica haciéndola susceptible a la degeneración excitotóxica en una situación normal.

A.1. Subtipos de receptores de glutamato

La clasificación de los receptores de GLU no ha sido totalmente aclarada y se encuentra en una fase de estudio, ya que con las técnicas de biología molecular se han llegado a clonar varias moléculas distintas del receptor y se piensa que cada subtipo de receptor está formado por la combinación de varias de estas moléculas, dando lugar a diversos subtipos con diferentes propiedades (Hollmann y Heinemann, 1994). Clásicamente el agrupamiento se ha realizado según la afinidad de varios agonistas exógenos (ácidos N-metil-D-aspártico, kaínico, iboténico, quisquálico y recientemente el AMPA o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico) que selectivamente activan uno o más tipos de receptor, y según las características electrofisiológicas de cada receptor.

Los receptores de GLU se han dividido en ionotrópicos, los asociados a un canal iónico y dentro de estos clásicamente en NMDA y no-NMDA y los metabotrópicos, asociados a la activación de proteínas G de la membrana celular y, por tanto, a segundos mensajeros intracelulares. Tanto los estudios de agonistas/antagonistas como los de biología molecular coinciden en la subdivisión de los receptores ionotrópicos; pero con respecto a los receptores metabotrópicos, no existen todavía agonistas específicos que permitan diferenciar con exactitud entre los varios subtipos que, según los datos actuales, se cree que existen (Hollmann y Heinemann, 1994).

Los receptores ionotrópicos se encuentran en la membrana postsináptica y actualmente se tiende a subdividirlos en tres subtipos, según sus características electrofisiológicas y farmacológicas: NMDA, AMPA/AK y el receptor de alta afinidad para AK:

1. **NMDA.** Es el receptor más estudiado (McBain y Mayer, 1994) ya que por sus peculiares características está implicado en los fenómenos de potenciación a largo plazo. Su agonista selectivo es el N-Metil-D-aspartico. El receptor NMDA está ligado a un canal iónico permeable a cationes, sobre todo al Ca^{2+} , que está bloqueado por magnesio de una manera voltaje dependiente. Es decir, cuando la membrana celular está en su potencial de reposo, este canal se encuentra bloqueado por el magnesio, sin embargo cuando la membrana se despolariza se produce la salida del magnesio permitiendo el paso de cationes por el canal. Además de esta característica, es necesaria la unión de glicina para la activación del receptor y también existen sitios de regulación para el Zinc y las poliaminas. Con respecto a los agonistas que pueden activar este canal se encuentran el NMDA, L-aspartato, quinolinato, ibotenateo y L-GLU; los antagonistas pueden unirse al sitio del neurotransmisor como D-AP5 (2-amino-5-fosfonovalerato) y CPP, un derivado del anillo de piperazina; al sitio de glicina como el HA-966 y también pueden unirse al canal como el MK-801, la ketamina y la PCP (fenciclidina).

Con respecto a los recientes estudios de biología molecular sobre el receptor NMDA, se han clonado 5 diferentes subunidades: N1, N2A, N2B, N2C, y N2D. Es necesaria la presencia de N1 para que el receptor tenga las propiedades inherentes al receptor, la presencia de las otras subunidades da lugar a diferentes respuestas de este receptor. Por lo tanto, actualmente, se piensa en la existencia de diversas expresiones del receptor NMDA, según el tipo celular y el momento del desarrollo (Monyer y cols., 1992; Moriyoshi y cols., 1991).

El receptor NMDA debido a su alta conductancia para el Ca^{2+} es una de las principales, junto a los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, vías de entrada del Ca^{2+} al interior celular en los procesos excitotóxicos. Esta entrada masiva conduce a la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} y a la activación de numerosas enzimas (proteasa, lipasas, etc.) que llevan a la muerte celular (Choi y Rothman, 1990).

2. AMPA/AK (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico/ácido kaínico). El canal iónico asociado a este receptor es permeable a cationes monovalentes. Su agonista específicos es el AMPA, aunque también puede ser activado por AK y quisqualato. Sus antagonistas son el DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-dion) y el CNQX (6-nitro,7-cianoquinoxalina-2,3-dion). Se han clonado cuatro moléculas diferentes del receptor AMPA/AK (GLUR1-4), y se ha demostrado que aquellos receptores que incluyen GLUR2 no poseen la capacidad de fluir Ca^{2+} , la mayoría de las neuronas poseen GLUR2, pero se ha descubierto que algunas neuronas del hipocampo no poseen GLUR2 (Ozawa y cols., 1991); y también se ha comprobado la distinta distribución en diferentes regiones del cerebro de estos subtipos de moléculas de receptor (Petralia y Wenthold, 1992). Por otra parte, también se ha demostrado la existencia de receptores AMPA/AK, concretamente GLUR4, en astrocitos y en la glia de Bergmann en el cerebelo.

3. Receptor de alta afinidad para el AK. El canal iónico asociado a este receptor es permeable a cationes monovalente. Se diferencia del receptor AMPA/AK en que no es activado por AMPA. Sus agonistas específicos son el AK, el acromelato y el domoato. Las neuronas de la región CA3 del hipocampo es una de las zonas con mayor densidad de estos receptores (Vornov y

cols., 1991). Se han clonado 5 moléculas que unen AK: GLUR5-7 y KA1-2 (Egebjerg y cols., 1991).

La clasificación de los receptores metabotrópicos es de gran complejidad, ya que no existen agonistas selectivos que puedan diferenciar con exactitud las diversas formas de actuación ni su localización presináptica o postsináptica. Los datos de biología molecular y agonistas selectivos sugieren la existencia de al menos tres tipos concretos. Se han descrito hasta seis subtipos (mGLUR1-6) que pueden activar la fosfolipasa C dando lugar a inositol trifosfato y a diacilglicerol (mGLUR1 y 5) o inhibir la adenil ciclasa produciendo un descenso en la formación de AMP cíclico (mGLUR2, 3, 4 y 6). Se han agrupado en tres subgrupos según sus agonistas más activos:

- a) mGLUR1 y 5 (QUIS>GLU>IBO>ACPD).
- b) mGLUR2 y 3 (ACPD=GLU>IBO>QUI).
- c) mGLUR4 y 6 (AP4>GLU>ACPD).

Estos receptores pueden estar situados tanto postsináptica como presinápticamente y los efectos de su activación pueden ser muy variables, dependiendo tanto del subtipo como de su localización. La activación de un receptor presináptico unido a la adenilato ciclasa puede disminuir la liberación de GLU. La activación de receptores metabotrópicos postsinápticos puede dar lugar a despolarización y a aumento del Ca^{2+} intracelular.

Clásicamente se ha intentado nombrar los diferentes tipos de receptores según el agonista específico exógeno que se encuentra en la naturaleza, normalmente obtenidos a partir de plantas u hongos (los receptores muscarínicos y nicotínicos de la acetilcolina), así las principales sustancias usadas han sido los ácidos kaínico, iboténico y quisquálico. Estas

sustancias se unen a varios tipos de receptores, el AK se une con mayor especificidad a su receptor pero también al receptor AMPA/AK, el ibotenato se une a receptores metabotrópicos pero también a receptores NMDA y el quisqualato además de unirse a receptores metabotrópicos también lo hace al AMPA/AK.

Muchos estudios han demostrado la diferente distribución de los distintos tipos de receptores de GLU en distintas partes del sistema nervioso central. La expresión de diferentes subtipos de receptor da lugar a una toxicidad neuronal selectiva a distintas sustancias excitotóxicas (McDonald y Johnston, 1990).

A.2. Ontogenia de las vías mediadas por AAE

La mayoría de los estudios se han llevado a cabo en la vía visual, hipocampo y ganglios basales y las técnicas más usadas han sido inmunocitoquímicas y de unión a receptores (receptor-binding) para la postsinapsis y los estudios electrofisiológicos y de liberación y recaptura de neurotransmisor en sinaptosomas para la presinapsis. Estos estudios han puesto de manifiesto períodos de sobreexpresión de receptores para AAE durante la ontogenia y estos cambios ha sido correlacionados con períodos de máxima plasticidad sináptica (McDonald y Johnston, 1990).

En la vía visual se ha estudiado la recaptura de GLU durante el desarrollo de la rata y se ha comprobado que aumenta y alcanza un pico en los días 10-15 PN y luego disminuye hasta los niveles adultos en el día 25 PN (Kvale y cols., 1983). Por otra parte se ha relacionado el período crítico durante el cual se produce la estabilización de las sinapsis funcionales con un marcado aumento en la expresión de receptores NMDA (Kleinschmidt y cols., 1987; Sheetz y Constantine-Paton, 1994).

En el hipocampo la unión de GLU marcado alcanza un pico (160% del valor en adultos, día 23 PN) en el día 9 PN. Este incremento coincide con el desarrollo de las aferencias y de los árboles dendríticos en el hipocampo (Baudry y cols., 1981). Y además, con el inicio de la potenciación a largo plazo, donde están implicados principalmente los receptores NMDA.

Se han demostrado alteraciones en la unión del AK durante el desarrollo, así, esta unión se mantiene baja durante los primeros días del desarrollo de la región CA3 del hipocampo (0-12) y luego sube rápidamente hasta alcanzar valores adultos en el día 17 (Ben-Ari y cols., 1984). En el cuerpo estriado se ha observado una relación entre el desarrollo de la inervación glutamatérgica y el daño inducido por la administración de kaínico (Campochiaro y Coyle, 1978).

El receptor metabotrópico del GLU que moviliza el inositol trifosfato y el diacilglicerol se ha estudiado con la aplicación de ibotenato y se ha comprobado que hay sobreexpresión durante los períodos de alta plasticidad sináptica en el sistema visual (Dudek y Bear, 1989).

Durante el desarrollo se producen cambios en la expresión de los marcadores pre y postsinápticos de las vías mediadas por AAE. Muchos de los cambios en la expresión de estos marcadores ocurren durante los períodos críticos del desarrollo que corresponden a períodos con alta plasticidad sináptica. Por lo tanto, los AAE pueden influenciar el desarrollo neuronal a través de sus receptores; además el tipo de receptor expresado puede variar durante el desarrollo (MacDonald y Johnston, 1990).

Además de su papel en la neurotransmisión, los AAE pueden ejercer una función neurotrófica durante el desarrollo. Así, el

NMDA promueve la supervivencia celular en cultivos de células granulares cerebelosas (Balazs y cols., 1988), la activación de receptores no-NMDA promueve sinaptogénesis (Mattson y cols., 1988) y el L-GLU promueve el crecimiento y la maduración de las neuronas así como la formación de sinapsis (Aruffo y cols., 1987).

B. ESTUDIOS EXCITOTOXICOS

En este epígrafe se agrupan los principales modelos experimentales que se han utilizado para el estudio de la neurotoxicidad. Aunque la mayoría de estos estudios se ha llevado a cabo en in vitro para poner de manifiesto los mecanismos básicos de la excitotoxicidad, nosotros nos centraremos en los modelos de administración de sustancias neurotóxicas in vivo. Estos últimos se pueden dividir en dos tipos dependiendo de la vía de administración: localizada o sistémica, y ambos pretenden modelizar síndromes clínicos de origen excitotóxico como síndromes de hipoxia-isquemia, epilepsia, etc.

B.1 Administración localizada

Dentro de este grupo de modelos, los más utilizados usan la administración intracerebral de AAE en zonas localizadas (hipotálamo, estriado, etc.) o al sistema ventricular, otros estudios, los menos, se centran en la administración espinal de. Estos estudios demuestran principalmente tres tipos de actividad excitotóxica dependiendo del agonista utilizado (Meldrum, 1993):

a) el GLU y el aspartato provocan un daño neuronal escaso, debido a los mecanismos de recaptación presentes en las neuronas y las células gliales.

b) el NMDA, quinolinato e ibotenato provoca un daño neuronal restringido a la región de administración.

c) el AMPA y el AK provocan un daño neuronal más extenso que afecta a zonas alejadas de la región de administración.

También se ha observado una muerte neuronal selectiva dependiendo del agonista utilizado, aunque menos marcada que en estudios *in vitro*. Así, en modelos experimentales del síndrome de Huntington se ha visto que está implicado el receptor NMDA y no los receptores AMPA/AK o AK. Se ha comprobado que las neuronas que contienen NADPH-diaforasa (óxido nítrico sintasa) se mantienen en el estriado de pacientes que sufren esta enfermedad así como en ratas sometidas a administración de NMDA o quinolinato. La administración de AK o AMPA destruye estas neuronas (Beal y cols., 1991).

Los estudios de neurotoxicidad durante el desarrollo aportan las mayores evidencias de una regulación de las sinapsis mediadas por AAE. El orden de potencia neurotóxica de los diferentes agonistas es distinto durante el desarrollo y en la edad adulta. Diferentes regiones cerebrales y diferentes tipos neuronales exhiben distintos desarrollos de la neurotoxicidad provocada por los distintos agonistas (McDonald y Johnston, 1990).

El AK es un potente neurotóxico en la edad adulta pero es relativamente inocuo en el cerebro inmaduro. Aunque, paradójicamente, es capaz de producir estatus epiléptico en el animal inmaduro. El AK es tóxico en el cuerpo estriado y en el hipocampo a partir del día 7 PN y aumenta su efecto

gradualmente hasta la edad adulta 21 PN (Coyle, 1983). Aunque en el cerebelo se ha visto que es tóxico en edades más tempranas (Garthwaite y Garthwaite, 1986).

El NMDA es 60 veces más tóxico en el cuerpo estriado y en el hipocampo el día 7 PN que en edades adultas (McDonald y cols., 1988). Además, se ha comprobado que la toxicidad del NMDA varía según la región cerebral e incluso el tipo celular, así, en el cerebelo, las células de Purkinje son insensibles al NMDA, las Golgi son más sensibles y las granuladas más insensibles según avanza el desarrollo postnatal (Garthwaite y Garthwaite, 1986). Así, se ha postulado que la toxicidad mediada por NMDA es un factor muy importante en la patología de los procesos hipóxico-isquémicos, y se comprobado que ambos procesos tienen un desarrollo paralelo durante la ontogenia (Ikonomidou y cols., 1989).

La toxicidad mediada por el NMDA parece incluir varios mecanismos como: la expresión de los receptores de NMDA, la regulación de la actividad de estos receptores, y la regulación de los efectos metabólicos provenientes de la activación de receptores. Las propiedades biofísicas de los receptores de NMDA cambian durante el desarrollo y esto probablemente incide en la toxicidad inducida por el NMDA (McDonald y Johnstone, 1990).

Las neuronas de hipocampo y del estriado son susceptibles a la toxicidad mediada por quisqualato de forma similar pero no tan marcada como el NMDA, teniendo un pico entre los días 7 y 14 PN (Silverstein y cols., 1986). De la misma forma la toxicidad mediada por AMPA tiene un pico en el día 10 PN (McDonald y Johnstone, 1990).

El papel de los AAE en los fenómenos patológicos producidos por la hipoxia-isquemia es el más estudiado. Las regiones lesionadas producidas por la hipoxia-isquemia corresponden con las regiones de distribución de los receptores de AAE (Silverstein y cols., 1987). Los procesos hipóxicos-isquémicos producen un incremento en la concentración extracelular de AAE (Benveniste y cols., 1984). Además, las lesiones producidas en la hipoxia-isquemia se ven reducidas cuando los animales son pre o postratados con antagonistas de AAE, especialmente de los receptores NMDA (Andine y col, 1988; McDonald y cols., 1987). También hay evidencias de la intervención de los AAE en las patologías producidas por fenómenos epilépticos, por disfunciones metabólicas y finalmente en endocrinopatías.

B.2. Administración sistémica

Se han llevado a cabo estudios de administración sistémica de GLU en roedores en períodos neonatales, y de AK en edades adultas.

B.2.1. Administración de glutamato

La primera descripción de daño excitotóxico se debe a Lucas y Newhouse (1957) que describieron el daño retinal producido por la administración de GLU a ratones en edad neonatal. Sin embargo fue Olney quién propuso la hipótesis de la excitotoxicidad, describiéndola como conservación de los axones (axon sparing) en sus estudios de los órganos periventriculares (núcleo arcuato y área postrema) de roedores sometidos a administración intraperitoneal de GLU durante la época postnatal (0 a 14 días PN). Se observó que la toxicidad debida al GLU administrado intraperitonealmente disminuía con la edad

del animal, y esto se atribuye al aumento de la capacidad del epitelio intestinal y del hígado para transaminar los aminoácidos así como a la mejora en la efectividad del funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Windmueller y Spaeth, 1980). Es necesaria dosis de 3-9 gramos de glutamato monosódico (GMS) por kilo de peso para producir lesión en el área postrema de ratas de 12 semanas (Phelix y Hartle, 1990).

El modelo de administración de GMS durante los primeros días postnatales se ha utilizado sobre todo para el estudio de la regulación neuroendocrina. Así, se han descrito numerosas endocrinopatías que incluyen: obesidad, disminución del crecimiento, hipoplaxia de los órganos sexuales y esterilidad. Estas anomalías se han correlacionado con los niveles hormonales de gonadotropinas y la secreción de hormona del crecimiento en los animales adultos (Olney y Price, 1980). Recientemente se ha sugerido que la administración neonatal de GMS también puede afectar regiones del hipocampo y deteriorar el proceso de aprendizaje (Kubo y cols., 1993).

B.2.2. Administración de ácido kaínico (AK)

La administración sistémica de AK reproduce la misma patología que la administración localizada en hipocampo, amígdala o ventrículos laterales y está caracterizada por fenómenos epilépticos (Ben-Ari y cols., 1980).

La administración parenteral de AK en ratas adultas produce una patología semejante a la epiléptica con daño neural y estatus epiléptico. Los síntomas característicos comienzan con estiramientos esporádicos durante los primeros 30 minutos después de la administración de AK, que se continúan con convulsiones generalizadas acompañadas por movimientos faciales

y masticatorios y pérdida de la postura corporal al cabo de una hora. A las dos horas las convulsiones se hacen continuas. Estas tres fases se han relacionado con el efecto del AK sobre el hipocampo, sistema límbico y generalización a otras estructuras no límbicas. Por otra parte los daños histopatológicos observados una o dos horas después de la administración de AK se caracterizan por un edema dendrítico seguida de pérdida neuronal (1 día a 1 semana) en el sistema límbico (Ben-Ari, 1985).

En estos dos tipos de estudios se puede observar un marcado cambio en la expresión de distintos tipos de receptores de GLU durante la ontogenia. La administración de GLU produce daño neural si es aplicado entre los 0 y 14 días PN, mientras que la administración de AK produce lesión neuronal y convulsiones en el animal adulto y si es administrado durante los primeros días PN produce convulsiones y no lesión neuronal.

B.3. Estudios in vitro

Los modelos más utilizados en estudios in vitro son cultivos de neuronas disociadas, secciones de tejidos o cultivos organotípicos. Las principales críticas a estos modelos es la pérdida de propiedades de las células al ser estudiadas en un medio distinto al natural, sin embargo los resultados de estos estudios nos dan una información muy valiosa acerca del comportamiento de los subtipos de receptores, de los mecanismos iónicos y de los efectos secundarios de la toxicidad, así como de las distintas sustancias que pueden resultar protectoras ante la excitotoxicidad.

Los estudios *in vitro* han mostrado claramente que la activación de cualquiera de los tres receptores ionotrópicos produce muerte neuronal y han demostrado la dependencia del Ca^{2+} en este proceso de muerte celular; así como la distinta distribución de receptores dependiendo del tipo celular (Garthwaite y Garthwaite, 1984; Hajos y cols., 1986; Meldrum y Garthwaite, 1990).

Los estudios *in vitro* también han demostrado la existencia y la gran importancia en la neurotoxicidad de los sistemas de transporte de aminoácidos en la membrana celular. De estos sistemas de transporte los más conocidos son el transportador de cisteína que saca GLU del interior celular e introduce cisteína y el transportador de GLU que a través del gradiente de concentración de Na^+ introduce GLU o aspartato en el interior celular. Se ha comprobado que el mal funcionamiento de estos transportadores puede inducir citotoxicidad por un mecanismo distinto a la excitotoxicidad (transportador de cisteína) o producir excitotoxicidad ante concentraciones normales de transmisor (Meldrum, 1993).

Otro de los mecanismos que pueden inducir excitotoxicidad con un componente principal distinto a la concentración de transmisor son las disfunciones metabólicas que conducen a una anormal regulación iónica de la membrana celular o a una disfunción mitocondrial con el consiguiente descenso de la producción de ATP. Así mismo, los estudios *in vitro* en condiciones hipóxicas o con escasez de glucosa demuestran la gran sensibilidad ante la neurotoxicidad inducida por NMDA (Vornov y Coyle, 1991).

C. AAE EN LA COCLEA

C.1. El neurotransmisor de las CCIs

La mayoría de las evidencias apuntan a un aminoácido excitador, el GLU y/o el aspartato, como el principal neurotransmisor de las CCIs. Hay que tener en cuenta que muy probablemente las CCIs utilicen, como la mayoría de las células nerviosas, una serie de cotransmisores; pero esto no anula la hipótesis glutamatérgica.

La mayoría de los estudios que se han dirigido a comprobar, con diferentes técnicas, esta hipótesis se han centrado en: la localización del GLU en las CCIs, la inactivación y la síntesis de GLU, la liberación de GLU por las CCIs y los efectos fisiológicos del GLU en la cóclea.

Los estudios inmunocitoquímicos de Altschuler y cols., (1989) demostraron la presencia de inmunoreactividad con anticuerpos antiglutamato y antiaspartato, mayor con antiglutamato, en las CCIs, aunque también en las CCEs pero en menor medida. La presencia de GLU en las CCIs se ha puesto de manifiesto también con estudios inmunológicos con microscopía electrónica (Eybalin y cols., 1991). Además se ha demostrado que las CCIs in vitro e in vivo captan glutamina marcada, precursor del GLU (Pin y cols., 1989; Ryan y Schwartz, 1984; Schawartz y Ryan, 1986). Estos experimentos demuestran la presencia de GLU en las CCIs pero no su participación como neurotransmisor, ya que podría actuar como precursor de otro transmisor o simplemente en el metabolismo celular.

El ciclo glutamato-glutamina ha sido uno de los principales mecanismos propuestos para la inactivación y la reutilización del neurotransmisor (GLU) de las CCIs. La captura del GLU por

las células gliales, su conversión a glutamina por el enzima glutamina sintetasa y posterior liberación, seguida de la recaptura por las neuronas y su reconversión a GLU por la enzima glutaminasa es el ciclo metabólico propuesto para la inactivación y resíntesis del neurotransmisor en las sinapsis glutamatérgicas (Fonnum, 1985). Eybalin y Pujol (1983) demostraron en la cóclea que las células gliales de la lámina espiral ósea captan GLU marcado y lo metabolizan a glutamina, además esta glutamina es captada por las CCIs; pero no se ha podido demostrar la conversión de esta glutamina en GLU dentro de las CCIs. De la misma forma, estudios inmunocitoquímicos han puesto de manifiesto la escasa presencia de glutaminasa en las células ciliadas, tanto internas como externas (Fex y cols., 1985). Sin embargo, existen mecanismos alternativos de reutilización de GLU que han sido escasamente estudiados (Fonnum, 1991). Debido a la relativa lejanía entre las CCIs y las células gliales, se ha propuesto que éstas células gliales están implicadas en mecanismos de protección ante la excesiva (mayor de 12 μ M) concentración de GLU en la perilinfa.

La recaptura del GLU por el sistema eferente podría ser el principal mecanismo de inactivación de dicho neurotransmisor en la hendidura sináptica. Estudios autorradiográficos tanto in vitro (Eybalin y Pujol, 1983; Gulley y cols., 1979) como in vivo (Schwartz y Ryan, 1983 y 1986) muestran la recaptura de GLU marcado, así como el inmunomarcaje con anticuerpos antiglutamato (Altschuler y cols., 1989) en las fibras eferentes del haz espiral interno. Esta recaptación de GLU puede servir como mecanismo de protección ante la excitotoxicidad o simplemente servir de precursor de alguno de los neurotransmisores utilizados por estas fibras (GABA). Hay

que añadir que todos los estudios autorradiográficos mostraban un marcaje en las células que bordean la membrana basilar en la escala timpánica así como en las células de la membrana de Reissner, estos datos abogan por un mecanismo adicional de inactivación del exceso de GLU en la perilinfa.

La liberación de GLU por las CCIs ha sido un tema de difícil estudio debido a la existencia de los diversos mecanismos de inactivación que impiden una alta concentración de GLU en la perilinfa, por ello los primeros estudios de liberación de GLU a la perilinfa ante la estimulación sonora resultaron negativos (Medina y Drescher, 1981; Melamed y cols., 1982; Sewell y cols., 1980). Jenison y cols. (1985) perfundiendo la cóclea con perilinfa artificial con un alto contenido en potasio lograron demostrar que se producía liberación de GLU a la perilinfa y además esta liberación era dependiente de calcio. También se ha demostrado la liberación de GLU, dependiente de calcio por células del órgano de Corti in vitro (Lefebvre y cols., 1991). Existen también estudios electrofisiológicos (Rebillard y Bryant, 1989) que aportan datos a favor de esta liberación.

La administración perilinfática de GLU a altas concentraciones (100mM) produce una disminución de la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio coclear (Bobbin y Thompson, 1978; Comis y Leng, 1979; Jenison y cols., 1986; Klinke y Oertel 1977b). Esta disminución ha sido atribuida a un disparo asincrónico de las neuronas del ganglio coclear inducida por la alta presencia de glutamato. Los registros unitarios de estas fibras demuestran un aumento de la descarga espontánea y una disminución de estas descargas durante la estimulación sonora (Bobbin, 1979; Comis y Leng, 1979), que

conduciría a una disminución de la amplitud del potencial de acción compuesto. Estos resultados ha sido corroborados por Felix y Ehrenberger (Ehrenberger y Felix, 1991; Felix y Ehrenberger, 1990) aplicando GLU iontoforéticamente en el área subsináptica de las CCIs.

C.2. Receptores de glutamato en la cóclea

La presencia de los distintos subtipos de receptores de GLU en la cóclea se estudiado principalmente con la administración de los agonistas y antagonistas disponibles a la perilinfa y el subsiguiente registro electrofisiológico. Recientemente se han realizado estudios de hibridación in situ que muestran la presencia de mRNAs que codifican para NMDAR1 (Safieddine y Eybalin, 1992) y para GLUR-2 y 3 (Kuriyama y cols., 1992; Ryan y cols., 1991; Safieddine y Eybalin, 1992). Wenthold y colaboradores (1994) han demostrado con técnicas de PCR, hibridación in situ e inmunocitoquímica la presencia de subunidades del receptor AMPA/AK: GLUR2, 3 y 4; de AK: GLUR5 y 6, AK1 y 2; de NMDA: NR1, NR2A, B, C, y D en las neuronas del ganglio espiral, así como un marcaje para GLUR4 en las células gliales.

Los datos sobre la existencia de receptores NMDA en la cóclea eran negativos hasta los estudios de Puel y cols. (1991a) que indican una reducción del PAC a altas intensidades de estimulación cuando se administra NMDA, es decir, es necesaria una despolarización previa para que puedan ser activados los receptores NMDA.

Con respecto a los receptores no-NMDA, AMPA y AK, se han realizado estudios de administración perilinfática de los agonistas kainato, quisqualato y AMPA. La administración

perilinfática de AK reduce el PAC de una forma dosis dependiente, y a altas concentraciones produce una abolición completa, sin afectar a los potenciales microfónico, de sumación y endococlear (Bledsoe y cols., 1981; Jenison y cols., 1986; Kusakary y cols., 1984). Los registros unitarios muestran un aumento de la descarga espontánea, seguida de un silencio (Bledsoe y cols., 1981; Ehrenberger y Felix, 1991) ya que se ha comprobado que sólo 5 minutos después de la administración perilinfática de 1nmol de AK se produce un edema de todos los terminales dendríticos bajo las CCI's (Pujol y cols., 1985).

La administración de quisqualato, que actúa sobre receptores ionotrópicos tipo AMPA y sobre receptores metabotrópicos, produce una disminución del PAC sin afectar a los potenciales microfónicos ni de sumación (Jenison y Bobbin, 1985; Jenison y cols., 1986). Además en registros unitarios provoca un aumento de la descarga espontánea. Sin embargo no ha sido demostrada su toxicidad en cultivos in vitro de neuronas del ganglio espiral (Lefebvre y cols., 1991), aunque el AK sí es tóxico in vitro (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990b).

La administración de AMPA (Puel y cols., 1991b) produce una disminución del PAC sin afectar al potencial microfónico, además a altas dosis produce una hinchazón de todos los terminales dendríticos bajo las CCI's.

También se ha estudiado el efecto de la administración perilinfática de diversos antagonistas de los receptores de GLU. Así la administración de kinurenato, un antagonista de los receptores NMDA y no-NMDA, produce una disminución del PAC y un aumento de la latencia de la onda N1 probablemente haciendo menos sensible la respuesta de las neuronas ante el sonido (Puel y cols., 1988 y 1989a). La perfusión perilinfática de

quinoxalinedionas (CNQX y DNQX) antagonistas preferentemente de receptores no-NMDA provoca un descenso del PAC y un aumento de la latencia de la onda N1 (Littman y cols., 1989; Puel y cols., 1989b).

Por otra parte Cousillas y cols., (1988) utilizando un veneno de araña que bloquea los receptores AMPA pudo observar dos efectos sobre las fibras aferentes tipo I, dependiendo de su frecuencia de disparo espontánea. Así, las fibras de alta frecuencia de descarga fueron silenciadas, mientras que las de baja frecuencia de descarga sólo fueron silenciadas cuando se les aplicó un sonido estimulante.

Actualmente se hipotetiza la actuación del GLU sobre un conjunto de receptores que puede ser distinto según el subtipo de fibra aferente tipo I: las de alta frecuencia de descarga tendrían un alto componente de receptores tipo AMPA, mientras que las de baja frecuencia de descarga tendrían una mezcla de receptores AMPA y NMDA. Por otra parte aún queda por dilucidar la presencia de otros tipos de receptores metabotrópicos (AP-4, ACPD), tanto presinápticos como postsinápticos.

C.3. Neurotoxicidad de los análogos del glutamato

El estudio de la excitotoxicidad se ha llevado a cabo sobre todo en estudios in vivo con técnicas de perfusión perilinfática, así como en estudios de cultivos de células ganglionares, veremos los efectos neurotóxicos del AK, AMPA, QUI, NMDA y GLU.

La perfusión intracocular de AK provoca una neurotoxicidad que afecta a las fibras aferentes tipo I en el cobaya y rata adultos (Juiz y cols., 1989; Pujol y cols., 1985), hámsteres mayores de 7 días (Simmons y cols., 1990) y en ratas en

desarrollo (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a). Estos estudios demuestran que tras un corto periodo de supervivencia (5 minutos a 24 horas) se produce un edema de todos los terminales dendríticos de las fibras aferentes tipo I que es el primer paso de la muerte neuronal (Coyle, 1983). Después de un largo periodo de supervivencia (10 días) se produce una pérdida del 34% de las neuronas tipo I (Juiz y cols., 1989). El hecho de que sólo el 34% de las neuronas degeneren puede reflejar una distinta distribución de receptores sensibles a AK en las dos subpoblaciones de fibras eferentes tipo I o, de otro lado a la existencia de fenómenos de regeneración neuronal. La toxicidad del AK en las neuronas del ganglio espiral también se ha demostrado con técnicas de cultivos celulares (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990b; Lefebvre y cols., 1991).

La perfusión perilinfática de AMPA produce un edema en todos los terminales dendríticos tipo I, esta lesión es antagonizada por la administración conjunta de DNQX, un antagonista de los receptores tipo AMPA (Puel y cols., 1991b).

Con respecto al uso de QUI como neurotóxico, los datos existentes se refieren a la administración in vitro y sugieren que no hay pérdida neuronal (Lefebvre y cols., 1991). Sin embargo, existen estudios realizados en los canales semicirculares del cobaya que indican lesiones en las dendritas aferentes (Raymond y Desmadryl, 1989). Por otra parte, los datos electrofisiológicos apuntan a un efecto tanto de disminución del PAC (Jenison y cols., 1986) como de aumento de la actividad espontánea de las fibras tipo I (Ehrenberger y Feliz, 1991, Jenison y Bobbin, 1985). Estos resultados indican una actuación sobre los receptores tipo AMPA.

La ausencia de neurotoxicidad debida al NMDA en estudios in vivo (Puel y Pujol, 1992) se supone que es debida a la falta de despolarización previa necesaria para la activación de los receptores NMDA ya que existen estudios donde se demuestra el decremento del PAC a altas intensidades de estimulación (Puel y cols., 1991a). De otro lado, la neurotoxicidad del NMDA se ha demostrado en cultivos de neuronas del ganglio espiral tanto de neuronas procedentes de animales adultos como en desarrollo (Lefebvre y cols., 1991).

La neurotoxicidad del GMS ha sido demostrada con la administración diaria desde el día 2 al 9 PN en ratas Long-Evans que produce una pérdida neuronal con un gradiente que aumenta de base a ápex, así como un aumento del umbral de audición en los animales tratados, sobre todo en las frecuencias altas. Estos efectos fueron antagonizados por la administración de MK-801 y kinurenato lo que indicia que están implicado receptores NMDA aunque no se puede descartar la presencia de receptores no NMDA (Janssen y cols., 1991; Janssen, 1992). Los estudios in vitro también indican el efecto neurotóxico del GMS tanto en cultivos procedentes de animales en desarrollo como adultos (Lefebvre y cols., 1991), estos estudios demuestran que la toxicidad producida por el GLU es mayor que la producida sólo por kainato o por NMDA y semejante a la debida a la actuación conjunta de estas dos sustancias.

JUSTIFICACION

Hipótesis

En la cóclea, la liberación excesiva de GLU y/o el déficit de su recaptación podría ser la base fisiopatológica de las lesiones hipóxico/isquémicas que conducen a los diversos tipos de sordera neurosensorial. Durante el desarrollo de la vía auditiva las lesiones hipóxico/isquémicas que conduzcan a degeneración neural por la liberación excesiva de GLU pueden tener características diferentes a las lesiones que se instauren en el estado adulto. Esto podría ser debido a la presencia de distintos tipos de receptores o a la diferente concentración de los mismos en los diversos estadios de maduración, como sucede en otras regiones del sistema nervioso.

Objetivos

El presente trabajo tiene como principal objetivo el análisis morfofuncional de la neurotoxicidad inducida por GMS sobre animales (ratas) adultos y en desarrollo. Dentro de dicho objetivo se incluye un estudio comparado del grado de lesión alcanzado por diferentes niveles de dosis, distintos períodos de administración, que, además, se aplicarán a varios estadios de maduración. Dichos estadios se eligen como los más representativos de la maduración morfofuncional del receptor auditivo y serán:

1. Estadio de maduración de fibras aferentes
2. Estadio de maduración de fibras eferentes
3. Maduración funcional del tronco cerebral

MATERIAL Y METODOS

A. ANIMALES

Como animal de experimentación elegimos la rata por presentar un desarrollo de la vía auditiva que abarca las tres primeras semanas de vida. Concretamente escogimos la raza Long-Evans por ser pigmentada, ya que existen estudios que abogan por alteraciones congénitas de la audición en animales albinos (Bock y Steel, 1984; Moore y Kowalchuck, 1988).

Se utilizaron un total de sesenta y tres animales, veintisiete en edad adulta y treinta y seis en edad postnatal, repartidos en diferentes grupos como se refleja a continuación:

- **Grupo control:** Se han estudiado 14 animales adultos, siete hembras y siete machos.

- **Grupo I:** Grupo tratado con GMS 4mg/g/día. Se han estudiado 13 animales adultos que recibieron cuatro administraciones durante 4 días consecutivos.

- **Grupo II:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han estudiado 6 animales que recibieron una administración de GMS en el día dos PN.

- **Grupo III:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han estudiado 4 animales que recibieron una administración de GMS en el día seis PN.

- **Grupo IV:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han estudiado 2 animales que recibieron una administración de GMS en el día nueve PN.

- **Grupo V:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han estudiado 2 animales que recibieron una administración de GMS en el día quince PN.

- **Grupo VI:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han estudiado 3 animales que recibieron dos administraciones de GMS en los días dos y tres PN.

- **Grupo VII:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han estudiado 3 animales que recibieron tres administraciones de GMS durante los días dos, tres y cuatro PN.

- **Grupo VIII:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han estudiado 6 animales que recibieron ocho administraciones de GMS durante los días dos al nueve PN.

- **Grupo IX:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han estudiado 2 animales que recibieron dos administraciones de GMS durante los días seis y siete PN.

- **Grupo X:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han estudiado 7 animales que recibieron tres administraciones de GMS durante los días seis, siete y ocho PN.

- **Grupo XI:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se ha estudiado 1 animal que recibió tres administraciones de GMS durante los días once, doce y trece PN.

Las condiciones de estabulación de los animales fueron: acceso libre al agua, temperatura media de 22° C y se mantuvo el ritmo nictameral.

B. MATERIAL DE LABORATORIO

Se usó dos tipos de anestésicos: hidrato de cloral (300mg/Kg) y tiopental sódico (Abbott) (23mg/Kg). Como neurotóxico se utilizó glutamato monosódico (GMS) (sal monosódica del ácido L-glutámico) de Fluka en dosis de 4mg/g o 2mg/g peso en una solución de 400mg/ml de agua destilada.

Dentro del material histológico, la fijación de los tejidos se llevó a cabo con una solución de glutaraldehído 2,5% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4. Se usó como decalcificador ácido ascórbico al 2% con ClNa 0,3M a pH 2,6. La batería de alcoholes para la deshidratación fue:

H ₂ O destilada	2 pases x 10 min
Etanol al 50%	1 pase x 10 min
Etanol al 70%	2 pases x 10 min
Etanol al 96%	3 pases x 10 min
Etanol al 100%	3 pases x 10 min
Oxido de propileno	3 pases x 10 min

La osmificación con tetróxido de osmio al 4% en tampón fosfato 0,2M. La resina de inclusión SPURR fue preparada con NSA 26g, ERL 4206 10g, DER 6g y DMAE S-1 0,4g. La polimerización se llevó a cabo en un estufa marca Heraeus.

Los cortes semifinos se hicieron mediante un ultramicrotomo LKB III Ultratome. La tinción fue con Azul de Richardson al 0,1% en tampón McIlvaine, pH 6.4 (ácido cítrico 0,1M, 61,5ml y fosfato disódico 0,2M, 138,5ml) y el medio de montaje fue Eukit.

C. MATERIAL ELECTROFISIOLÓGICO

Antes de abordar la descripción del material electrofisiológico utilizado daremos unas breves nociones sobre el soporte técnico que acompaña al registro de los potenciales evocados auditivos (López-Moya, 1992).

Para obtener un potencial evocado se necesitan varios instrumentos como son: electrodos, amplificadores, un convertidor analógico digital, un promediador y un sistema de generación de estímulos. Los cuales pasamos a detallar:

a.- Electrodos

Los electrodos pueden ser metálicos o micropipetas rellenas de una solución salina. Ambos son conductores que permiten recoger la señal bioeléctrica y transportarla al resto de los sistemas. La actividad eléctrica que se genera alrededor del

electrodo debido a la actividad bioeléctrica, movimiento de partículas con carga, producida en las neuronas es recogida por el electrodo al producirse también en él una migración de partículas cargadas. Utilizando electrodos de metal se recogen los cambios de potencial producidos en la zona que rodea al electrodo, por lo tanto es un potencial de los llamados de campo. Con las micropipetas es posible registrar la actividad eléctrica de una célula e incluso de unos pocos canales iónicos, estos registros se denominan potenciales intracelulares.

En este trabajo utilizamos electrodos de metal y registramos potenciales de campo.

Una medida importante es la impedancia, la resistencia, que se produce al paso de corriente entre el electrodo y el área circundante, que es dependiente, entre otros factores, del tipo de material del electrodo. El más usado es la plata, el registro de la actividad eléctrica se produce por la formación en la superficie del electrodo de cloruro de plata.

b.- Sistema de amplificación

Con esto se consigue que la débil actividad bioeléctrica recogida, en la escala de μV o mV , adquiera un tamaño, entre 1 y 10 Voltios, que pueda ser manejado por el resto de los sistemas. Las características de un amplificador fisiológico son:

- Sensibilidad. Establece cuál es el máximo voltaje de entrada admitido.

- Ganancia. Es el factor por el que se multiplica la entrada diferencial. Un amplificador fisiológico posee una entrada positiva y otra negativa, la diferencia de voltaje que

aparece entre ellas se multiplica por un factor cuyo resultado constituye la ganancia del sistema.

- Polaridad diferencial. Una diferencia de voltaje, positivo o negativo, en la entrada produce un desplazamiento vertical, ascendente o descendente, en la pantalla del osciloscopio. Según coloquemos el electrodo activo, positivo o negativo, con respecto al electrodo de referencia, obtendremos curvas con pendiente ascendente o descendente en la pantalla del osciloscopio.

- Filtros analógicos. La señal recogida por los electrodos está mezclada con un ruido de fondo que es producido por la actividad bioeléctrica propia del animal y por las interferencias eléctricas ambientales. Mediante el filtrado conseguimos una relación señal/ruido adecuada. Existen fundamentalmente dos tipos de filtros: los de paso alto, que impiden la entrada de frecuencias más bajas a la fijada, y los de paso bajo que eliminan las frecuencias altas.

- Impedancia de entrada. Es la resistencia al paso de la corriente en las conexiones de entrada al amplificador y deberá ser lo más alta posible para que la señal recogida sea presentada al amplificador sin ninguna pérdida.

c.- Convertidor analógico digital

La señal procedente del amplificador es continua y debe ser convertida en señal digital para que sea tratada por un ordenador.

d.- Promediador

Debido a que la señal biológica generada por un estímulo es siempre constante, mientras que el ruido de fondo es siempre aleatorio, el promedio de una forma de onda constante siempre será el mismo, mientras que el de una onda aleatoria siempre

tenderá a cero. El número adecuado de promediación viene dado por la amplitud de la señal que queremos registrar y por la amplitud del ruido de fondo.

e.- Sistema de generación del estímulo.

El estímulo auditivo utilizado debe poseer unas condiciones determinadas que permitan ser controladas y cuantificadas. Estos estímulos son enviados por un generador de funciones que nos permite controlar sus características de duración, intensidad, ritmo de repetición y tipo de efecto en la membrana timpánica que puede ser condensación o rarefacción según si provoca un movimiento de avance o retroceso, respectivamente.

Los principales tipos de estímulos son:

- Clicks, definidos como ondas cuadradas, contiene gran energía y un espectro de frecuencias muy ancho, entre 500 y 20.000 Hz, lo que permite estimular toda la cóclea. Su tiempo de duración es de microsegundos.

- Clicks filtrados, son ondas cuadradas de varios milisegundos de duración que contienen una sola frecuencia.

- Tonos en salvas, son ondas con una frecuencia característica y una envolvente trapezoidal.

- Ruido blanco, presenta como el click una amplia gama de frecuencias y se presenta de manera continua para conseguir un enmascaramiento de la actividad del oído contralateral.

El estímulo viene definido por su intensidad, medida en dB, y su frecuencia, medida en Hz. Existen varios tipos de medidas en dB según la referencia utilizada. En estudios de acústica se utiliza el dB SPL (Sound Pressure Level) que relaciona la intensidad física producida con la sensación auditiva percibida. El decibelio corresponde a la más pequeña cantidad de sonido capaz de estimular el oído humano en la

frecuencia de 1000 Hz. El valor de la intensidad en decibelios viene dada por la fórmula $20 \log P / (2 \cdot 10^{-4} \text{ dinas/cm}^2)$ siendo P la presión del sonido problema. La frecuencia viene definida por el número de vibraciones, o ciclos, por unidad de tiempo. El Hercio es por tanto un ciclo por segundo.

En cuanto a la forma de presentación del estímulo, esta puede ser de dos tipos: en campo libre o mediante auriculares.

En nuestro estudio se utilizó una unidad compacta de potenciales evocados Mistral SM280M de Medelec Internacional para la recogida de todas las mediciones (amplificación, digitalización, medición e impresión). Los estímulos fueron generados por un sintetizador de funciones HP 8904A conectado al Mistral.

Se utilizaron dos tipos de electrodos uno de plata recubierto de teflón excepto en la punta que fue redondeada al fuego y otro de acero inoxidable.

La exposición de la bulla y su apertura se realizó bajo una lupa estereoscópica (Wild) y se utilizó material de microcirugía: bisturí, pinzas de relojero, tijeras, separadores, agujas histológicas, etc.

D. ADMINISTRACION DE GMS

La administración del fármaco siempre se realizó por vía intraperitoneal tanto en animales adultos como en animales en desarrollo. El GMS, 4mg/g o 2mg/g de peso, fue disuelto en un volumen de 10ml o 5ml de suero salino y administrado a temperatura corporal (36-37°C). En los animales en desarrollo se consideró el día de su nacimiento como día cero de vida.

E. TECNICA ELECTROFISIOLOGICA

El estudio fisiológico siempre se llevó a cabo en edad adulta. Los animales adultos tenían una edad igual o superior a 2 meses, mientras que en los animales tratados durante el desarrollo una parte fue registrada al mes y otra a los dos meses de vida. Los animales tratados durante el desarrollo y 8 animales machos adultos fueron anestesiados intraperitonealmente con hidrato de cloral (300mg/kg), mientras que se usó tiopental sódico (23mg/kg) para 8 animales hembras controles y los tratados con GMS en edad adulta. Se efectuó alguna administración adicional cuando las mediciones se prolongaron más de 1 hora.

Los registros se llevaron a cabo en una caja anecoica que filtraba un ruido exterior inferior a los 30 dBA, según la lectura de un sonómetro PROMAX 120.

Para la electrococleografía el animal fue traqueotomizado, introduciéndose una sonda endotraqueal que se conectó a un respirador automático (SRI) que se mantuvo a un ritmo respiratorio de 80 p/s, y se procedió a la visualización de la bulla mediante incisión en la zona lateral del cuello y disección de los músculos digástrico, esternomastoideo y omohioideo, en la bulla se practicó una pequeña abertura en la parte posterior lateral que permitía la visualización de la ventana redonda sobre la cual se colocó un electrodo de plata recubierto de teflón excepto en la punta que fue redondeada para evitar la rotura de la membrana de la ventana redonda. El electrodo de referencia fue colocado en la musculatura mandibular ipsilateral y el de tierra en la zona axilar contralateral.

Los estímulos fueron clicks filtrados de 16, 12, 8 y 4 KHz generados por el sintetizador de funciones, la estimulación se realizó siguiendo el orden de frecuencias arriba mencionado. Los clicks filtrados tuvieron una duración de 10ms, la frecuencia de repetición fue de 10 estímulos por segundo y se tomaron un total de 64 mediciones.

Debido a la carencia de un sistema adecuado de medición de la intensidad acústica emitida por el auricular conectado al generador de funciones, nos referimos a una serie de intensidades representadas por el voltaje de salida del generador de funciones que fueron según la frecuencia utilizada:

- **16 KHz:** (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV.

- **12 KHz:** (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV.

- **8 KHz:** (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV.

- **4 KHz:** (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV

Las primeras 6 medidas de cada frecuencia corresponden a una gama de intensidades entre 90 y 30 dBA medidas mediante un sonómetro PROMAX 120.

Para 5 animales pertenecientes a los grupos IV (2 animales), V (2), y XI (1) se usó una gama de intensidades más restringida:

- 16 KHz: 39, 36, 33, 32, 31, 30, 29.

- 12 KHz: 28, 27, 24, 21, 20, 19, 18.

- 8 KHz: 17, 13, 12, 11, 10, 9.

- 4KHz: 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.

En todo momento se controló la temperatura del animal por medio de un termómetro rectal a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. La temperatura del animal se mantuvo por medio de una manta eléctrica.

F. TECNICA MORFOLOGICA

Una vez finalizado el registro de los potenciales bioeléctricos en ambos oídos se decapitó el animal, todavía bajo anestesia profunda, y tras incisión craneal media y retirada del encéfalo se realizó la extracción de ambos huesos temporales. Bajo microscopio estereoscópico, y manteniendo los tejidos en fijador (glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.1M) se procedió a la disección fina coclear. Las cócleas se mantuvieron en la mezcla fijadora durante 2 horas. Se lavaron con tampón fosfato y se introdujeron en ácido ascórbico al 2% para su decalcificación. La decalcificación se realizó durante 15 días, renovándose la solución decalcificadora diariamente.

Las piezas, una vez decalcificadas, se incubaron en ácido ósmico al 4% en tampón fosfato 0.2M durante una hora en oscuridad y bajo agitación. Procediéndose a continuación a su deshidratación en concentraciones crecientes de etanol y a su inclusión en resina (Spurr) que se prolongó durante tres días. El primer día las piezas se incubaron en vacío con 50% de spurr y 50% de óxido de propileno. El segundo día se incubaron en vacío con spurr puro. El tercer día se incubaron de nuevo en vacío con spurr puro y se procedió a la polimerización de la resina en estufa de 60°C durante 48 horas.

Los bloques fueron tallados hasta alcanzar la zona midmodiolar donde se obtuvieron cortes semifinos ($1\mu\text{m}$) en un

ultramicrotomo. Por término medio se realizaron tres preparaciones histológicas de cada bloque, cada una de las cuales contenía una media de 6 cortes seriados. Los cortes se tiñeron con azul de Richardson al 0.1M y se montaron con Eukit.

Para el estudio histológico se realizó la observación microscópica de los cortes semifinos seriados, de las cócleas tratadas y los controles. Además de comprobar la indemnidad histológica de todas las estructuras que constituyen el órgano de Corti, se analizó la presencia de las vacuolizaciones en el plexo espiral interno bajo las CCIs, ya que estos son los signos patológicos mayores descritos tras la administración intracoclear de agonistas del GLU (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a; Puel y cols., 1994; Pujol y cols., 1985).

G. ESTUDIO ESTADISTICO

Con los datos fisiológicos, latencia y amplitud de la onda N1 (se midió la latencia como el tiempo, en milisegundos, transcurrido desde el inicio del estímulo hasta la aparición de la primera deflexión negativa del PAC; y la amplitud como la diferencia de voltaje obtenida entre la línea basal y el máximo voltaje que alcanzó la onda N1), así como de los valores umbral (mínima intensidad de estimulación a la que apareció la onda N1) obtenidos se llevó a cabo un estudio de comparación de medias mediante el test de "t" de Student.

Con respecto a las representaciones gráficas, la amplitud y la latencia, se representaron utilizando los valores medios más el error standard de la media en gráficos de líneas; no obstante, para las representaciones de los umbrales se utilizaron los valores medios más la desviación standard en gráficos de barras.

RESULTADOS

A. ANIMALES CONTROLES

Dentro del grupo de animales controles se registraron siete animales machos y siete animales hembras adultos (edad igual o superior a 2 meses). Los valores de latencia en los animales hembras presentaron una mayor dispersión que en los animales machos pero las medias no fueron estadísticamente significativas, excepto la intensidad 39 ($p < 0,5$) (tabla I y figura 1). Los valores de amplitud fueron semejantes en ambos grupos, excepto en las intensidades 3 y 2 ($p < 0,5$) y mostraron una dispersión aproximadamente del 50% (tabla I y figura 2). En cuanto al umbral de audición, los valores obtenidos en los machos fueron ligeramente superiores, aunque no significativamente diferentes a los obtenidos en las hembras a 12, 8 y 4 KHz (tabla 1 y figura 3). Estos resultados nos permitieron agrupar los datos obtenidos en un único grupo control.

Con respecto a los resultados morfológicos, no se pudo observar ninguna diferencia entre las cócleas pertenecientes a animales machos o hembras (Plancha 1).

TABLA I: Latencias y amplitudes de los grupos control machos y hembras

16KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	MACHOS			HEMBRAS				MACHOS			HEMBRAS		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
39	14	0,80	0,04	14	0,85	0,05	*	14	63,91	37,88	14	57,78	18,10	NS
38	14	0,92	0,05	14	0,98	0,10	NS	14	55,34	32,15	14	55,83	22,63	NS
37	14	1,01	0,03	14	1,04	0,11	NS	14	43,16	21,80	14	42,39	16,77	NS
36	14	1,08	0,04	14	1,08	0,11	NS	14	30,76	16,28	14	32,19	13,44	NS
35	14	1,16	0,04	14	1,21	0,14	NS	14	11,81	6,71	14	13,20	6,93	NS
34	14	1,19	0,06	14	1,23	0,13	NS	14	8,35	4,86	14	9,27	4,60	NS
33	14	1,24	0,08	14	1,25	0,13	NS	14	5,84	3,37	14	5,97	3,03	NS
32	14	1,32	0,08	14	1,33	0,14	NS	14	4,10	2,38	14	3,83	2,06	NS
31	14	1,43	0,09	14	1,43	0,17	NS	14	2,58	1,31	14	2,84	1,41	NS
30	14	1,61	0,22	13	1,52	0,18	NS	14	1,30	0,74	13	2,01	1,25	NS
29	7	1,68	0,32	8	1,59	0,18	NS	7	1,05	0,56	8	1,34	0,69	NS

12KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	MACHOS			HEMBRAS				MACHOS			HEMBRAS		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
28	14	0,78	0,03	14	0,79	0,06	NS	14	91,99	62,43	14	81,03	48,30	NS
27	14	0,79	0,04	14	0,81	0,06	NS	14	78,75	48,13	14	78,66	40,40	NS
26	14	0,88	0,03	14	0,93	0,11	NS	14	61,91	38,01	14	65,47	29,90	NS
25	14	0,92	0,05	14	0,97	0,11	NS	14	48,60	28,02	14	55,03	24,56	NS
24	14	1,02	0,04	14	1,00	0,08	NS	14	31,08	16,60	14	34,87	12,87	NS
23	14	1,06	0,04	14	1,08	0,10	NS	14	25,44	13,59	14	28,51	13,50	NS
22	14	1,12	0,04	14	1,13	0,12	NS	14	22,31	11,76	14	23,20	12,08	NS
21	14	1,19	0,05	14	1,17	0,10	NS	14	14,61	8,08	14	15,54	8,56	NS
20	14	1,26	0,06	14	1,26	0,11	NS	14	7,79	4,98	14	10,09	7,80	NS
19	14	1,32	0,10	14	1,32	0,11	NS	14	2,94	2,61	14	4,60	4,86	NS
18	7	1,33	0,12	10	1,42	0,13	NS	7	1,18	0,81	10	1,37	1,31	NS

8KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	MACHOS			HEMBRAS				MACHOS			HEMBRAS		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
17	14	0,89	0,05	14	0,93	0,09	NS	14	59,75	31,83	14	63,24	28,14	NS
16	14	0,99	0,04	14	1,03	0,13	NS	14	39,76	20,31	14	48,90	21,30	NS
15	14	1,06	0,03	14	1,09	0,13	NS	14	29,63	15,36	14	37,11	14,88	NS
14	14	1,12	0,05	14	1,15	0,12	NS	14	24,13	12,52	14	27,45	10,88	NS
13	14	1,36	0,07	14	1,30	0,15	NS	14	7,59	4,28	14	10,88	5,31	NS
12	14	1,45	0,07	14	1,44	0,12	NS	14	4,18	2,56	14	5,85	3,34	NS
11	14	1,58	0,10	14	1,56	0,14	NS	14	2,17	1,47	14	3,07	1,71	NS
10	10	1,69	0,11	13	1,65	0,13	NS	10	1,13	0,72	13	2,14	1,36	NS
9	5	1,81	0,21	10	1,76	0,11	NS	5	0,76	0,29	10	0,95	0,48	NS

4KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	MACHOS			HEMBRAS				MACHOS			HEMBRAS		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
8	14	1,04	0,06	14	1,09	0,12	NS	14	37,58	18,24	14	41,08	22,36	NS
7	14	1,19	0,09	14	1,16	0,14	NS	14	22,03	9,72	14	29,64	11,95	NS
6	14	1,26	0,04	14	1,27	0,12	NS	14	13,89	6,44	14	16,45	8,39	NS
5	14	1,45	0,10	14	1,42	0,12	NS	14	7,75	4,81	14	8,08	4,04	NS
4	14	1,75	0,13	14	1,70	0,15	NS	14	2,52	1,63	14	3,66	2,02	NS
3	13	1,94	0,18	13	1,82	0,14	NS	13	1,39	1,09	13	2,79	1,67	*
2	9	2,03	0,16	11	1,99	0,17	NS	9	0,87	0,50	11	1,77	1,05	*
1	3	2,10	0,15	8	2,11	0,22	NS	3	0,59	0,30	8	0,80	0,48	NS

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

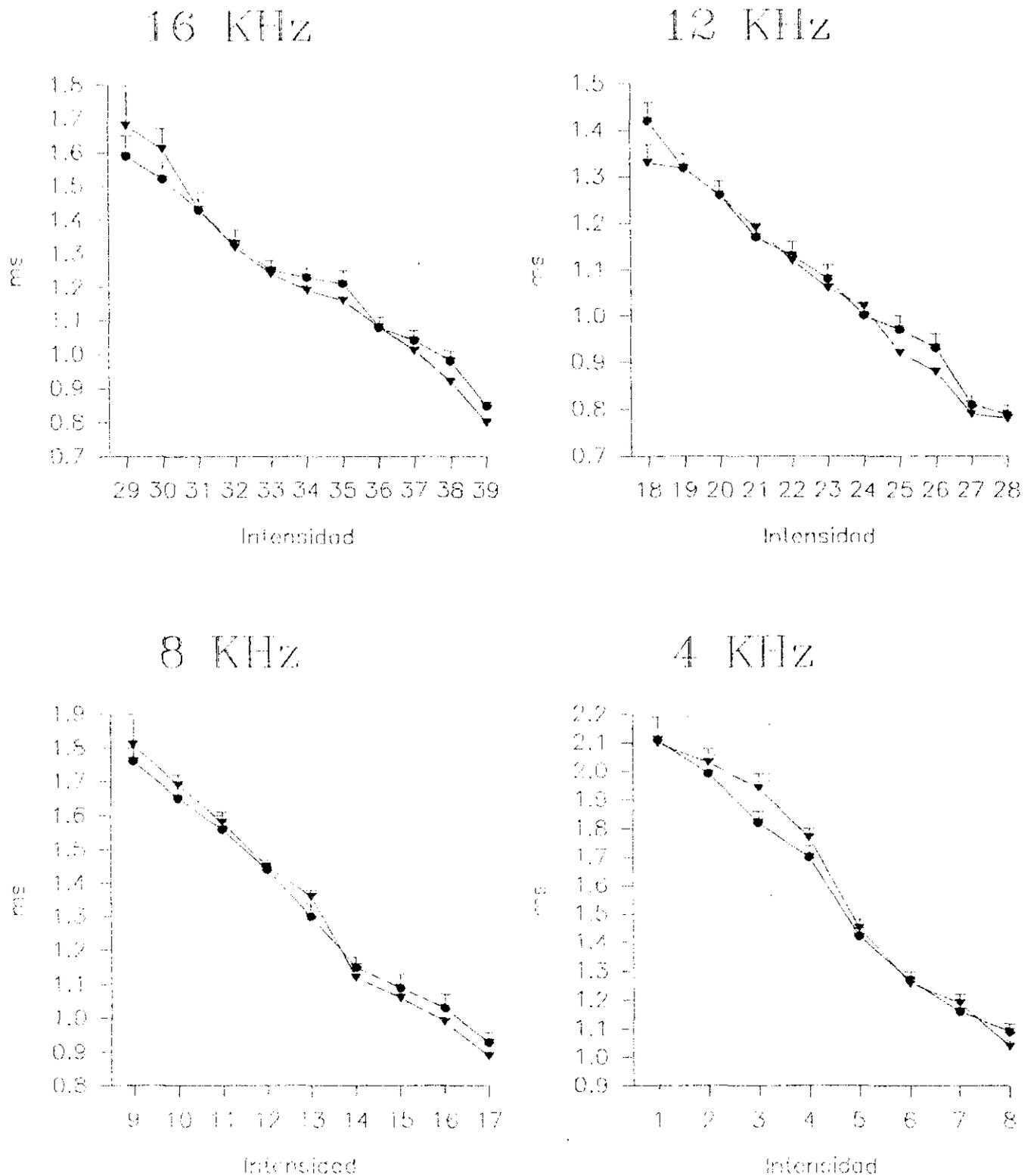
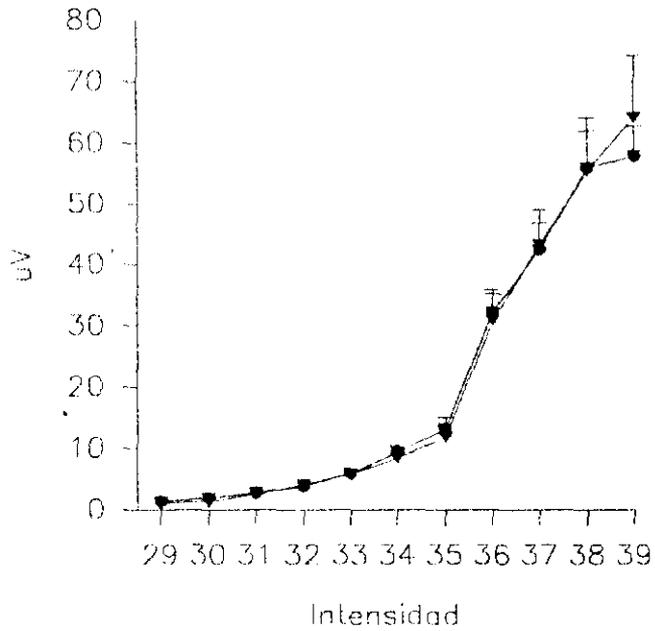


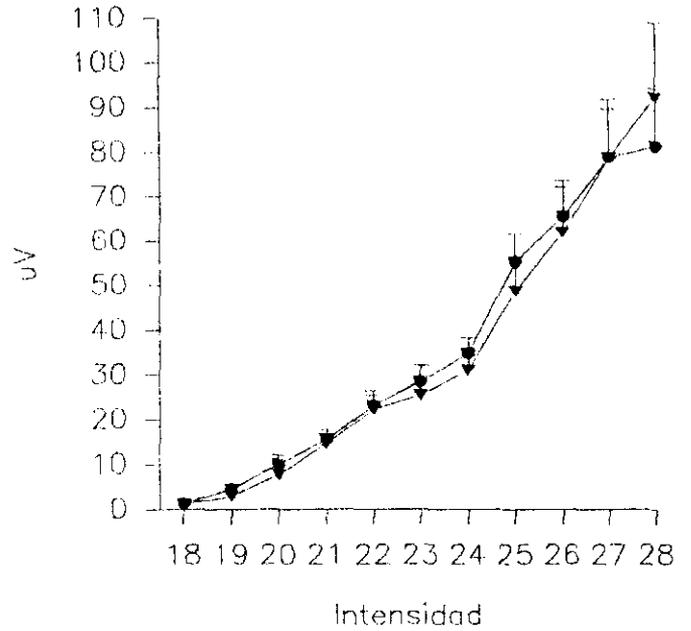
Figura 1: Latencias obtenidas en los animales controles

● Hembras (N=14); ▼ Machos (N=14)

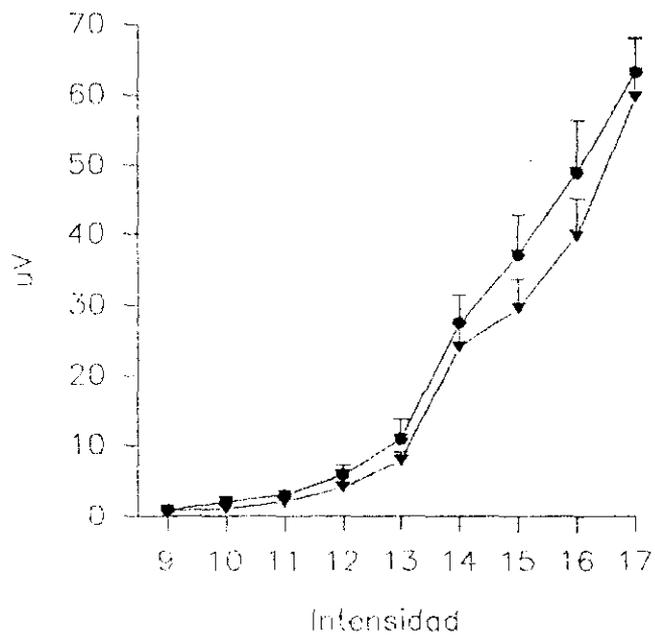
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

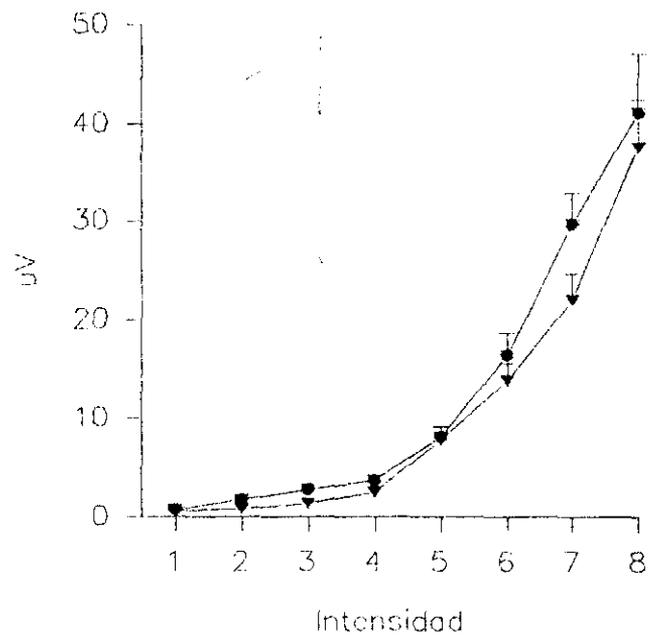


Figura 2: Amplitudes obtenidas en los animales controles

● Hembras (N=14); ▼ Machos (N=14)

TABLA 1: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en los animales controles machos y hembras

FRECUENCIA	MACHOS			HEMBRAS			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	14	29,50	0,65	14	29,50	0,65	NS
12 KHz	14	18,50	0,52	14	18,29	0,47	NS
8 KHz	14	9,93	0,83	14	9,36	0,63	NS
4 KHz	14	2,21	0,89	14	1,71	0,99	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

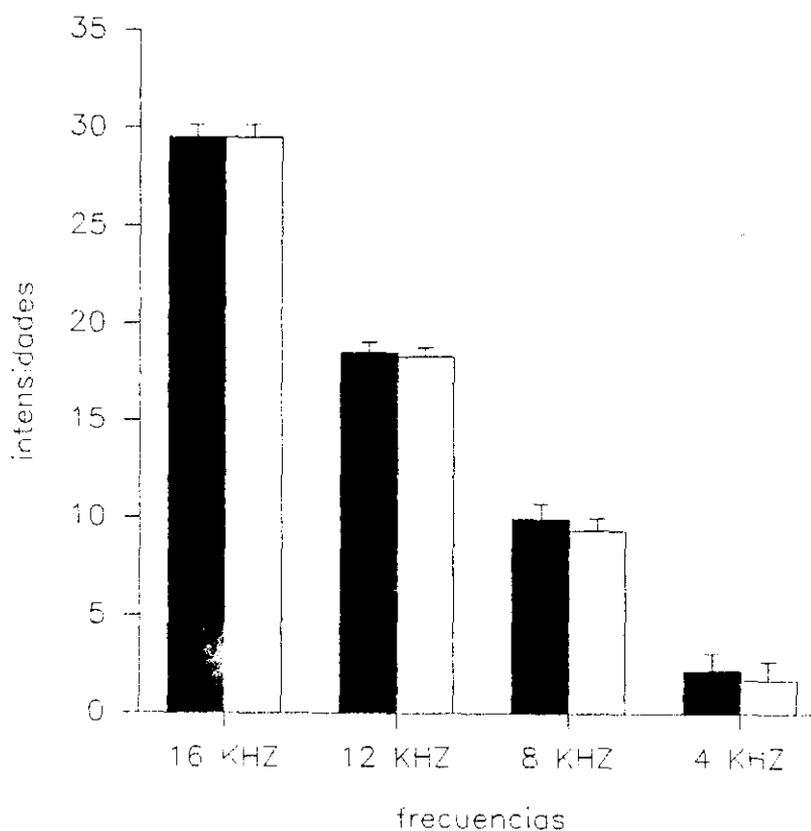


Figura 3: Umbrales (X+DS) de los grupos control machos (■, N= 14) y hembras (□, N= 14)



Figura 1: Animal adulto joven (30 días) perteneciente al grupo Control. a) Detalle de un órgano de Corti sin signos patológicos (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)). b) Detalle del ganglio espiral, con la población normal de neuronas. Obsérvese la proximidad de los elementos celulares y los muy escasos espacios vacíos. (a: Obj.40x; b: Obj.20x)

B. ANIMALES TRATADOS

Los diferentes tratamientos produjeron una distinta mortandad en los animales que es comentada en cada grupo; sin embargo consideramos oportuno reflejar los cambios ocurridos en el listado de material y métodos, que queda como sigue:

- **Grupo control:** Se han utilizado registros de 14 animales adultos, siete hembras y siete machos.

- **Grupo I:** Grupo tratado con GMS 4mg/g/día. Se han utilizado registros de 8 animales adultos que recibieron cuatro administraciones durante 4 días consecutivos.

- **Grupo II:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han utilizado registros de 5 animales que recibieron una administración de GMS en el día dos PN.

- **Grupo III:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han utilizado registros de 4 animales que recibieron una administración de GMS en el día seis PN.

- **Grupo IV:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han utilizado registros de 2 animales que recibieron una administración de GMS en el día nueve PN.

- **Grupo V:** Grupo tratado con GMS 4mg/g. Se han utilizado registros de 2 animales que recibieron una administración de GMS en el día 15 PN.

- **Grupo VI:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han utilizado registros de 3 animales que recibieron dos administraciones de GMS en los días 2 y 3 PN.

- **Grupo VII:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han utilizado registros de 2 animales que recibieron tres administraciones de GMS durante los días 2, 3 y 4 PN.

- **Grupo VIII:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han utilizado registros de 3 animales que recibieron ocho administraciones de GMS durante los días 2 al 9 PN.

- **Grupo IX:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han utilizado registros de 2 animales que recibieron dos administraciones de GMS durante los días 6 y 7 PN.

- **Grupo X:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se han utilizado registros de 5 animales que recibieron tres administraciones de GMS durante los días 6, 7 y 8 PN.

- **Grupo XI:** Grupo tratado con GMS 2mg/g/día. Se ha utilizado registros de 1 animal que recibió tres administraciones de GMS durante los días 11, 12 y 13 PN.

B.1. Grupo I

En este grupo se usaron 13 ratas Long-Evans hembras adultas que recibieron una dosis diaria de 4mg de GMS por gramo de peso por medio de la administración intraperitoneal de una solución de 400mg de GMS en 1 ml de agua destilada durante cuatro días consecutivos.

La administración de GMS provocó crisis convulsivas observadas al cabo de aproximadamente una hora después de la administración del fármaco en cinco animales que murieron en distintas etapas del tratamiento: 2 el primer día, 2 el segundo día y uno el cuarto día. En los restantes 8 animales no se observaron convulsiones u otro síntoma, como posturas atípicas en la hora siguiente a la administración del fármaco.

En el estudio de la latencia se observó que ésta no difería de la obtenida en el grupo control aunque, al igual que en las hembras controles presentó una desviación mayor que los animales machos (tabla II). Se pudo observar un discreto

incremento de las latencias a altas frecuencias (16 y 12 KHz), que fue significativo ($p < 0,5$) a las intensidades de estimulación 39 y 27 (tabla II y figura 4).

Las amplitudes obtenidas en el grupo I presentaron un desviación de aproximadamente el 50% y las medias fueron menores, estadísticamente significativas, incluso con $p < 0,001$ en altas intensidades, a todas las frecuencias exceptuando los valores próximos al umbral (tabla II y figura 5).

Los valores del umbral de audición fueron superiores frente a los obtenidos en los animales controles a todas las frecuencias y se hicieron significativos ($p < 0,5$) para 16 KHz (tabla 2 y figura 6).

Las cócleas que en el estudio electrofisiológico presentaron una mayor latencia y menor amplitud resultaron ser en las que se observó un mayor daño neurotóxico a nivel de las fibras del plexo espiral interno, preferentemente en espiras basales aunque también en espiras medias y en una ubicación modiolar bajo las CCI's. En otras cócleas, las que presentaron valores de latencia, amplitud y umbral cercanas a los valores controles, se pudo observar un efecto neurotóxico menor y casi siempre en espiras basales. Por otra parte hay que señalar que no hubo pérdida neuronal en el ganglio espiral (plancha 2).

TABLA II: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo I

16KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO I				CONTROL			GRUPO I			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
39	28	0,83	0,05	16	0,89	0,09	*	28	60,85	29,30	16	32,99	14,87	**
38	28	0,95	0,09	16	0,94	0,12	NS	28	55,59	27,28	16	28,47	13,97	***
37	28	1,02	0,08	16	1,02	0,13	NS	28	42,78	19,08	16	24,59	13,22	**
36	28	1,08	0,08	16	1,09	0,15	NS	28	31,48	14,67	16	18,58	11,34	**
35	28	1,18	0,10	16	1,21	0,15	NS	28	12,50	6,73	16	8,56	6,15	NS
34	28	1,21	0,10	16	1,26	0,18	NS	28	8,81	4,67	16	5,25	4,50	*
33	28	1,25	0,10	16	1,32	0,21	NS	28	5,91	3,14	16	3,63	3,38	*
32	28	1,33	0,12	15	1,38	0,19	NS	28	3,96	2,19	15	2,34	2,18	*
31	28	1,43	0,13	14	1,45	0,20	NS	28	2,71	1,34	14	1,70	1,38	*
30	27	1,56	0,20	8	1,49	0,16	NS	27	1,64	1,06	8	1,46	0,86	NS
29	15	1,63	0,25	7	1,57	0,20	NS	15	1,21	0,63	7	0,84	0,48	NS

12KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO I				CONTROL			GRUPO I			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
28	28	0,79	0,05	16	0,82	0,09	NS	28	86,51	55,06	16	35,28	16,17	***
27	28	0,80	0,05	16	0,85	0,09	*	28	78,71	43,60	16	33,99	13,96	***
26	28	0,91	0,08	16	0,90	0,10	NS	28	63,69	33,60	16	30,63	14,73	***
25	28	0,94	0,09	16	0,93	0,10	NS	28	51,81	26,06	16	28,19	14,35	**
24	28	1,01	0,07	16	1,04	0,13	NS	28	32,98	14,70	16	21,55	11,52	**
23	28	1,07	0,08	16	1,09	0,15	NS	28	26,98	13,38	16	17,80	10,21	*
22	28	1,13	0,09	16	1,16	0,20	NS	28	22,75	11,70	16	13,88	9,01	**
21	28	1,18	0,08	16	1,24	0,23	NS	28	15,07	8,18	16	10,00	7,45	NS
20	28	1,26	0,09	14	1,27	0,17	NS	28	8,94	6,53	14	7,82	5,47	NS
19	28	1,32	0,10	12	1,33	0,16	NS	28	3,77	3,92	12	4,43	4,30	NS
18	17	1,38	0,13	8	1,42	0,19	NS	17	1,29	1,10	8	1,60	1,31	NS

8KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO I				CONTROL			GRUPO I			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
17	28	0,91	0,08	16	0,92	0,09	NS	26	61,50	29,53	16	32,74	14,76	***
16	28	1,01	0,10	16	0,99	0,11	NS	28	44,33	20,94	16	24,99	11,78	**
15	28	1,07	0,10	16	1,05	0,10	NS	28	33,37	15,32	16	19,64	9,38	**
14	28	1,13	0,09	16	1,12	0,13	NS	28	25,79	11,63	16	14,84	7,19	**
13	28	1,33	0,12	16	1,34	0,17	NS	28	9,23	5,02	16	6,79	5,08	NS
12	28	1,44	0,10	15	1,42	0,18	NS	28	5,02	3,04	15	4,86	3,16	NS
11	28	1,57	0,12	13	1,50	0,15	NS	28	2,62	1,63	13	2,80	1,47	NS
10	23	1,67	0,12	11	1,62	0,17	NS	23	1,70	1,22	11	1,50	0,78	NS
9	15	1,78	0,15	8	1,76	0,13	NS	15	0,89	0,42	8	0,82	0,51	NS

4KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO I				CONTROL			GRUPO I			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
8	28	1,07	0,10	15	1,01	0,09	NS	28	39,33	20,10	15	20,06	7,57	**
7	28	1,18	0,12	15	1,15	0,13	NS	28	25,83	11,37	15	13,37	6,81	***
6	28	1,27	0,09	15	1,26	0,12	NS	28	15,17	7,45	15	9,11	4,70	**
5	28	1,43	0,11	15	1,45	0,16	NS	28	7,92	4,36	15	4,69	2,39	*
4	28	1,72	0,14	14	1,73	0,18	NS	28	3,09	1,89	14	2,09	1,32	NS
3	26	1,88	0,17	13	1,88	0,25	NS	26	2,09	1,55	13	1,41	0,95	NS
2	20	2,01	0,17	9	1,97	0,23	NS	20	1,37	0,95	9	1,05	0,51	NS
1	11	2,11	0,20	4	2,06	0,18	NS	11	0,74	0,44	4	0,69	0,25	NS

KHz= Kilociercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

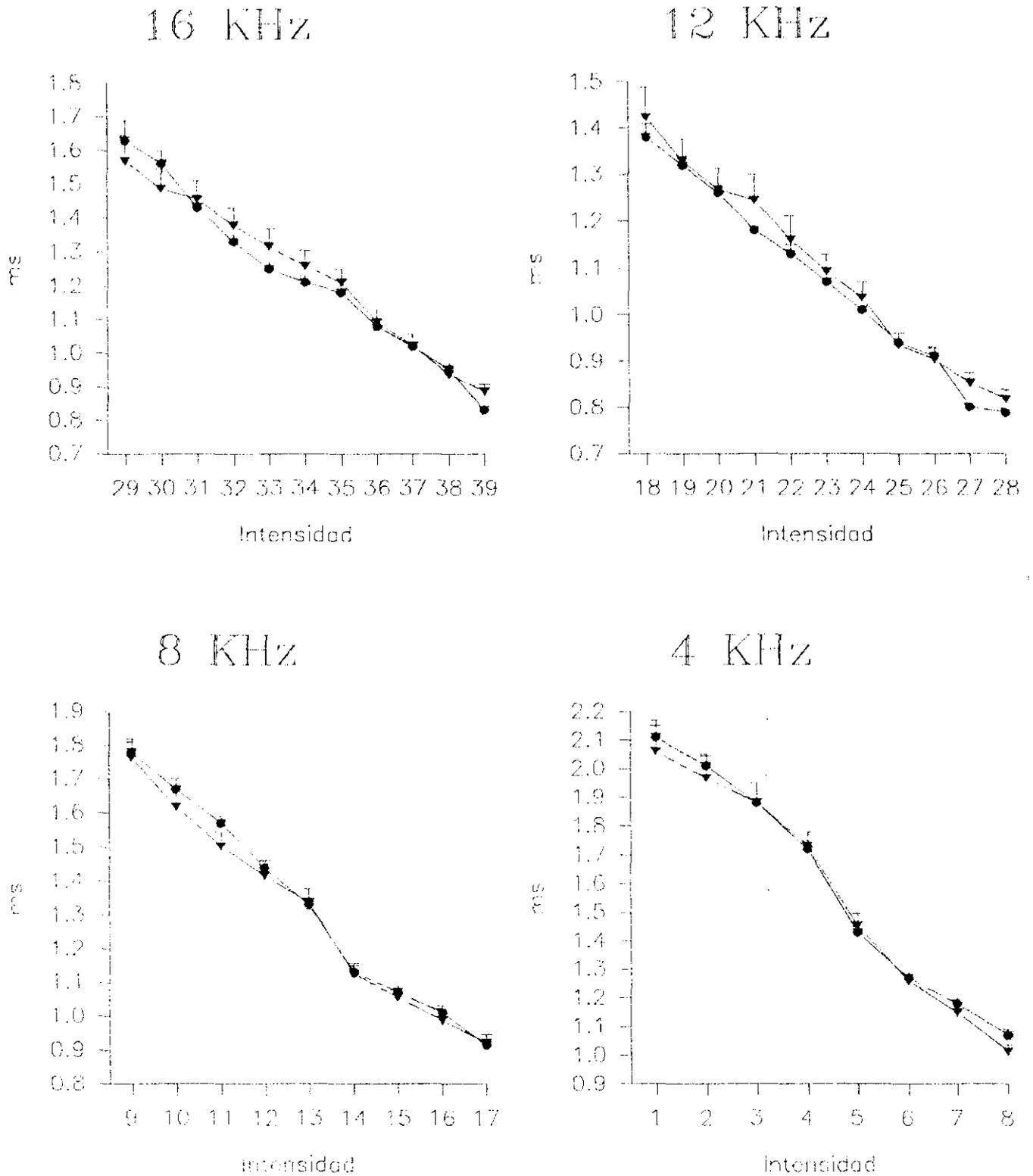
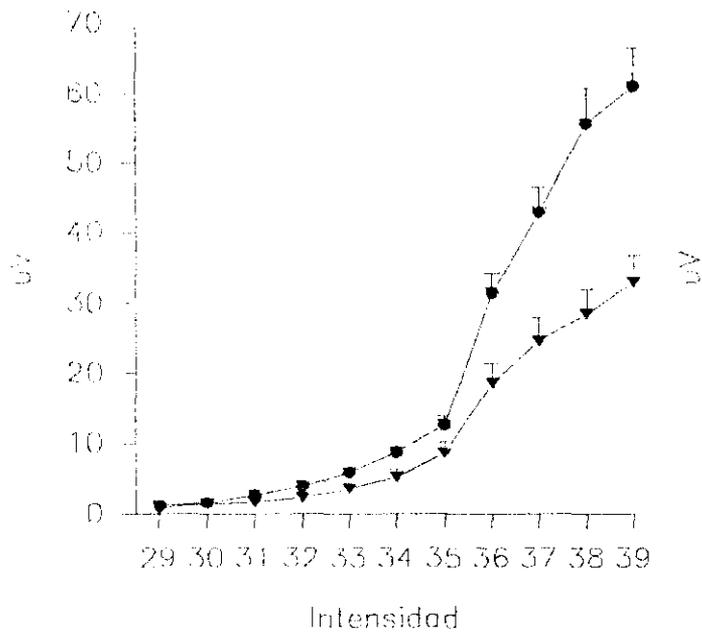
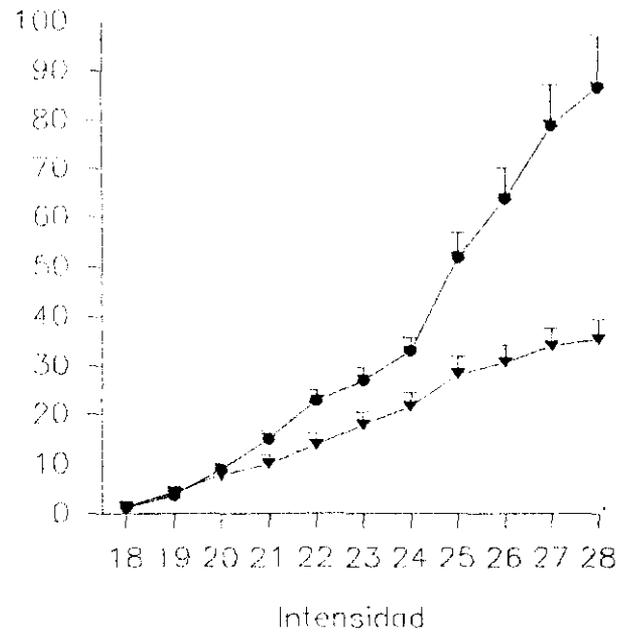


Figura 4: Latencias obtenidas en los animales controles (●, N=28) frente a los animales tratados en edad adulta con GMS (▼, N=16)

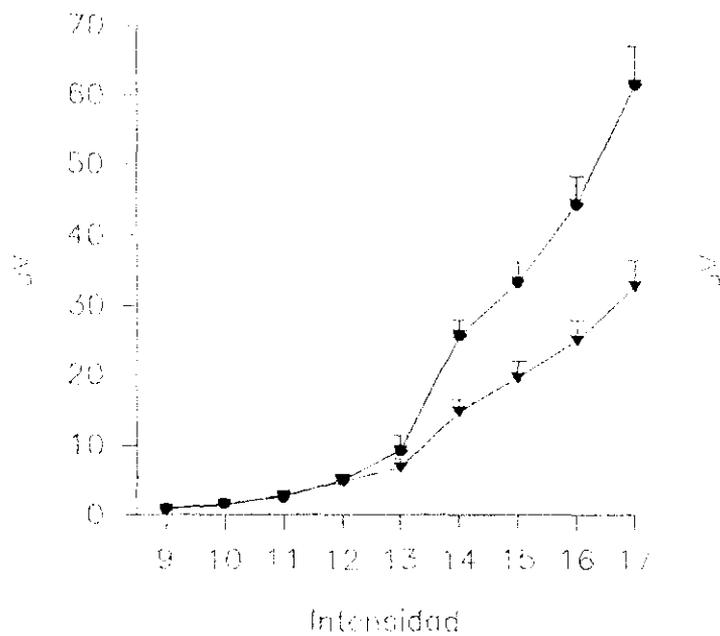
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

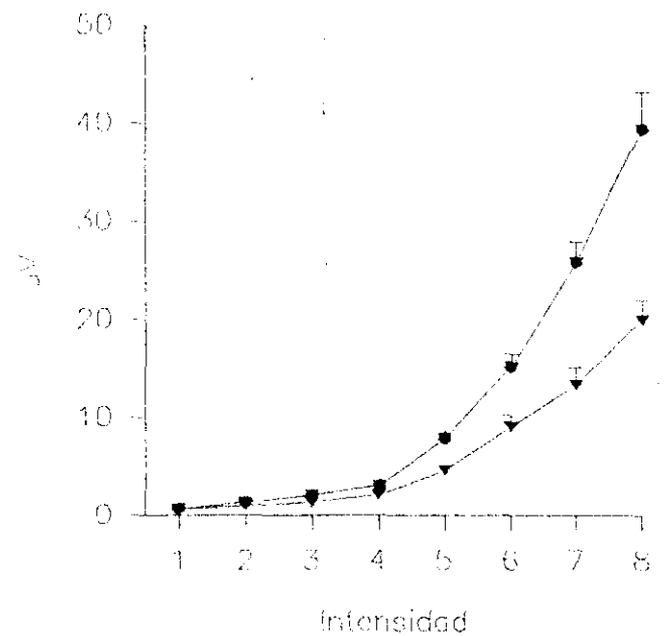


Figura 5: Amplitudes obtenidas en los animales controles (● , N=28) frente a los animales tratados en edad adulta con GMS (▼ , N=16)

TABLA 2: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo I

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO I			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	16	30,25	1,29	*
12 KHz	28	18,39	0,50	16	18,88	1,09	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	16	10,06	1,34	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	15	2,33	1,18	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

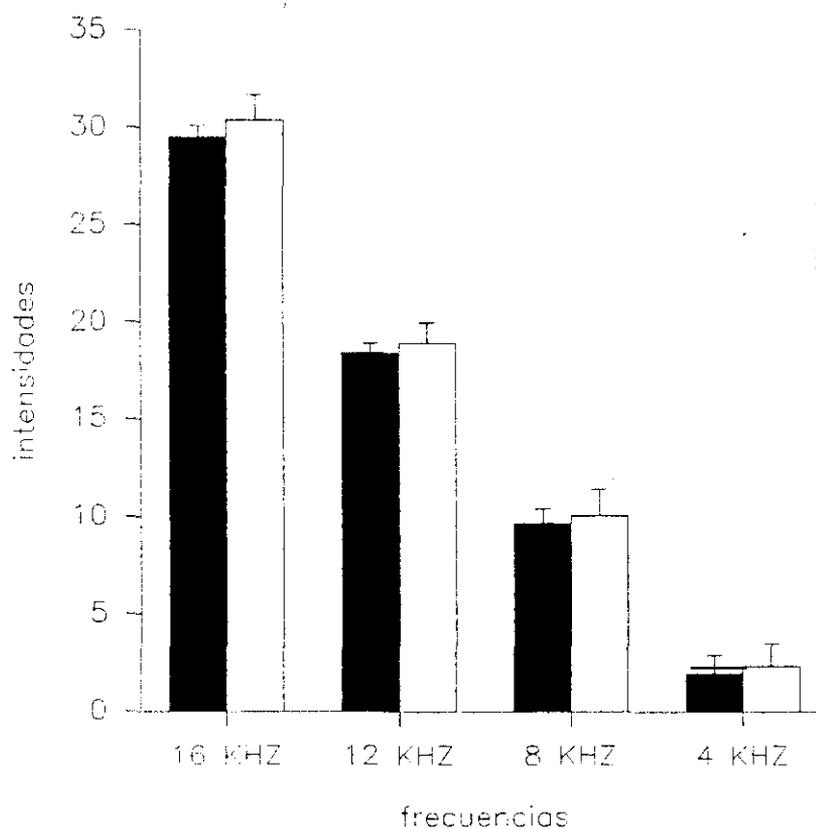


Figura 6: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo I (□, N= 16)

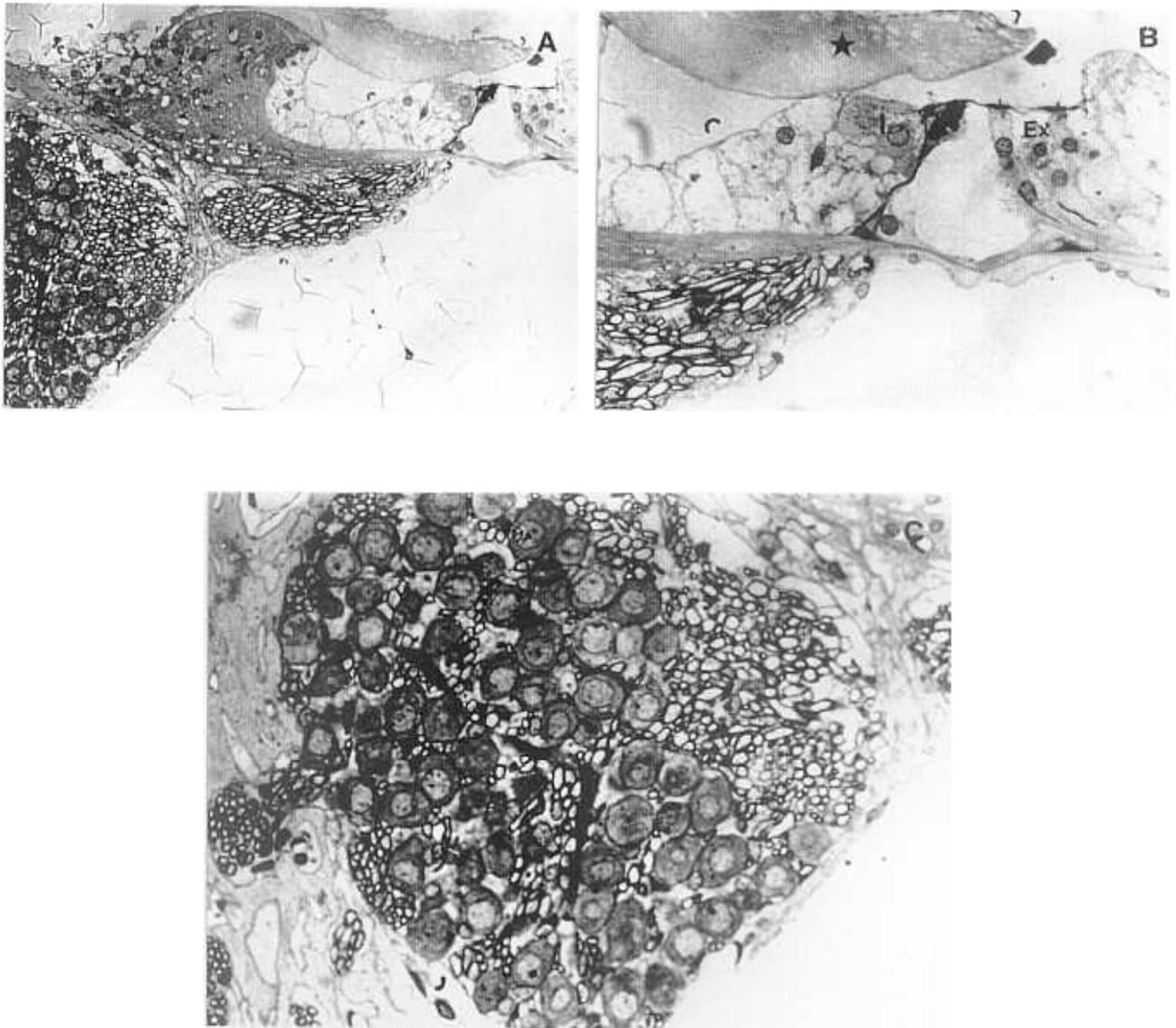


Figura 2: Animal adulto tratado, durante 4 días consecutivos, con glutamato monosódico (4 mg/g). a) Panorámica de un órgano de Corti y ganglio perteneciente a una espira media. b) Detalle del órgano de Corti, en el que se observan lesiones edematosas fundamentalmente bajo la célula ciliada interna (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)). c) Detalle del ganglio espiral, no apreciándose alteraciones significativas. (a: Obj.20x; b: Obj.40x; c: Obj.40x)

B.2. Grupo II

En este grupo se usaron 6 animales hembras a los que se les administró una dosis de 4mg de GMS por gramo de peso en un volumen de 0,01 ml de agua destilada por medio de una inyección intraperitoneal en el día 2 PN. No se observaron convulsiones en ningún animal en la hora siguiente a la administración del neurotóxico aunque uno de los animales murió a consecuencia del tratamiento. Las cinco ratas que sobrevivieron al tratamiento fueron registradas a los 66 días de vida, tres de ellas, y a los 69 y 70 días de vida las dos restantes.

Las latencias presentaron una desviación semejante a la obtenida para las hembras controles y la media fue significativamente mayor al grupo control, observándose una gradación entre las distintas frecuencias. Para altas frecuencias, 16 y 12 KHz, las latencias fueron mayores significativamente a altas y medias intensidades, con significaciones que oscilaron entre $p < 0,5$ y $p < 0,001$; en 8 KHz sólo fueron mayores significativamente en altas intensidades ($p < 0,5$ y $p < 0,01$), mientras que en 4 KHz sólo la intensidad 6 fue significativamente mayor ($p < 0,5$) (tabla III y figura 7).

Los valores de amplitud obtenidos estuvieron más agrupados, aproximadamente con un desviación del 30%, que en los animales controles. Los valores medios de las amplitudes fueron menores significativamente (la mayoría con $p < 0,01$) a los obtenidos en los animales controles exceptuando las intensidades muy próximas al umbral de audición (tabla III y figura 8).

También se observó un aumento general del umbral de audición a las distintas frecuencias, siendo estadísticamente significativo a 16 KHz ($p < 0,01$) y 8 KHz ($p < 0,5$) (tabla 3 y figura 9).

La observación microscópica de las cócleas pertenecientes al grupo II condujo a la constatación de una pérdida neuronal en el ganglio espiral coclear, sobre todo en espiras basales (Plancha 3).

TABLA III: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo II

16KHz														
LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)							
INT.	CONTROL			GRUPO II				CONTROL			GRUPO II			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
39	28	0,83	0,05	10	0,93	0,12	***	28	60,85	29,30	10	27,11	8,84	**
38	28	0,95	0,09	10	1,04	0,12	*	28	55,59	27,28	10	26,52	9,30	**
37	28	1,02	0,08	10	1,11	0,13	*	28	42,78	19,08	10	20,55	6,63	**
36	28	1,08	0,08	10	1,18	0,14	**	28	31,48	14,67	10	15,47	5,71	**
35	28	1,18	0,10	10	1,30	0,18	*	28	12,50	6,73	10	6,78	2,68	*
34	28	1,21	0,10	10	1,28	0,14	NS	28	8,81	4,67	10	4,43	1,75	**
33	28	1,25	0,10	10	1,32	0,17	NS	28	5,91	3,14	10	2,78	0,91	**
32	28	1,33	0,12	10	1,38	0,18	NS	28	3,96	2,19	10	1,97	0,99	*
31	28	1,43	0,13	9	1,49	0,22	NS	28	2,71	1,34	9	1,29	0,40	**
30	27	1,56	0,20	5	1,58	0,24	NS	27	1,64	1,06	5	0,74	0,36	NS
29	15	1,63	0,25	2	1,70	0,35	NS	15	1,21	0,63	2	0,66	0,56	NS

12KHz														
LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)							
INT.	CONTROL			GRUPO II				CONTROL			GRUPO II			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
28	28	0,79	0,05	10	0,86	0,10	**	28	86,51	55,06	10	40,66	14,37	*
27	28	0,80	0,05	10	0,89	0,10	***	28	78,71	43,60	10	33,39	8,24	**
26	28	0,91	0,08	10	1,01	0,13	**	28	63,69	33,60	10	26,19	7,07	**
25	28	0,94	0,09	10	1,03	0,13	*	28	51,81	26,06	10	22,55	5,85	**
24	28	1,01	0,07	10	1,11	0,12	**	28	32,98	14,70	10	15,73	4,47	**
23	28	1,07	0,08	10	1,16	0,13	*	28	26,98	13,38	10	13,03	4,05	**
22	28	1,13	0,09	10	1,20	0,14	NS	28	22,75	11,70	10	9,64	2,72	**
21	28	1,18	0,08	10	1,26	0,16	NS	28	15,07	8,18	10	6,20	2,44	**
20	28	1,26	0,09	10	1,31	0,17	NS	28	8,94	6,53	10	2,91	1,20	**
19	28	1,32	0,10	9	1,40	0,28	NS	28	3,77	3,92	9	1,30	0,69	NS
18	17	1,38	0,13	5	1,59	0,28	*	17	1,29	1,10	5	0,93	0,22	NS

8KHz														
LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)							
INT.	CONTROL			GRUPO II				CONTROL			GRUPO II			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
17	28	0,91	0,08	10	1,02	0,14	**	28	61,50	29,53	10	25,07	7,27	***
16	28	1,01	0,10	10	1,11	0,13	*	28	44,33	20,94	10	19,56	6,22	**
15	28	1,07	0,10	10	1,16	0,12	*	28	33,37	15,32	10	15,31	4,78	**
14	28	1,13	0,09	10	1,21	0,13	NS	28	25,79	11,63	10	11,86	3,63	**
13	28	1,33	0,12	10	1,40	0,16	NS	28	9,23	5,02	10	4,77	1,59	*
12	28	1,44	0,10	10	1,49	0,20	NS	28	5,02	3,04	10	2,80	1,14	*
11	28	1,57	0,12	9	1,56	0,20	NS	28	2,62	1,63	9	1,63	0,63	NS
10	23	1,67	0,12	8	1,72	0,20	NS	23	1,70	1,22	8	1,01	0,51	NS
9	15	1,78	0,15	0	0,00	0,00		15	0,89	0,42	0	0,00	0,00	

4KHz														
LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)							
INT.	CONTROL			GRUPO II				CONTROL			GRUPO II			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
8	28	1,07	0,10	10	1,13	0,16	NS	28	39,33	20,10	10	18,37	6,67	**
7	28	1,18	0,12	10	1,25	0,14	NS	28	25,83	11,37	10	11,39	3,57	***
6	28	1,27	0,09	10	1,36	0,15	*	28	15,17	7,45	10	7,80	2,93	**
5	28	1,43	0,11	10	1,48	0,19	NS	28	7,92	4,36	10	4,49	1,87	*
4	28	1,72	0,14	10	1,74	0,21	NS	28	3,09	1,89	10	2,17	1,22	NS
3	26	1,88	0,17	10	1,94	0,28	NS	26	2,09	1,55	10	1,47	0,55	NS
2	20	2,01	0,17	6	1,94	0,23	NS	20	1,37	0,95	6	1,21	0,47	NS
1	11	2,11	0,20	2	2,00	0,28	NS	11	0,74	0,44	2	0,89	0,90	NS

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

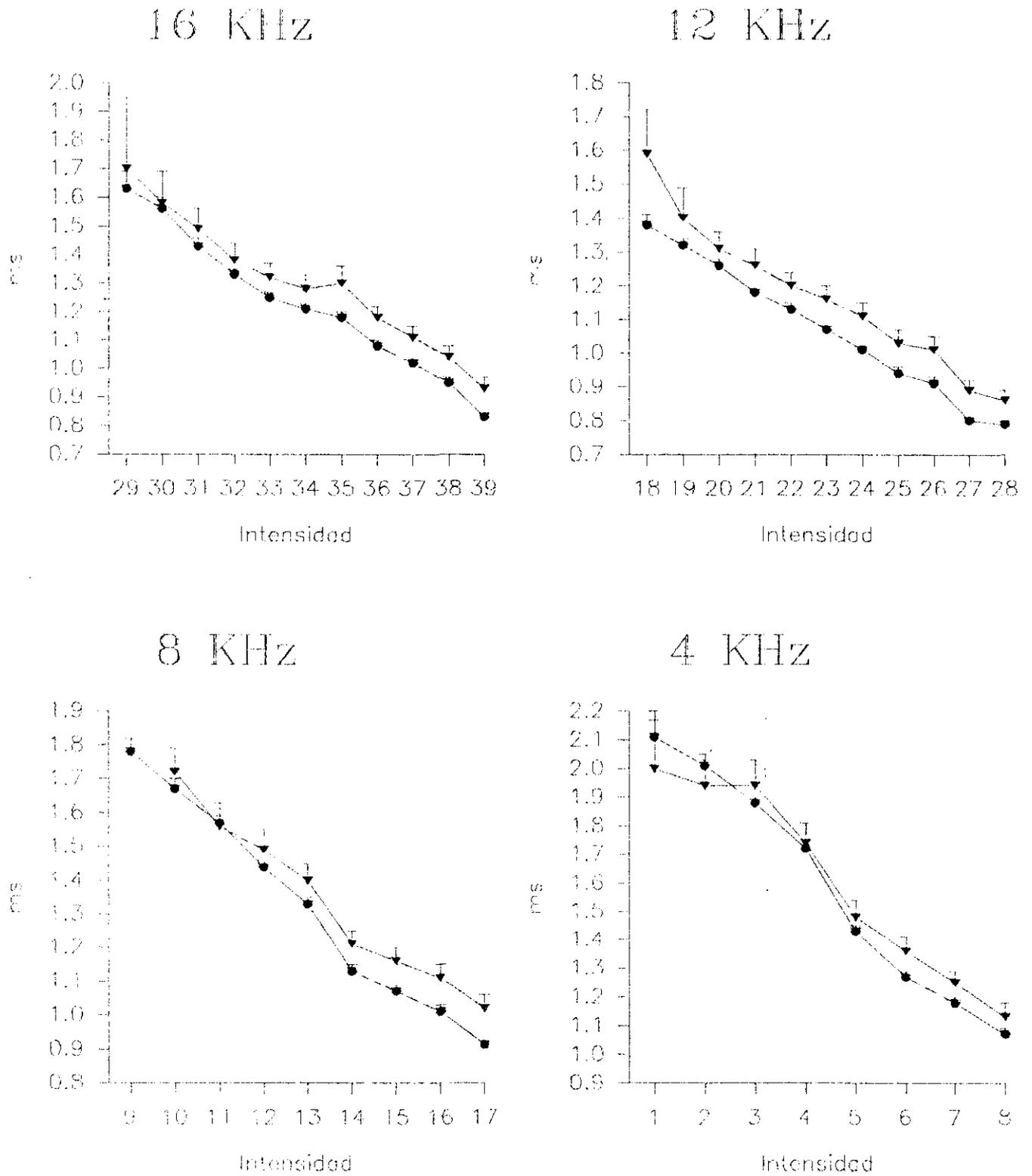
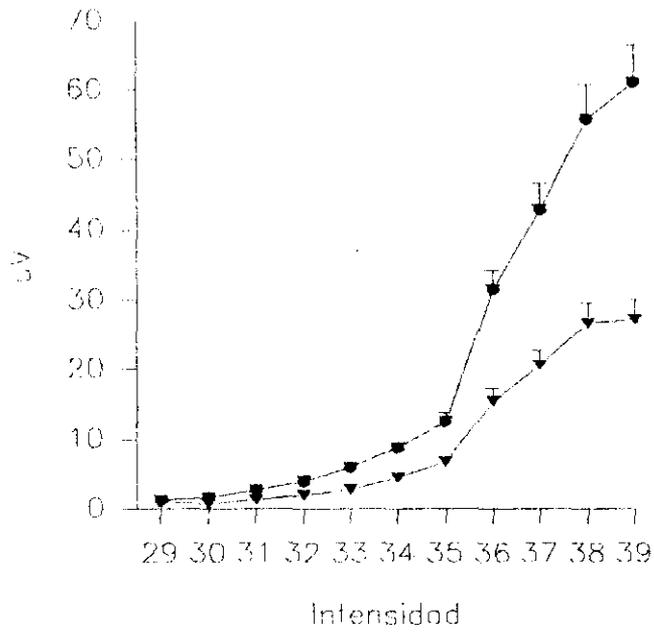
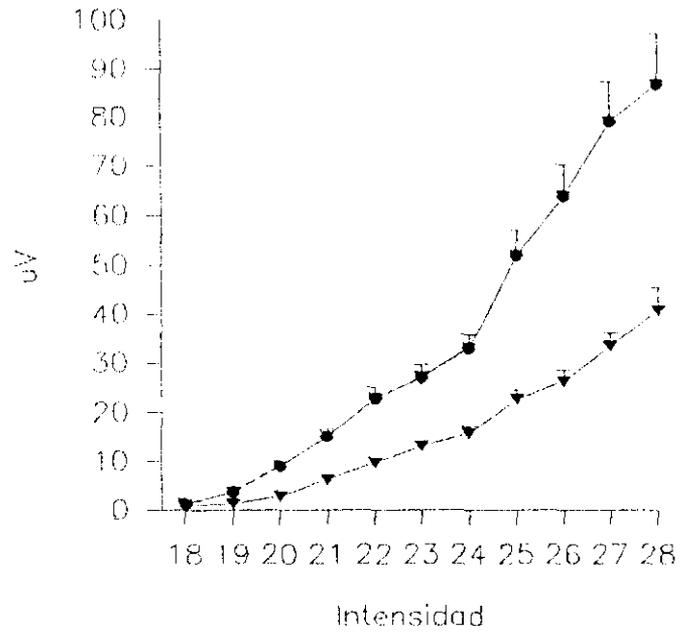


Figura 7: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados el día 2 PN con GMS (▼ , N=10)

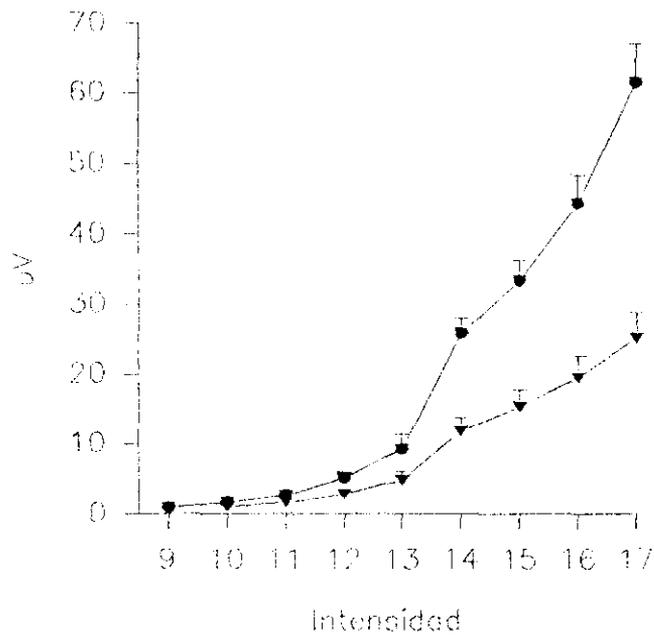
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

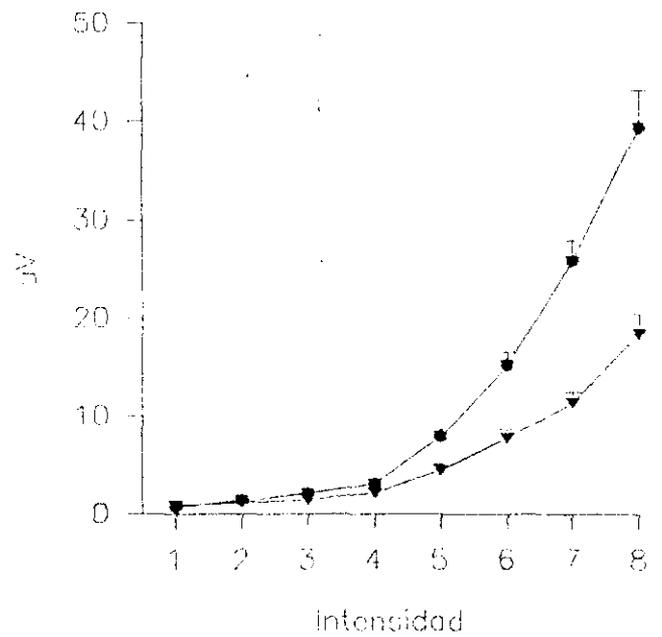


Figura 8: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=26) frente a los animales tratados el día 2 PN con GMS (▼ , N=10)

TABLA 3: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo II

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO II			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	10	30,40	0,97	**
12 KHz	28	18,39	0,50	10	18,60	0,70	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	10	10,30	0,67	*
4 KHz	28	1,96	0,96	10	2,20	0,79	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

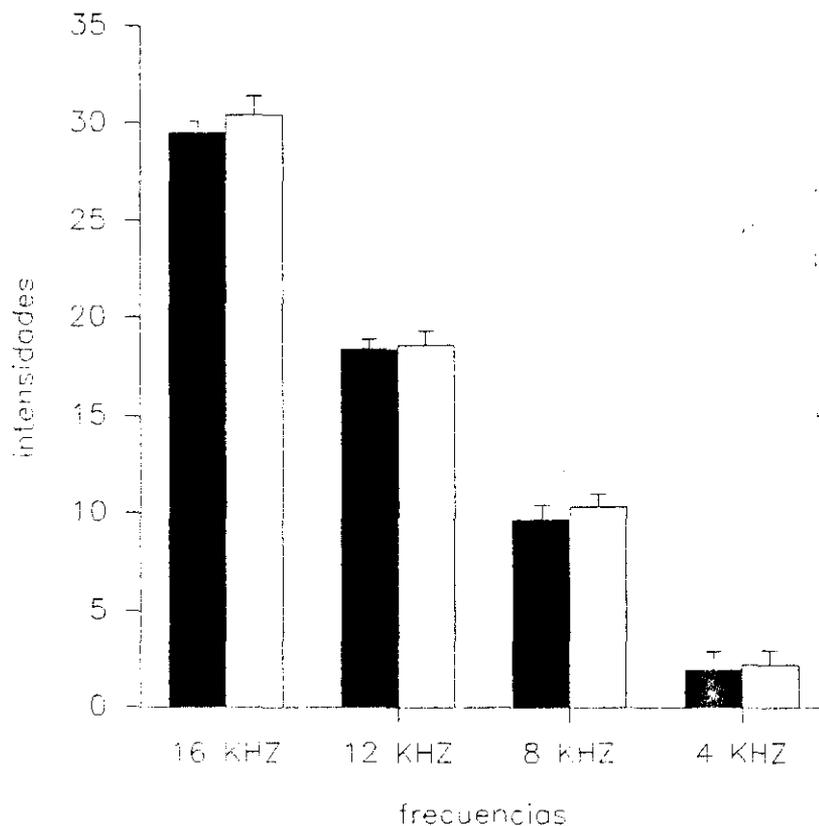


Figura 9: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo II (□, N= 10)

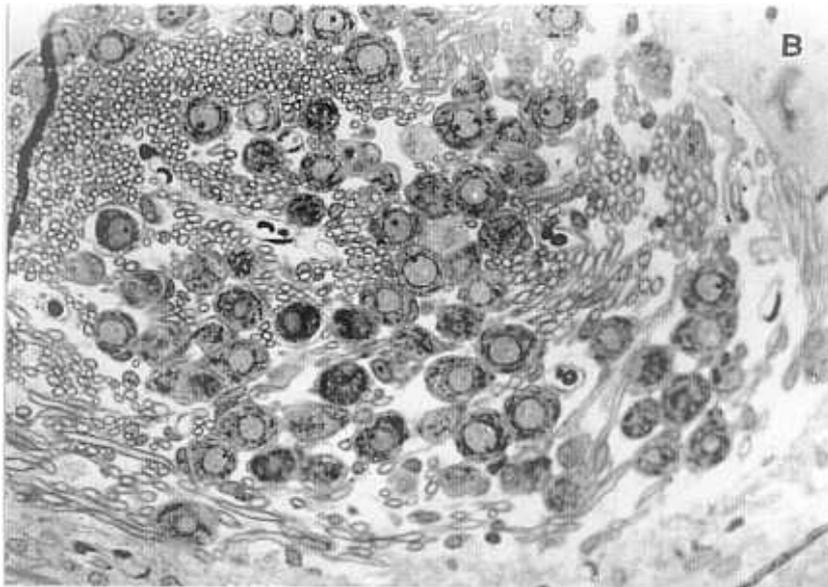
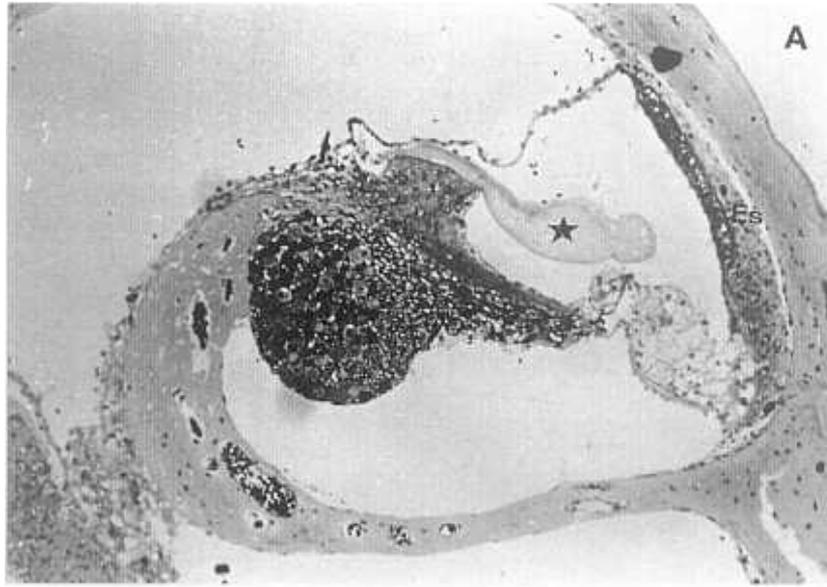


Figura 3: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (4 mg/g) en el 2° día postnatal. a) Detalle de un órgano de Corti en el que no se observan alteraciones patológicas. Tampoco en el ganglio espiral (G) se aprecian alteraciones significativas (membrana tectoria (*), Estría vascular (Es)). b) Detalle del ganglio espiral, que muestra una reducción discreta de la población neuronal del ganglio. (a: Obj.10x; b: Obj.40x)

B.3. Grupo III

En este grupo se utilizaron 4 animales hembras que recibieron una inyección intraperitoneal de 4mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada en el día 6 PN. No se observaron convulsiones en la hora posterior a la administración del neurotóxico. Los animales fueron registrados a los 68, 71 y 72 (dos ratas) días de vida.

Las latencias presentaron un desviación muy grande, incluso superaron a los obtenidos en las hembras controles; en la figura 10 se puede observar que tanto en la intensidad 30 de 16 KHz como la 10 de 8 KHz el valor medio de la latencia disminuye acusadamente, debido a que está compuesto por 3 valores pertenecientes a cócleas muy poco afectadas por el neurotóxico. En general, los valores medios fueron superiores a los obtenidos en los animales controles, observándose diferencias significativas ($p < 0,5$) solamente en altas frecuencias (3 intensidades en 16 y seis valores en 12KHz), mientras que en frecuencias medias las latencias fueron superiores pero no estadísticamente significativas respecto de las latencias controles (tabla IV y figura 10).

Los valores medios de las amplitudes fueron siempre menores a los obtenidos en los animales controles y estadísticamente significativos, la mayoría con $p < 0,01$, excepto en las proximidades del umbral de audición y en las dos intensidades mayores de 12 KHz donde los valores medios presentaron una gran dispersión, mayor al 50% normalmente encontrado (tabla IV y figura 11). También hay que señalar que en la frecuencia de 16 KHz se pudo observar que a la más alta intensidad de

estimulación (39) se obtuvo un valor equivalente, incluso menor, al obtenido en la siguiente intensidad (38).

Con respecto a los umbrales, se pudo observar que hubo un aumento con respecto a los controles, muy acusado en 16 KHz ($p < 0,001$) así como en 8 y 4 KHz ($p < 0,01$ y $p < 0,5$), pero en menor medida para 12 KHz (tabla 4 y figura 12).

La observación microscópica de las cócleas pertenecientes a este grupo permitió constatar la pérdida de células nerviosas en el ganglio espiral coclear, sobre todo en las espiras basales (Plancha 4).

TABLA IV: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo III

16KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO III				CONTROL			GRUPO III			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
39	28	0,83	0,05	8	0,91	0,09	**	28	60,85	29,30	8	27,98	11,26	**
38	28	0,95	0,09	8	1,03	0,17	NS	28	55,59	27,28	8	29,03	11,63	*
37	28	1,02	0,08	8	1,13	0,18	*	28	42,78	19,08	8	21,64	8,79	**
36	28	1,08	0,08	8	1,19	0,18	*	28	31,48	14,67	8	15,56	7,57	**
35	28	1,18	0,10	8	1,26	0,20	NS	28	12,50	6,73	8	5,31	2,44	**
34	28	1,21	0,10	8	1,28	0,20	NS	28	8,81	4,67	8	3,76	1,81	**
33	28	1,25	0,10	8	1,33	0,22	NS	28	5,91	3,14	8	2,66	1,36	**
32	28	1,33	0,12	8	1,44	0,26	NS	28	3,96	2,19	8	1,68	0,83	**
31	28	1,43	0,13	7	1,50	0,30	NS	28	2,71	1,34	7	0,94	0,54	**
30	27	1,56	0,20	3	1,38	0,12	NS	27	1,64	1,06	3	0,64	0,34	NS
29	15	1,63	0,25	0	0,00	0,00		15	1,21	0,63	0	0,00	0,00	

12KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO III				CONTROL			GRUPO III			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
28	28	0,79	0,05	8	0,87	0,15	*	28	86,51	55,06	8	58,13	36,75	NS
27	28	0,80	0,05	8	0,89	0,14	**	28	78,71	43,60	8	45,73	28,71	NS
26	28	0,91	0,08	8	0,98	0,20	NS	28	63,89	33,60	8	29,11	14,66	**
25	28	0,94	0,09	8	1,03	0,20	NS	28	51,81	26,06	8	22,38	9,59	**
24	28	1,01	0,07	8	1,11	0,17	*	28	32,98	14,70	8	14,14	5,35	**
23	28	1,07	0,08	8	1,16	0,17	*	28	26,98	13,38	8	11,06	4,46	**
22	28	1,13	0,09	8	1,23	0,19	NS	28	22,75	11,70	8	8,20	3,77	**
21	28	1,18	0,08	8	1,30	0,23	*	28	15,07	8,18	8	4,71	3,27	**
20	28	1,26	0,09	8	1,39	0,22	*	28	8,94	6,53	8	2,57	2,88	*
19	28	1,32	0,10	6	1,43	0,18	NS	28	3,77	3,92	6	1,54	1,44	NS
18	17	1,38	0,13	4	1,46	0,17	NS	17	1,29	1,10	4	0,74	0,43	NS

8KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO III				CONTROL			GRUPO III			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
17	28	0,91	0,08	8	0,96	0,19	NS	28	61,50	29,53	8	32,09	14,34	*
16	28	1,01	0,10	8	1,07	0,22	NS	28	44,33	20,94	8	21,36	6,89	**
15	28	1,07	0,10	8	1,15	0,18	NS	28	33,37	15,32	8	15,66	5,11	**
14	28	1,13	0,09	8	1,20	0,20	NS	28	25,79	11,63	8	11,88	4,30	**
13	28	1,33	0,12	8	1,40	0,21	NS	28	9,23	5,02	8	3,99	1,75	**
12	28	1,44	0,10	8	1,49	0,22	NS	28	5,02	3,04	8	1,82	1,02	**
11	28	1,57	0,12	8	1,66	0,28	NS	28	2,62	1,63	8	1,38	1,07	NS
10	23	1,67	0,12	3	1,60	0,08	NS	23	1,70	1,22	3	0,73	0,15	NS
9	15	1,78	0,15	0	0,00	0,00		15	0,89	0,42	0	0,00	0,00	

4KHz														
	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO III				CONTROL			GRUPO III			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
8	28	1,07	0,10	8	1,10	0,21	NS	28	39,33	20,10	8	22,85	12,31	*
7	28	1,18	0,12	8	1,26	0,21	NS	28	25,83	11,37	8	13,54	6,63	**
6	28	1,27	0,09	8	1,35	0,19	NS	28	15,17	7,45	8	8,04	3,87	*
5	28	1,43	0,11	8	1,51	0,16	NS	28	7,92	4,36	8	3,98	2,11	*
4	28	1,72	0,14	8	1,76	0,22	NS	28	3,09	1,89	8	1,69	0,93	NS
3	26	1,88	0,17	7	1,90	0,20	NS	26	2,09	1,55	7	1,22	0,54	NS
2	20	2,01	0,17	3	2,11	0,38	NS	20	1,37	0,95	3	0,60	0,08	NS
1	11	2,11	0,20	0	0,00	0,00		11	0,74	0,44	0	0,00	0,00	

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, µV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

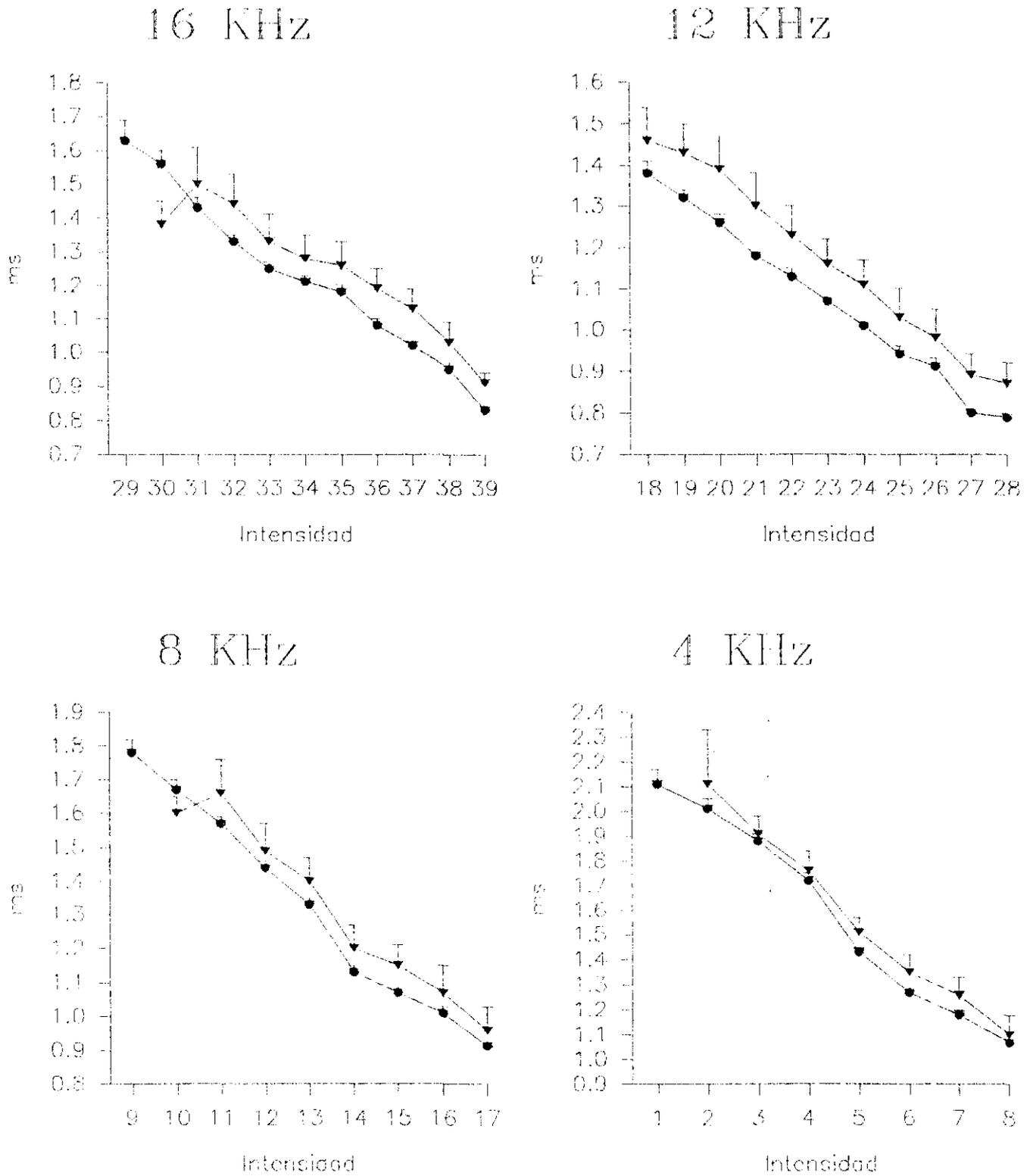
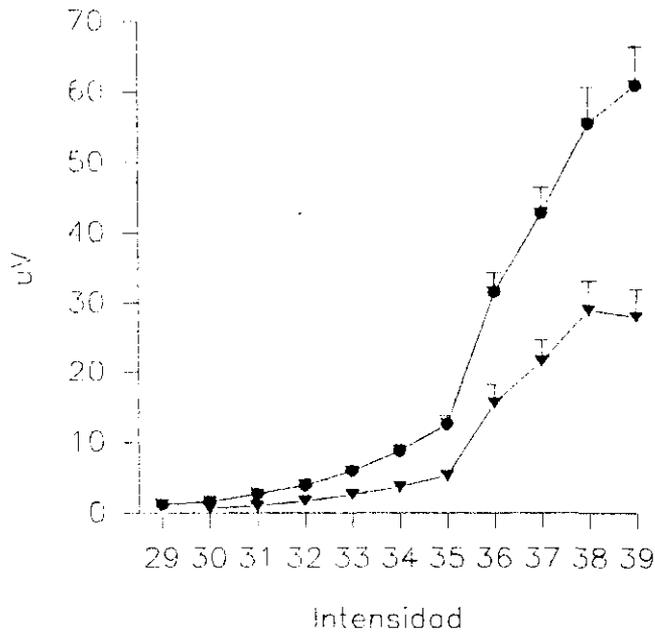
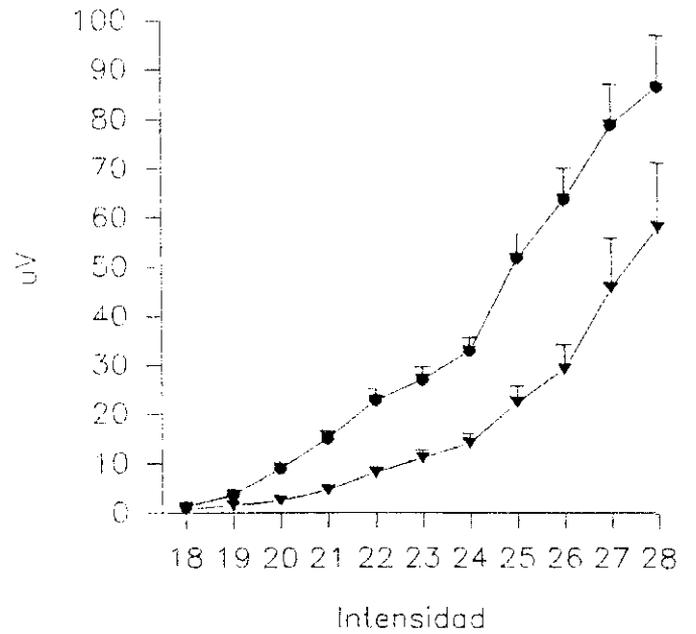


Figura 10: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados el día 6 PN con GMS (▼ , N=8)

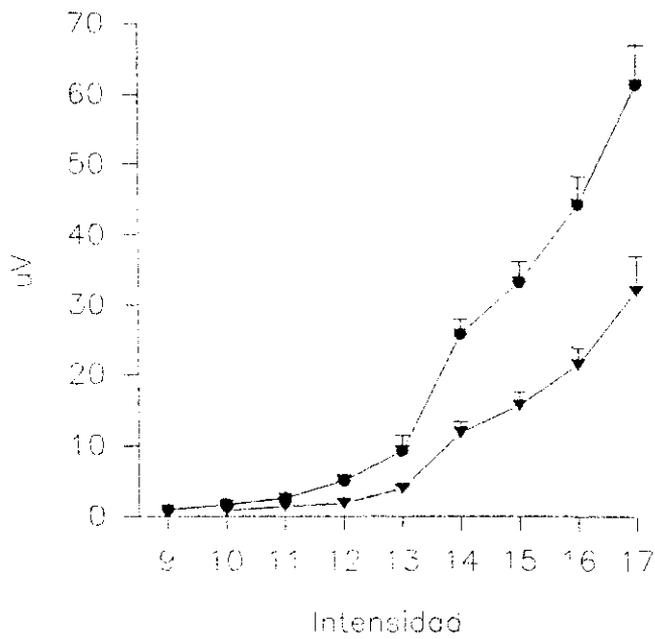
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

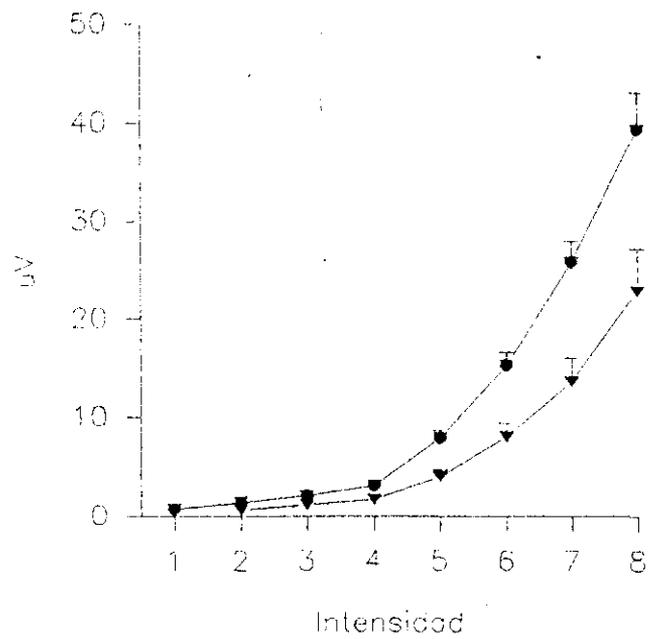


Figura 11: Amplitudes obtenidas en los animales controles (● , N=28) frente a los animales tratados el día 6 PN con GMS (▼ , N=8)

TABLA 4: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo III

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO III			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	8	30,75	0,71	***
12 KHz	28	18,39	0,50	8	18,75	0,89	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	8	10,63	0,52	**
4 KHz	28	1,96	0,96	8	2,75	0,71	*

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

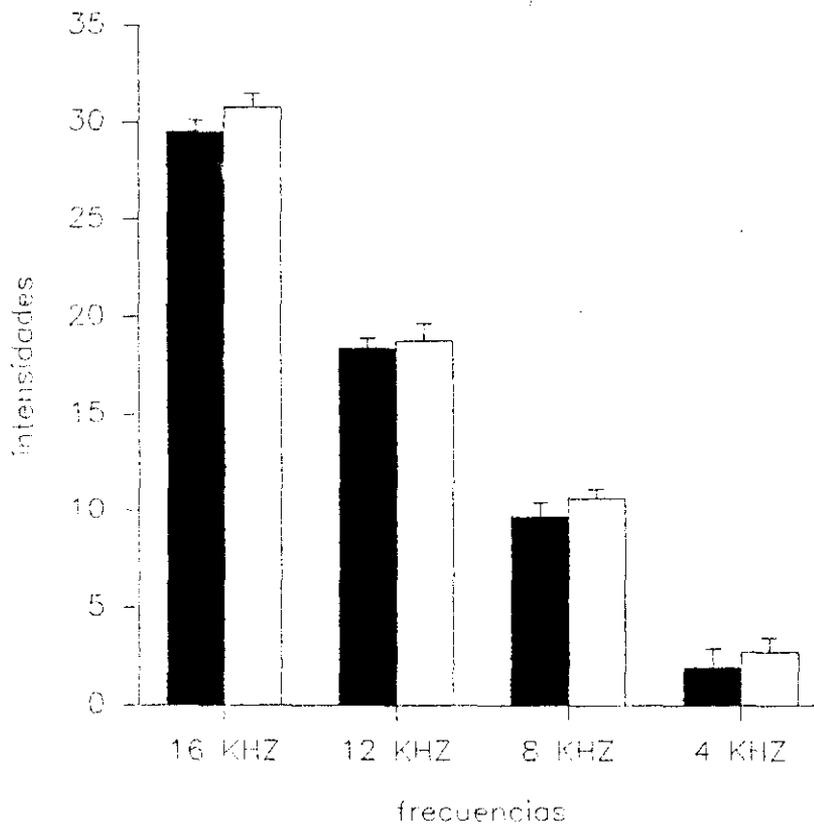


Figura 12: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo III (□, N= 8)

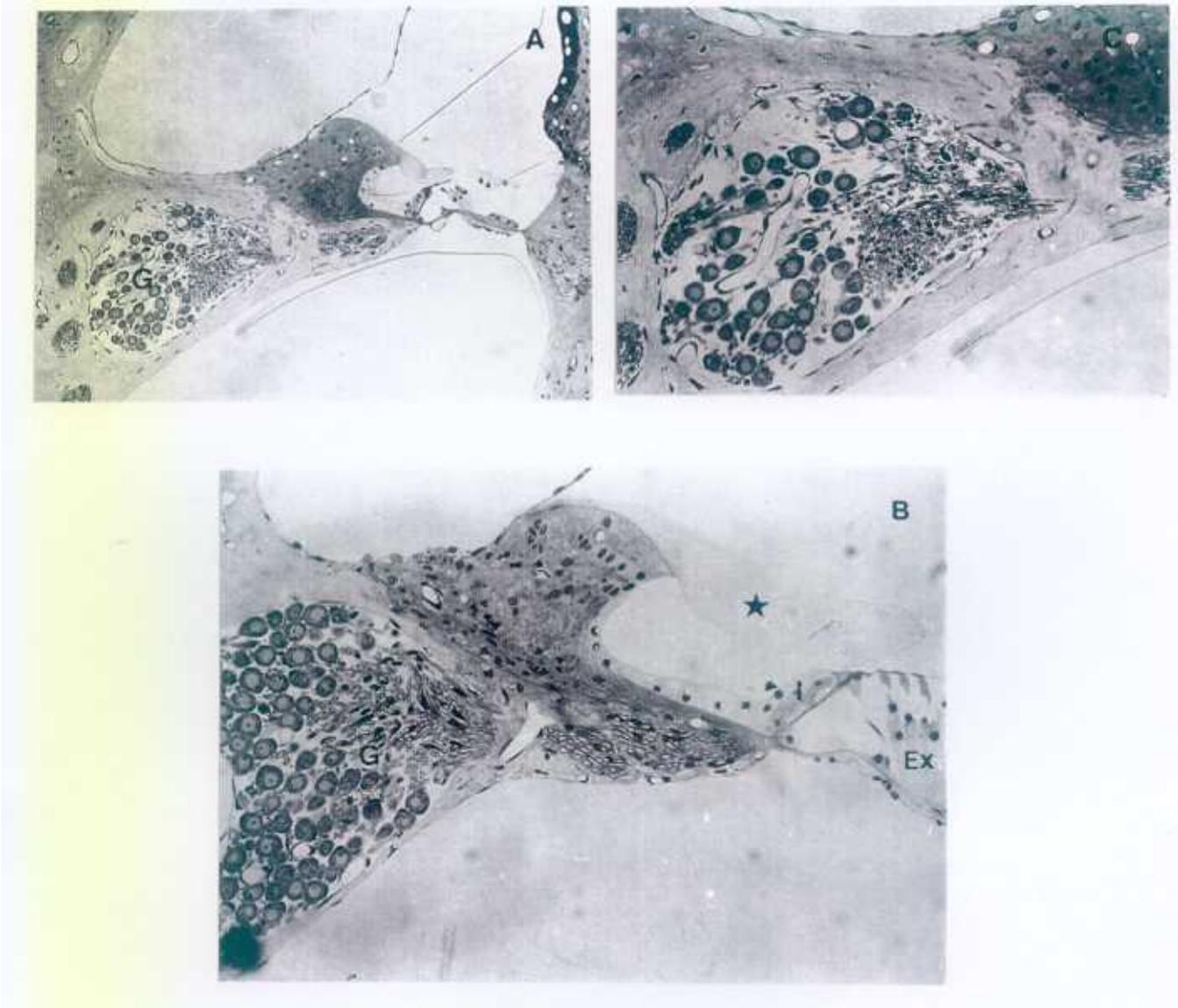


Figura 4: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (4 mg/g) en el 6° día postnatal. a) Panorámica de la rampa coclear de una espira media baja, que deja patente la reducción de la población neuronal del ganglio espiral (G). b) Detalle de un órgano de Corti situado en una espira media alta, cuyo ganglio espiral (G) está escasamente afectado (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)). c) Detalle de un ganglio espiral situado en una espira media baja, que muestra una reducción de la población neuronal del ganglio. (a: Obj.10x; b: Obj.20x; c: Obj.20x)

B.4. Grupo IV

En este grupo se utilizaron 2 animales, un macho y una hembra, que recibieron una inyección intraperitoneal de 4mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada en el día 9 PN. No se observaron convulsiones durante la hora posterior a la administración del neurotóxico. En el registro electrofisiológico se utilizó una gama distinta de intensidades, como se comenta en el apartado E. de material y métodos. Estos dos animales fueron registrados a los 31 y 32 días de vida.

Las latencias fueron mayores a las obtenidas en los animales controles a excepción de los intensidades próximas al umbral para 16 KHz, donde fueron inferiores a las control. En general, los valores medios presentaron una desviación standard muy superior a la control. Los valores de la latencia no fueron estadísticamente significativos en altas intensidades y para cualquier frecuencia. Sin embargo, se hace significativo ($p < 0,5$ y $p < 0,01$) en intensidades medias: 36 (16 KHz), 24 (12 KHz), 14 (8 KHz), 6 y 5 (4 KHz) y bajas: 18 (12 KHz), 12, 8 y 10 (8 KHz); 4, 3 y 2 (4 KHz). El cambio brusco que ocurre en la pendiente de la curva obtenida en 16 KHz es debido a la alta latencia y elevado umbral obtenido en uno sólo de los oídos estudiados (tabla V y figura 13).

Lo primero que hay que resaltar en el estudio de la amplitud es la alta desviación standard obtenida, valores que incluso superan el 100% de la media para altas intensidades (16 y 12 KHz) y todas las intensidades. No obstante, los valores de la desviación standard para frecuencias medias (8 y 4 KHz) fueron elevados pero nunca superaron el valor de la media. Los valores medios de las amplitudes siempre estuvieron por debajo

de los valores controles y se obtuvieron significaciones estadísticas en altas y medias intensidades para 16 KHz (39 y 36); y medias intensidades para 8 KHz (14) y 4 KHz (6 y 5). En la frecuencia de 12 KHz no se obtuvo ningún valor significativo (tabla V y figura 14).

Los umbrales obtenidos son estadísticamente semejantes a los valores control para 12, 8 y 4 KHz. Sin embargo para 16 KHz sí se observó un claro aumento ($p < 0,5$) en el umbral (tabla 5 y figura 15).

En el estudio morfológico se apreció que en algunas cócleas había disminuido el número de neuronas de las espiras basales del ganglio espiral, mientras que otras se asemejaban a las cócleas control (Plancha 5A y 5B).

TABLA V: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo IV

16KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IV				CONTROL			GRUPO IV			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
39	28	0,83	0,05	4	0,87	0,06	NS	28	60,85	29,30	4	28,30	19,88	*
38	28	0,95	0,09					28	55,59	27,28				
37	28	1,02	0,08					28	42,78	19,08				
36	28	1,08	0,08	4	1,22	0,13	**	28	31,48	14,67	4	14,77	15,09	*
35	28	1,18	0,10					28	12,50	6,73				
34	28	1,21	0,10					28	8,81	4,67				
33	28	1,25	0,10	4	1,40	0,38	NS	28	5,91	3,14	4	4,22	4,68	NS
32	28	1,33	0,12	3	1,36	0,02	NS	28	3,96	2,19	3	3,32	3,43	NS
31	28	1,43	0,13	3	1,37	0,11	NS	28	2,71	1,34	3	2,48	2,76	NS
30	27	1,56	0,20	2	1,43	0,13	NS	27	1,64	1,06	2	2,89	1,30	NS
29	15	1,63	0,25	2	1,50	0,03	NS	15	1,21	0,63	2	1,88	0,56	NS

12KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IV				CONTROL			GRUPO IV			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
28	28	0,79	0,05	4	0,81	0,04	NS	28	86,51	55,06	4	57,30	58,60	NS
27	28	0,80	0,05	4	0,84	0,05	NS	28	78,71	43,60	4	52,25	58,12	NS
26	28	0,91	0,08					28	63,69	33,60				
25	28	0,94	0,09					28	51,81	25,06				
24	28	1,01	0,07	4	1,12	0,17	*	28	32,98	14,70	4	18,00	12,33	NS
23	28	1,07	0,08					28	26,98	13,38				
22	28	1,13	0,09					28	22,75	11,70				
21	28	1,18	0,08	4	1,32	0,24	*	28	15,07	8,18	4	7,73	5,66	NS
20	28	1,26	0,09	4	1,38	0,28	NS	28	8,94	6,53	4	4,44	4,15	NS
19	28	1,32	0,10	4	1,46	0,28	NS	28	3,77	3,92	4	2,37	2,90	NS
18	17	1,38	0,13	3	1,68	0,34	*	17	1,29	1,10	2	1,89	1,84	NS

8KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IV				CONTROL			GRUPO IV			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
17	28	0,91	0,08	4	0,94	0,10	NS	28	61,50	29,53	4	32,88	27,87	NS
16	28	1,01	0,10					28	44,33	20,94				
15	28	1,07	0,10					28	33,37	15,32				
14	28	1,13	0,09	4	1,28	0,10	**	28	25,79	11,63	4	8,55	2,89	**
13	28	1,33	0,12					28	9,23	5,02				
12	28	1,44	0,10	4	1,59	0,20	*	28	5,02	3,04	4	3,20	1,43	NS
11	28	1,57	0,12	4	1,82	0,24	**	28	2,62	1,63	4	1,21	0,66	NS
10	23	1,67	0,12	3	1,86	0,21	*	23	1,70	1,22	3	0,77	0,54	NS
9	15	1,78	0,15	0	0,00	0,00		15	0,89	0,42	0	0,00	0,00	

4KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IV				CONTROL			GRUPO IV			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
8	28	1,07	0,10	4	1,12	0,11	NS	28	39,33	20,10	4	18,83	15,11	NS
7	28	1,18	0,12					28	25,83	11,37				
6	28	1,27	0,09	4	1,44	0,13	**	28	15,17	7,45	4	5,58	4,23	*
5	28	1,43	0,11	4	1,63	0,08	**	28	7,92	4,36	4	3,01	1,72	*
4	28	1,72	0,14	4	1,91	0,08	*	28	3,09	1,89	4	1,48	0,44	NS
3	26	1,88	0,17	4	2,10	0,11	*	26	2,09	1,55	4	0,94	0,26	NS
2	20	2,01	0,17	4	2,21	0,18	*	20	1,37	0,95	4	0,64	0,36	NS
1	11	2,11	0,20	0	0,00	0,00		11	0,74	0,44	0	0,00	0,00	

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

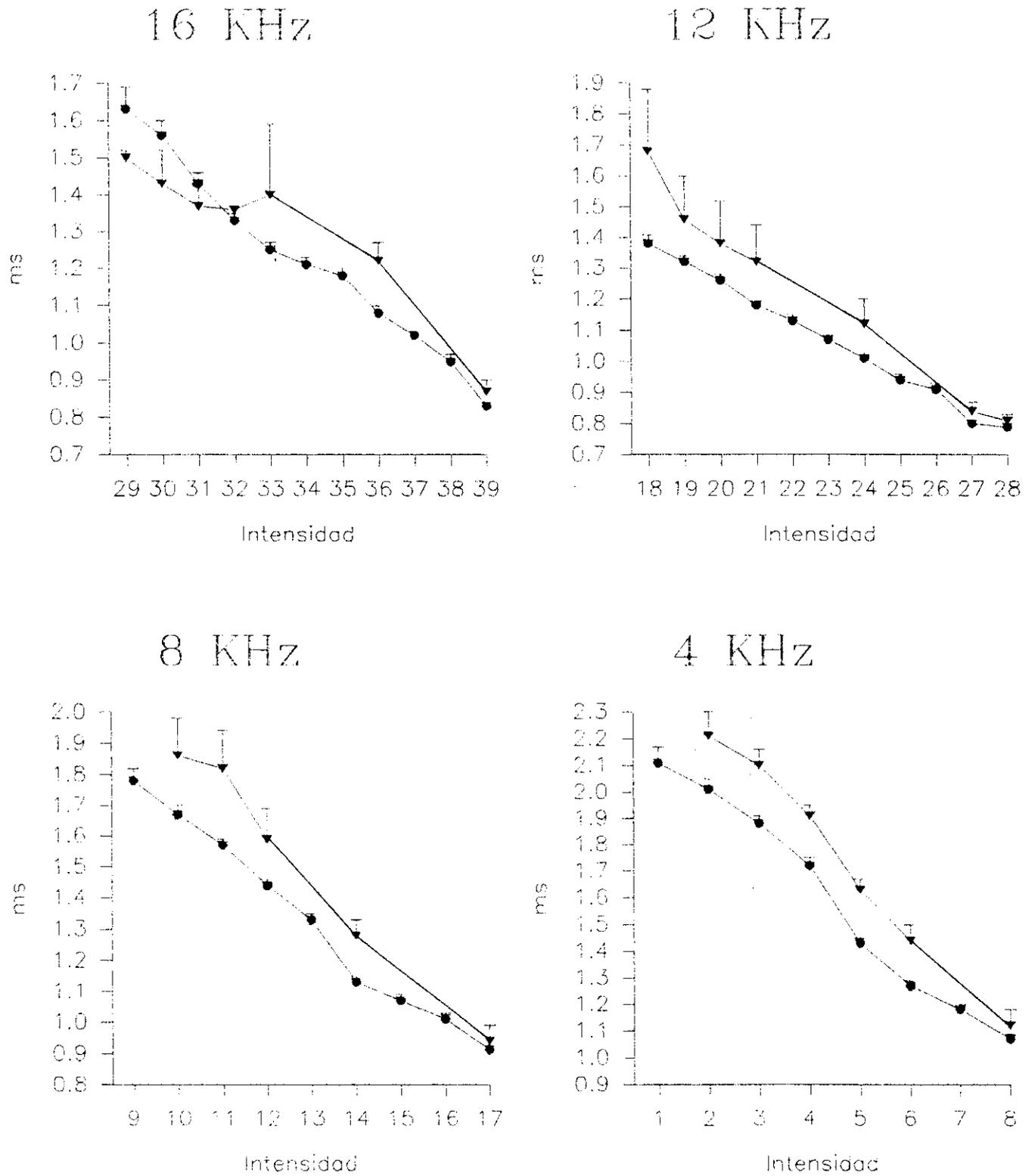
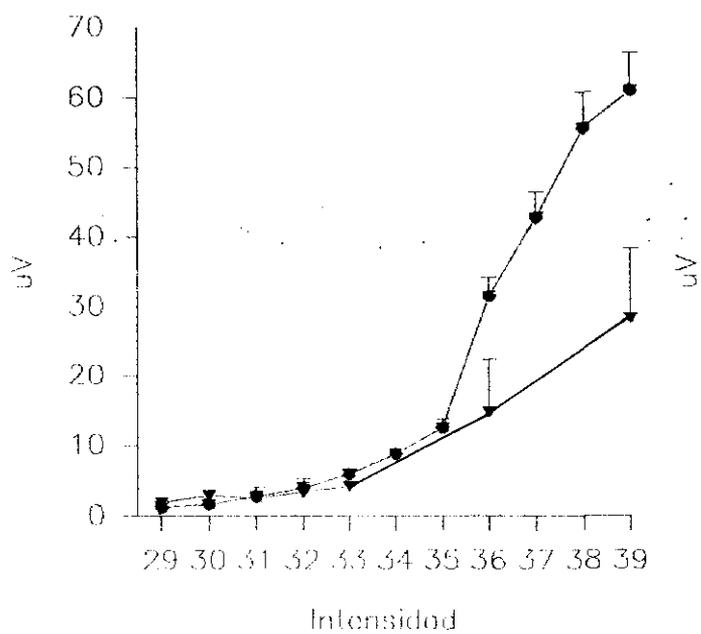
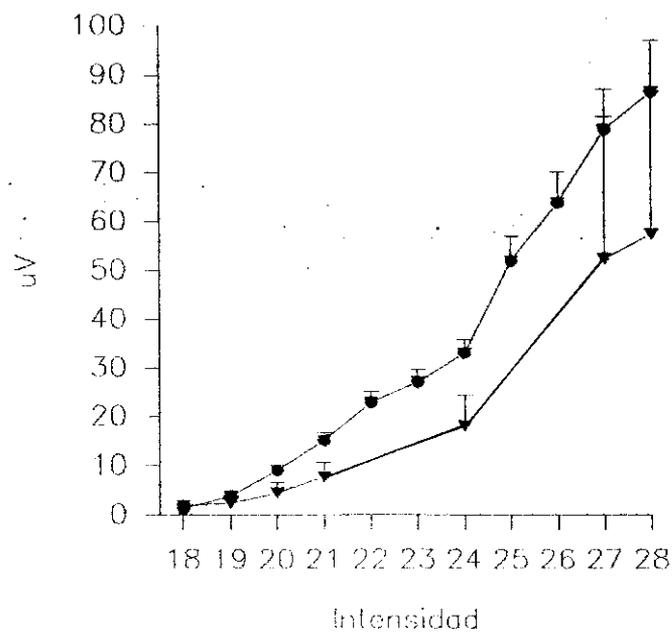


Figura 13: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados el día 9 PN con GMS (▼ , N=4)

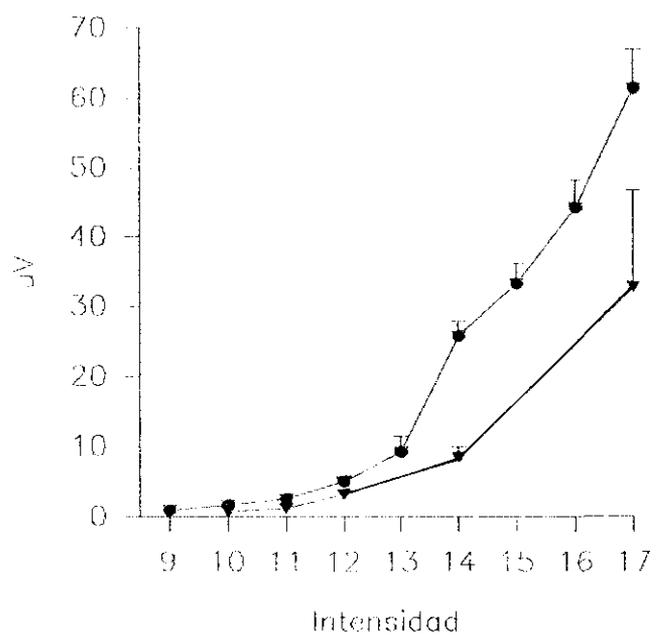
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

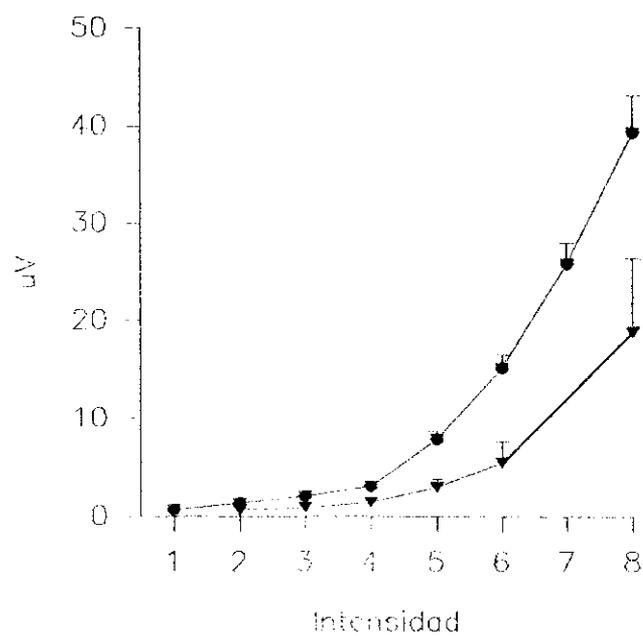


Figura 14: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados el día 9 PN con GMS (▼ , N=4)

TABLA 5: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo IV

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO IV			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	4	30,50	1,91	*
12 KHz	28	18,39	0,50	4	18,25	0,50	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	4	10,25	0,50	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	4	2,00	0,00	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

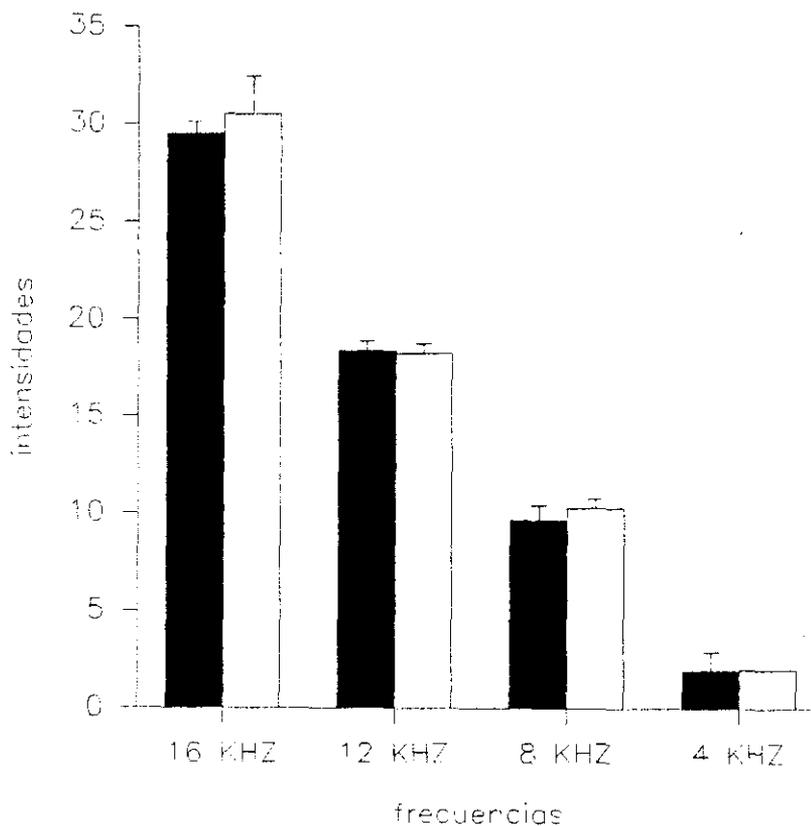


Figura 15: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo IV (□, N= 4)

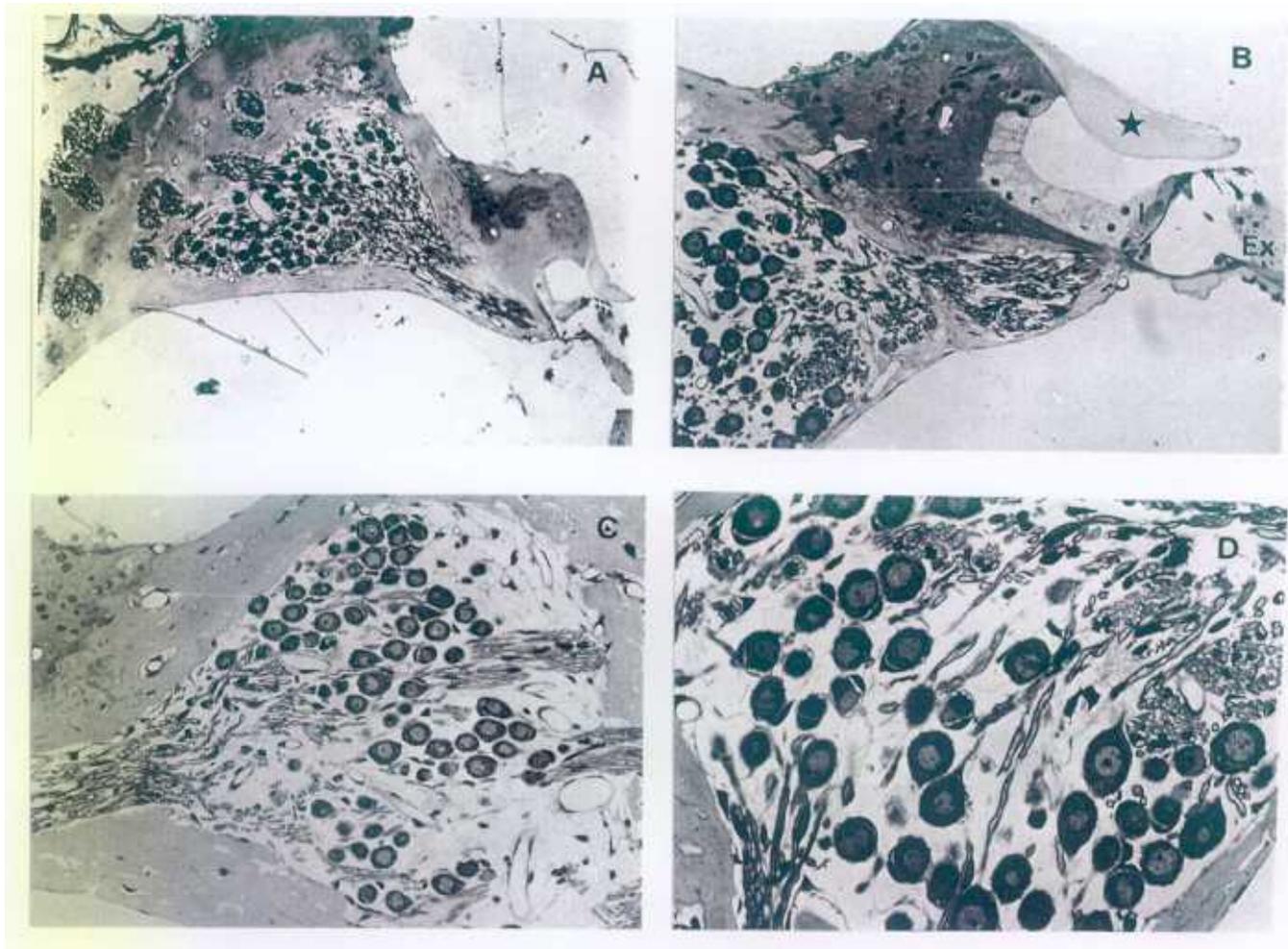


Figura 5A: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (4 mg/g) en el 9° día postnatal. a) Panorámica de la rampa media de una espira baja, con una pequeña reducción de la población neuronal del ganglio. b) Detalle de un órgano de Corti de una espira media alta (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)) y del ganglio espiral (G), caracterizado por un alto grado de afectación neuronal. c) Sección del ganglio a nivel de una espira media baja, que muestra una reducción de la población neuronal. d) Detalle de un ganglio espiral de una espira media alta. Obsérvese la gran alteración neuronal del mismo. (a: Obj.10x; b: Obj.20x; c: Obj.20x; d: Obj.40x)

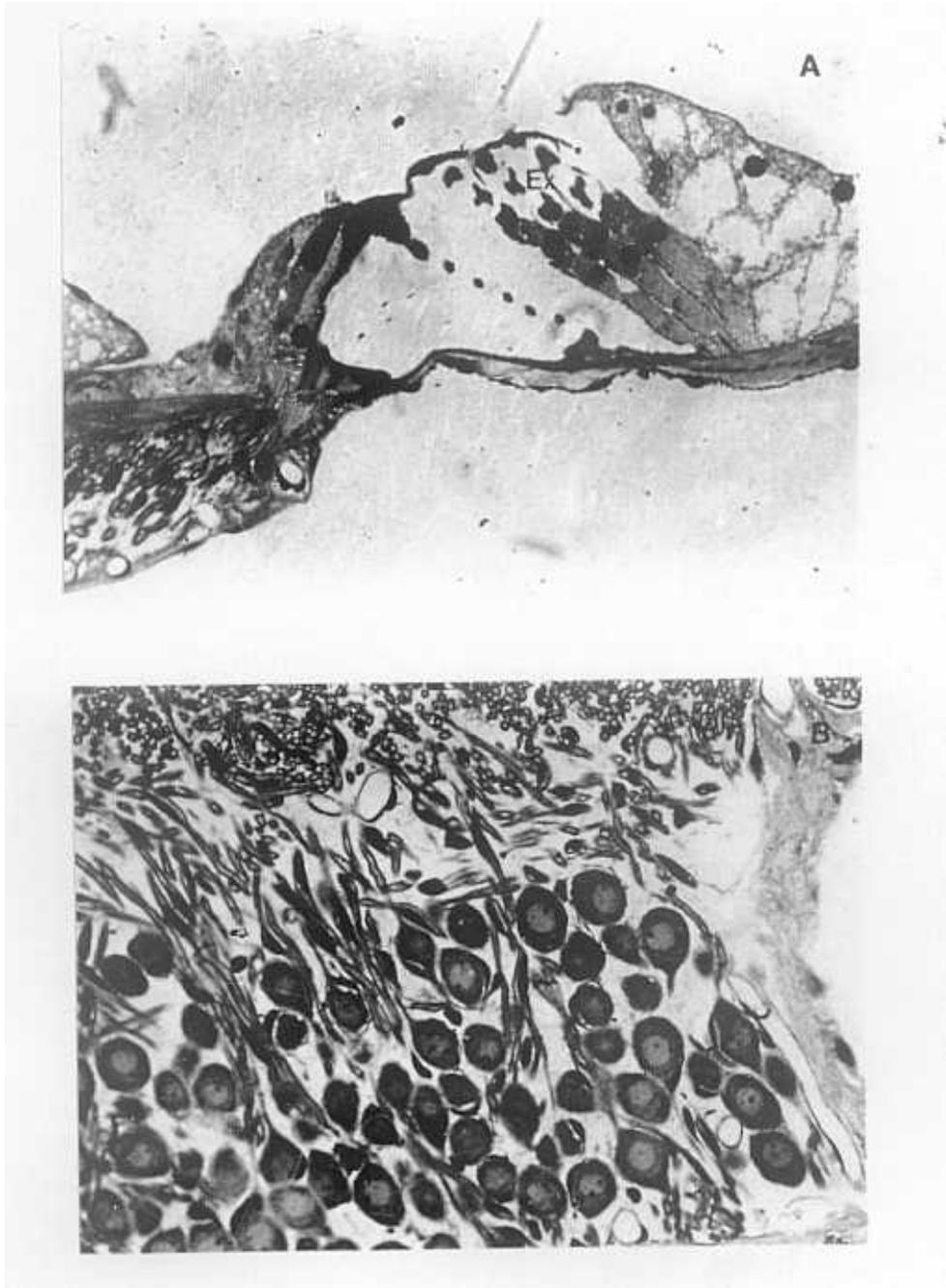


Figura 5B: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (4 mg/g) en el 9° día postnatal. a) Detalle de un órgano de Corti situado en el ápex coclear de características normales (Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)). b) Detalle del ganglio espiral a ese mismo nivel, que no muestra una disminución significativa de la población neuronal del ganglio. (a: Obj.40x; b: Obj.40x)

B.5. Grupo V

En este grupo se utilizaron 2 animales hembras que recibieron una inyección intraperitoneal de 4mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada en el día 15 PN. No se observaron convulsiones en la hora posterior a la administración del neurotóxico. Ambos animales se registraron a los 32 días de vida y la estimulación fue con una gama menor de intensidades.

Las latencias no se diferenciaron de las controles, excepto en la menor intensidad a 12 KHz ($p < 0,01$), y además presentaron una desviación de la media pequeña (tabla VI y figura 16).

Las amplitudes no se diferenciaron estadísticamente de las amplitudes control aunque se observa una disminución en 16 y 12 KHz a altas intensidades. Tenemos que señalar que los dos únicos valores significativos, fueron superiores a los valores control y correspondían a las más bajas intensidades en 8 KHz ($p < 0,5$) y 4 KHz ($p < 0,001$). Las desviaciones de la media fueron inferiores al 50% (tabla VI y figura 17).

Los valores umbrales fueron estadísticamente semejantes a los controles (tabla 6 y figura 18).

En el estudio histológico de estas cócleas no se observó diferencia con respecto a las cócleas control (Plancha 6).

TABLA VI: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo V

16KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO V				CONTROL			GRUPO V		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
39	28	0,83	0,05	4	0,85	0,05	NS	28	60,85	29,30	4	48,80	13,72	NS
38	28	0,95	0,09					28	55,59	27,28				
37	28	1,02	0,08					28	42,78	19,08				
36	28	1,08	0,08	4	1,08	0,05	NS	28	31,48	14,67	4	27,00	5,55	NS
35	28	1,18	0,10					28	12,50	6,73				
34	28	1,21	0,10					28	8,81	4,67				
33	28	1,25	0,10	4	1,19	0,08	NS	28	5,91	3,14	4	3,57	0,88	NS
32	28	1,33	0,12	4	1,27	0,08	NS	28	3,96	2,19	4	2,78	0,49	NS
31	28	1,43	0,13	4	1,35	0,08	NS	28	2,71	1,34	4	1,28	0,49	NS
30	27	1,56	0,20	3	1,42	0,06	NS	27	1,64	1,06	3	1,04	0,20	NS
29	15	1,63	0,25	2	1,43	0,03	NS	15	1,21	0,63	2	0,43	0,36	NS

12KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO V				CONTROL			GRUPO V		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
28	28	0,79	0,05	4	0,77	0,04	NS	28	86,51	55,06	4	54,73	15,47	NS
27	28	0,80	0,05	4	0,80	0,02	NS	28	78,71	43,60	4	56,78	17,73	NS
26	28	0,91	0,08					28	63,69	33,60				
25	28	0,94	0,09					28	51,81	26,06				
24	28	1,01	0,07	4	1,01	0,04	NS	28	32,98	14,70	4	27,95	6,17	NS
23	28	1,07	0,08					28	26,98	13,38				
22	28	1,13	0,09					28	22,75	11,70				
21	28	1,18	0,08	4	1,19	0,02	NS	28	15,07	8,18	4	16,73	3,95	NS
20	28	1,26	0,09	4	1,29	0,03	NS	28	8,94	6,53	4	12,00	3,03	NS
19	28	1,32	0,10	4	1,42	0,06	NS	28	3,77	3,92	4	6,63	2,04	NS
18	17	1,38	0,13	3	1,64	0,11	NS	17	1,29	1,10	3	1,96	1,18	NS

8KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO V				CONTROL			GRUPO V		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
17	28	0,91	0,08	4	0,90	0,03	NS	28	61,50	29,53	4	50,28	15,44	NS
16	28	1,01	0,10					28	44,33	20,94				
15	28	1,07	0,10					28	33,37	15,32				
14	28	1,13	0,09	4	1,10	0,02	NS	28	25,79	11,63	4	21,53	2,83	NS
13	28	1,33	0,12					28	9,23	5,02				
12	28	1,44	0,10	4	1,42	0,04	NS	28	5,02	3,04	4	8,12	2,59	NS
11	28	1,57	0,12	4	1,56	0,03	NS	28	2,62	1,63	4	4,31	1,70	NS
10	23	1,67	0,12	4	1,69	0,09	NS	23	1,70	1,22	4	3,03	1,41	NS
9	15	1,78	0,15	3	1,88	0,04	NS	15	0,89	0,42	3	1,61	0,77	*

4KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO V				CONTROL			GRUPO V		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
8	28	1,07	0,10	4	0,99	0,02	NS	28	39,33	20,10	4	38,48	11,62	NS
7	28	1,18	0,12					28	25,83	11,37				
6	28	1,27	0,09	4	1,25	0,00	NS	28	15,17	7,45	4	16,18	4,54	NS
5	28	1,43	0,11	4	1,52	0,17	NS	28	7,92	4,36	4	6,83	3,05	NS
4	28	1,72	0,14	4	1,73	0,21	NS	28	3,09	1,89	4	4,00	2,08	NS
3	26	1,88	0,17	4	1,81	0,13	NS	26	2,09	1,55	4	2,86	1,90	NS
2	20	2,01	0,17	4	1,91	0,08	NS	20	1,37	0,95	4	2,55	1,50	NS
1	11	2,11	0,20	3	2,02	0,06	NS	11	0,74	0,44	3	2,10	0,30	***

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

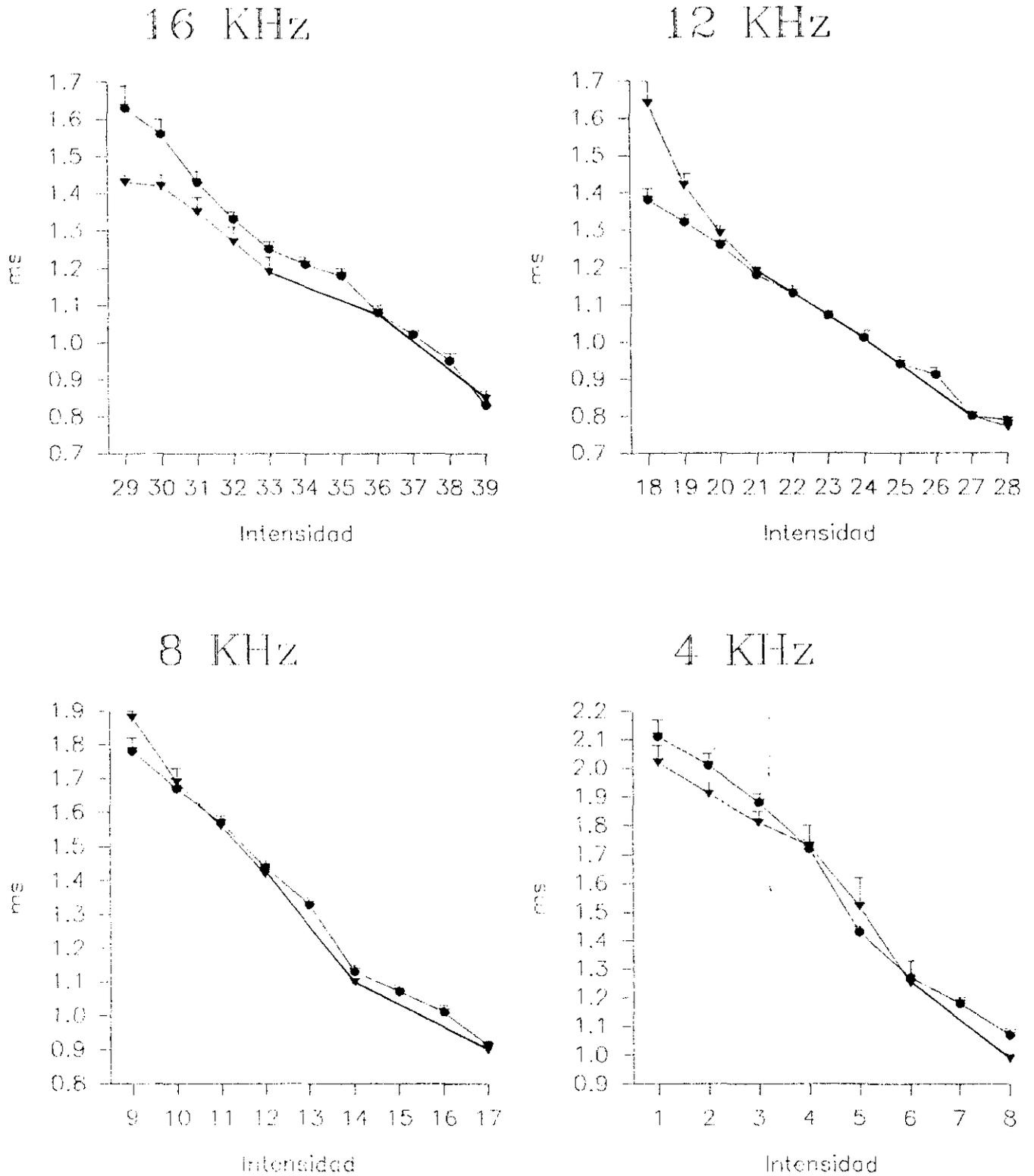
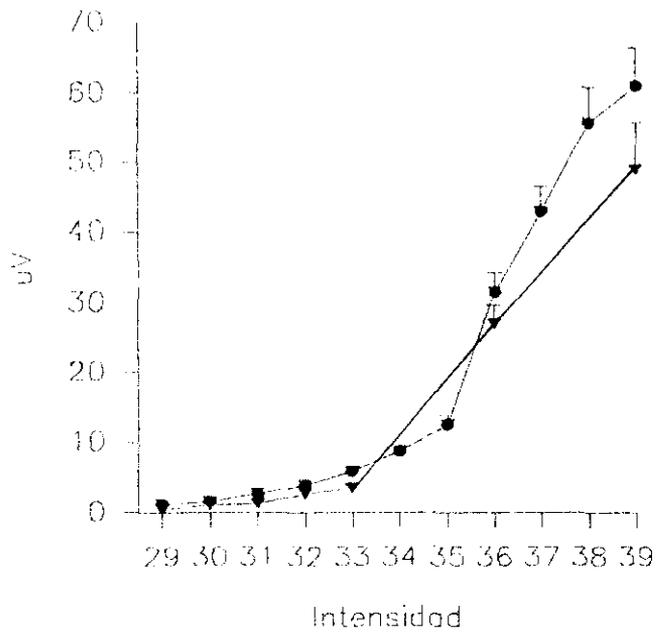
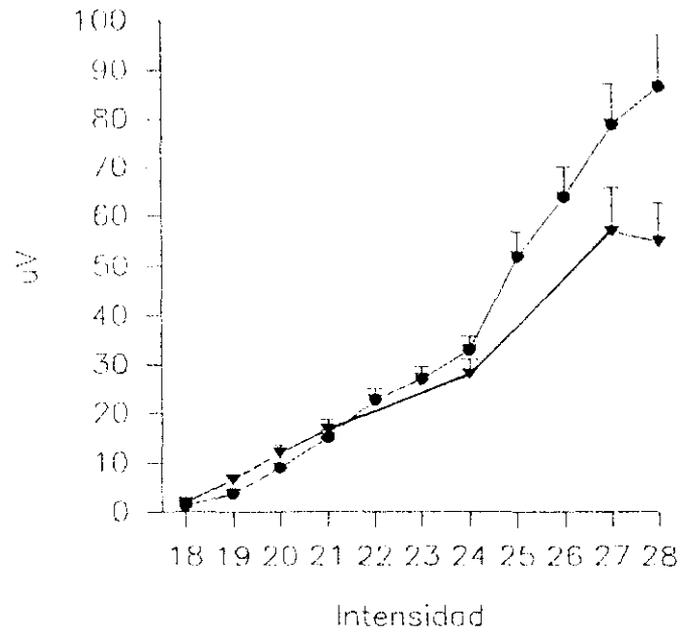


Figura 16: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados el día 15 PN con GMS (▼ , N=4)

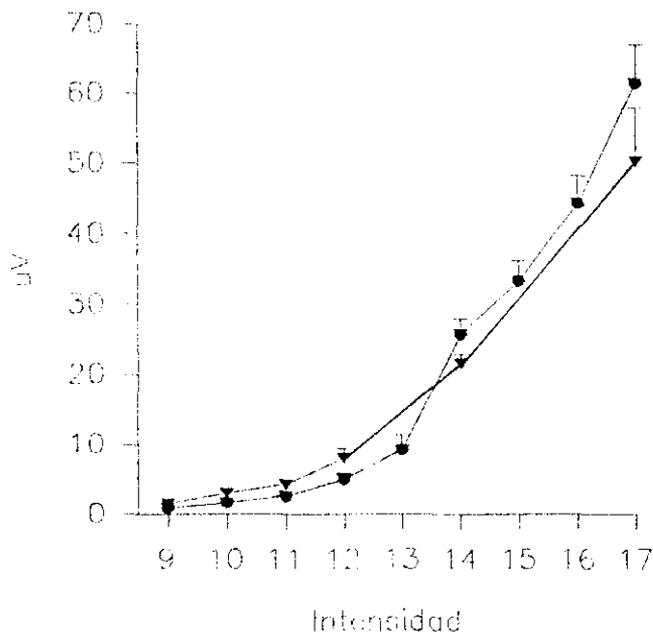
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

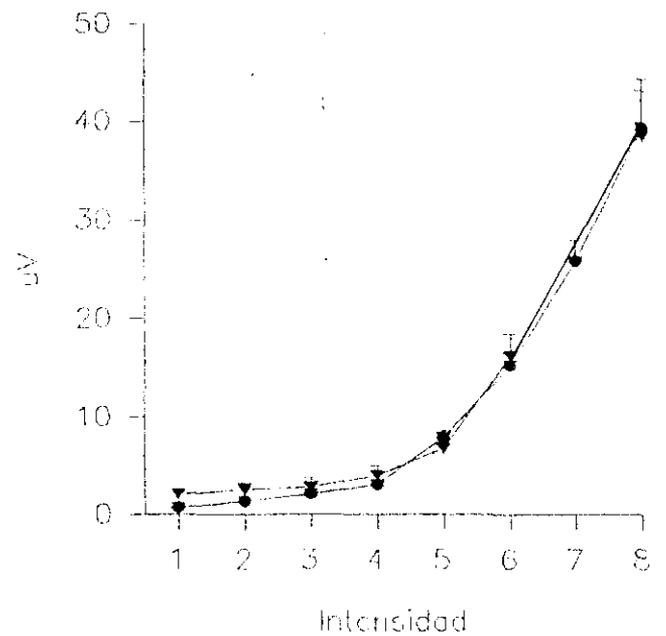


Figura 17: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados el día 15 PN con GMS (▼ , N=4)

TABLA 6: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo V

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO V			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	4	29,75	0,96	NS
12 KHz	28	18,39	0,50	4	18,25	0,50	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	4	9,25	0,50	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	4	1,25	0,50	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

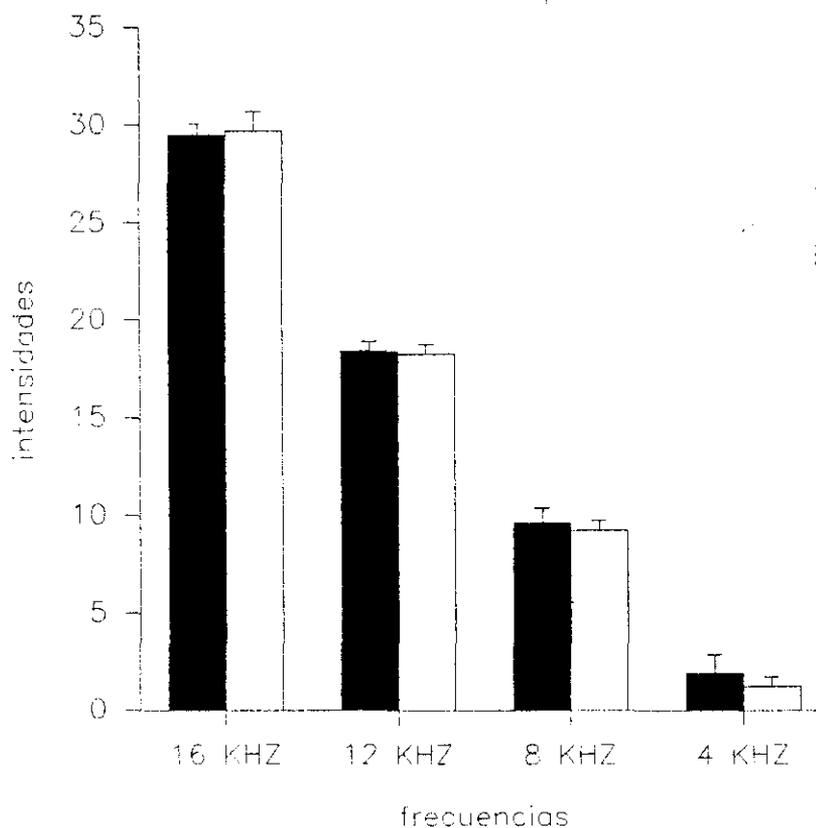


Figura 18: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo V (□, N= 4)

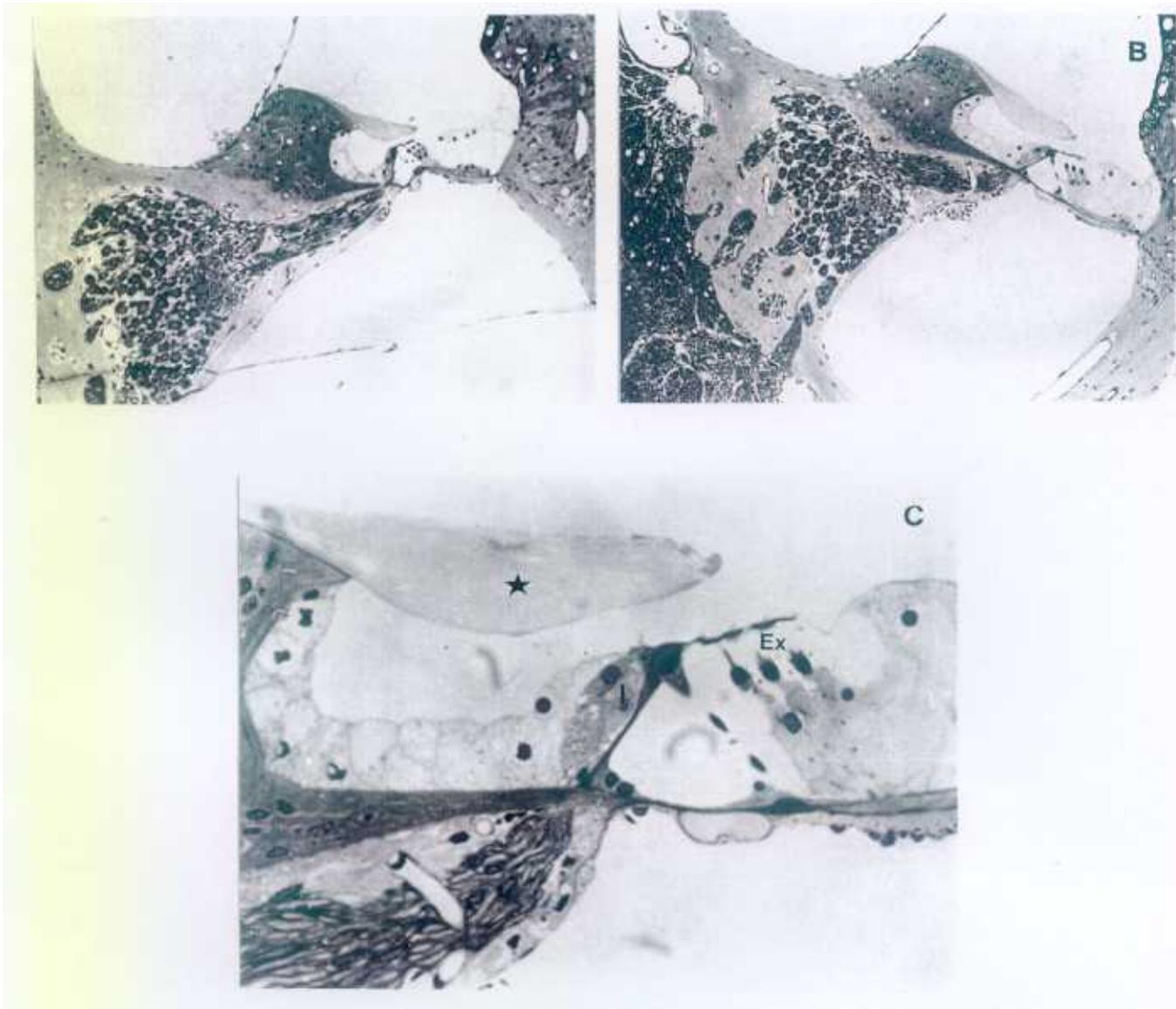


Figura 6: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (4 mg/g) en el 15° día postnatal. a) Panorámica de la rampa coclear en una espira media baja. Todas las estructuras son normales. b) Panorámica de la rampa coclear en una espira media alta, sin ninguna alteración estructural significativa. c) Detalle de un órgano de Corti de una espira media alta, en el que se observan pequeños edemas dendríticos bajo las células ciliadas internas (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)). (a: Obj.10x; b: Obj.10x; c: Obj.40x)

B. 6. Grupo VI

En este grupo se utilizaron 3 animales hembras que recibieron una inyección intraperitoneal de 2mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada durante 2 días consecutivos, el 2 y 3 PN. No se observaron convulsiones en la hora posterior a la administración del neurotóxico. Los animales fueron registrados electrofisiológicamente a los 74 (dos ratas) y 75 días de vida.

Las latencias fueron semejantes a las obtenidas en los animales control e incluso menores para 8 y 4 KHz; sólo en la más alta intensidad de 16 KHz el valor obtenido fue significativamente mayor ($p < 0,5$) al valor control. Los valores medios de las latencias de este grupo presentaron una desviación standard baja (tabla VII y figura 19).

Los valores de amplitud fueron significativamente menores a las amplitudes controles, la mayoría con $p < 0,5$, excepto para intensidades cercanas al umbral. Se puede observar que las diferencias cerca del umbral se hacen menores en las frecuencias medias de 8 y 4 KHz (4 y 5 intensidades respectivamente), mientras que en las frecuencias altas, 16 y 12 KHz, las diferencias cerca del umbral son mayores (2 y 3 intensidades respectivamente). También se puede recalcar que los valores medios presentaron un desviación standard menor del 50% (tabla VII y figura 20).

Con respecto al umbral de audición se observa un aumento a todas las frecuencias pero que sólo es estadísticamente significativo ($p < 0,01$) para 16 KHz (tabla 7 y figura 21).

El estudio morfológico de las cócleas pertenecientes a este grupo puso en evidencia la pérdida de neuronas en el ganglio espiral coclear (Plancha 7).

TABLA VII: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo VI

16KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(uV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VI				CONTROL			GRUPO VI			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
39	28	0,83	0,05	6	0,89	0,05	*	28	60,85	29,30	6	27,27	8,21	*
38	28	0,95	0,09	6	0,94	0,04	NS	28	55,59	27,28	6	24,07	8,38	*
37	28	1,02	0,08	6	1,01	0,05	NS	28	42,78	19,08	6	20,62	8,27	*
36	28	1,08	0,08	6	1,09	0,04	NS	28	31,48	14,67	6	15,31	6,78	*
35	28	1,18	0,10	6	1,18	0,05	NS	28	12,50	6,73	6	6,68	3,91	NS
34	28	1,21	0,10	6	1,22	0,07	NS	28	8,81	4,67	6	4,17	2,39	*
33	28	1,25	0,10	6	1,23	0,06	NS	28	5,91	3,14	6	3,04	1,28	*
32	28	1,33	0,12	6	1,31	0,11	NS	28	3,96	2,19	6	1,97	1,08	*
31	28	1,43	0,13	5	1,37	0,13	NS	28	2,71	1,34	5	1,29	0,69	*
30	27	1,56	0,20	4	1,46	0,15	NS	27	1,64	1,06	4	0,74	0,31	NS
29	15	1,63	0,25	0	0,00	0,00		15	1,21	0,63	0	0,00	0,00	

12KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(uV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VI				CONTROL			GRUPO VI			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
28	28	0,79	0,05	6	0,82	0,00	NS	28	86,51	55,06	6	40,28	16,86	NS
27	28	0,80	0,05	6	0,83	0,02	NS	28	78,71	43,60	6	33,67	14,76	*
26	28	0,91	0,08	6	0,89	0,03	NS	28	63,69	33,60	6	26,73	10,25	*
25	28	0,94	0,09	6	0,92	0,04	NS	28	51,81	26,06	6	22,67	7,89	*
24	28	1,01	0,07	6	1,02	0,04	NS	28	32,98	14,70	6	15,95	4,95	*
23	28	1,07	0,08	6	1,06	0,04	NS	28	26,98	13,38	6	13,30	4,16	*
22	28	1,13	0,09	6	1,11	0,06	NS	28	22,75	11,70	6	10,14	3,83	*
21	28	1,18	0,08	6	1,19	0,08	NS	28	15,07	8,18	6	6,66	3,79	*
20	28	1,26	0,09	6	1,30	0,13	NS	28	8,94	6,53	6	3,56	3,21	NS
19	28	1,32	0,10	4	1,28	0,04	NS	28	3,77	3,92	4	2,19	2,09	NS
18	17	1,38	0,13	3	1,54	0,16	NS	17	1,29	1,10	3	1,14	0,35	NS

8KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(uV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VI				CONTROL			GRUPO VI			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
17	28	0,91	0,08	6	0,92	0,04	NS	28	61,50	29,53	6	23,72	9,26	**
16	28	1,01	0,10	6	0,99	0,03	NS	28	44,33	20,94	6	18,12	6,90	**
15	28	1,07	0,10	6	1,04	0,03	NS	28	33,37	15,32	6	14,49	5,14	**
14	28	1,13	0,09	6	1,09	0,04	NS	28	25,79	11,63	6	11,38	4,24	**
13	28	1,33	0,12	6	1,29	0,08	NS	28	9,23	5,02	6	4,64	2,95	*
12	28	1,44	0,10	6	1,38	0,08	NS	28	5,02	3,04	6	2,77	1,90	NS
11	28	1,57	0,12	6	1,54	0,17	NS	28	2,62	1,63	6	1,93	0,87	NS
10	23	1,67	0,12	3	1,52	0,10	NS	23	1,70	1,22	3	1,64	0,99	NS
9	15	1,78	0,15	2	1,76	0,17	NS	15	0,89	0,42	2	1,06	0,68	NS

4KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(uV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VI				CONTROL			GRUPO VI			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
8	28	1,07	0,10	6	1,01	0,02	NS	28	39,33	20,10	6	20,57	7,67	*
7	28	1,18	0,12	6	1,19	0,08	NS	28	25,83	11,37	6	11,26	4,49	**
6	28	1,27	0,09	6	1,23	0,02	NS	28	15,17	7,45	6	7,73	2,78	*
5	28	1,43	0,11	6	1,38	0,07	NS	28	7,92	4,36	6	4,64	2,29	NS
4	28	1,72	0,14	6	1,63	0,08	NS	28	3,09	1,89	6	2,68	1,12	NS
3	26	1,88	0,17	6	1,77	0,13	NS	26	2,09	1,55	6	1,54	1,14	NS
2	20	2,01	0,17	4	1,99	0,14	NS	20	1,37	0,95	4	1,27	0,44	NS
1	11	2,11	0,20	1	2,03	0,00		11	0,74	0,44	1	1,70	0,00	

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standar, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

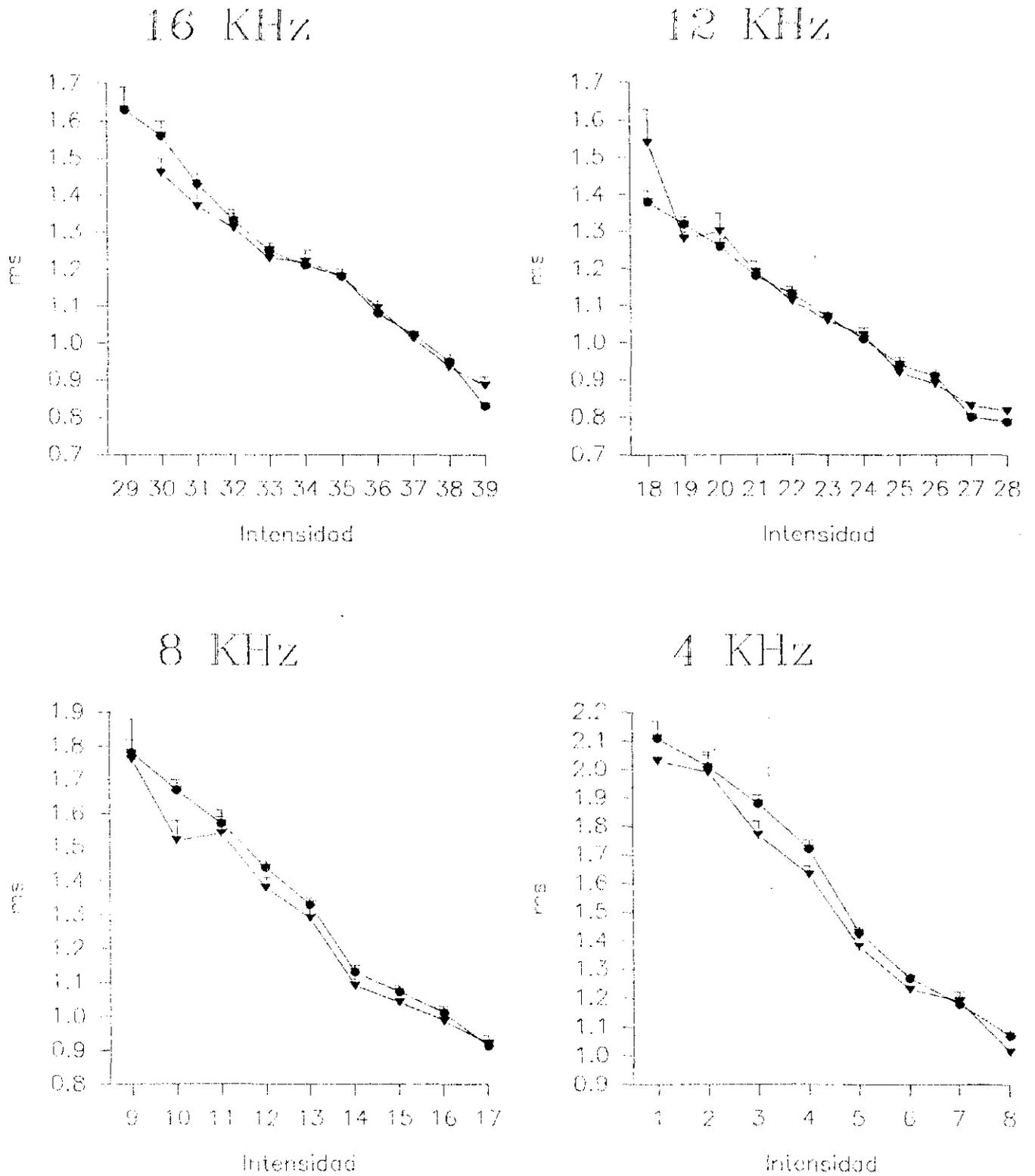
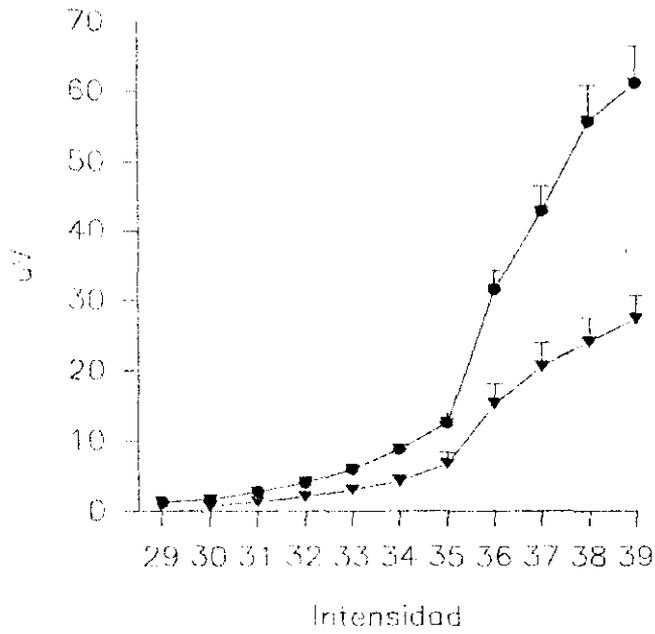
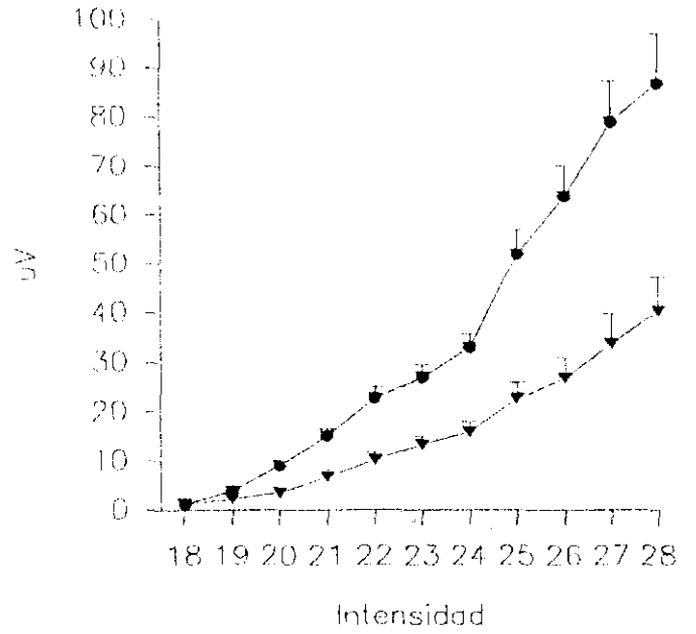


Figura 19: latencias obtenidas en los animales controles (• , N=38) frente a los animales tratados los días 2 y 3 PN con GMS (▼ , N=6)

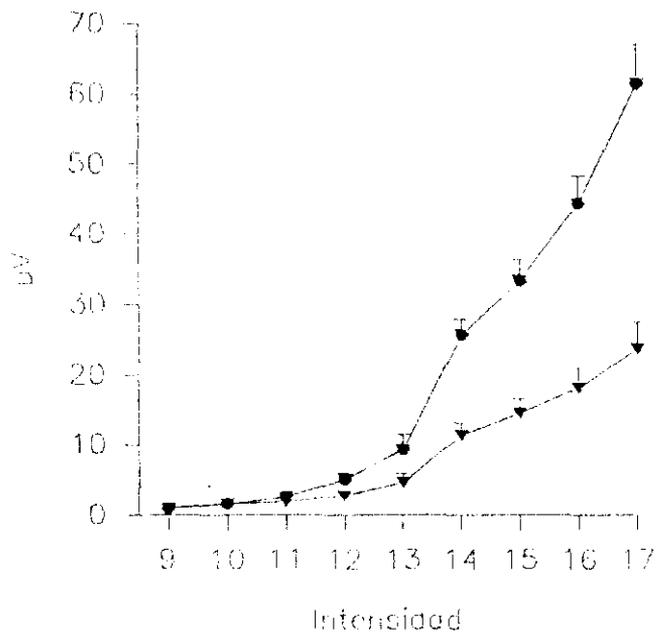
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

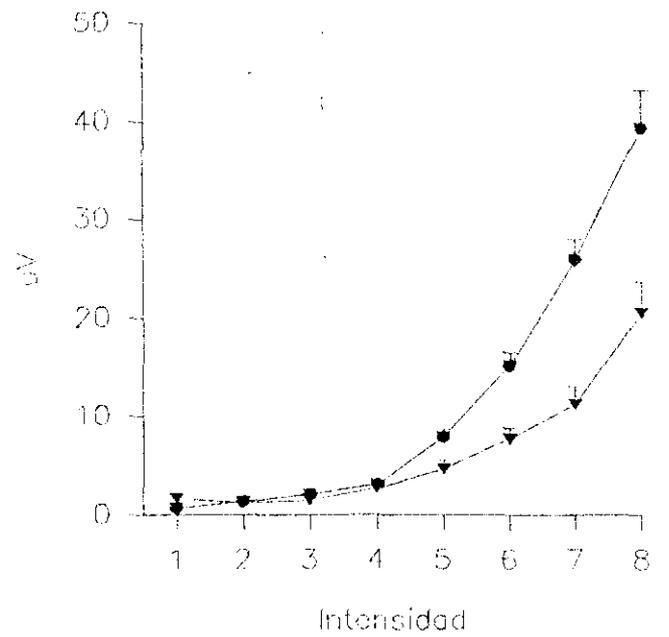


Figura 20: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados los días 2 y 3 PN con GMS (▼ , N=6)

TABLA 7: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo VI

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO VI			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	6	30,50	0,84	**
12 KHz	28	18,39	0,50	6	18,83	0,98	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	6	10,17	0,98	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	6	2,17	0,75	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

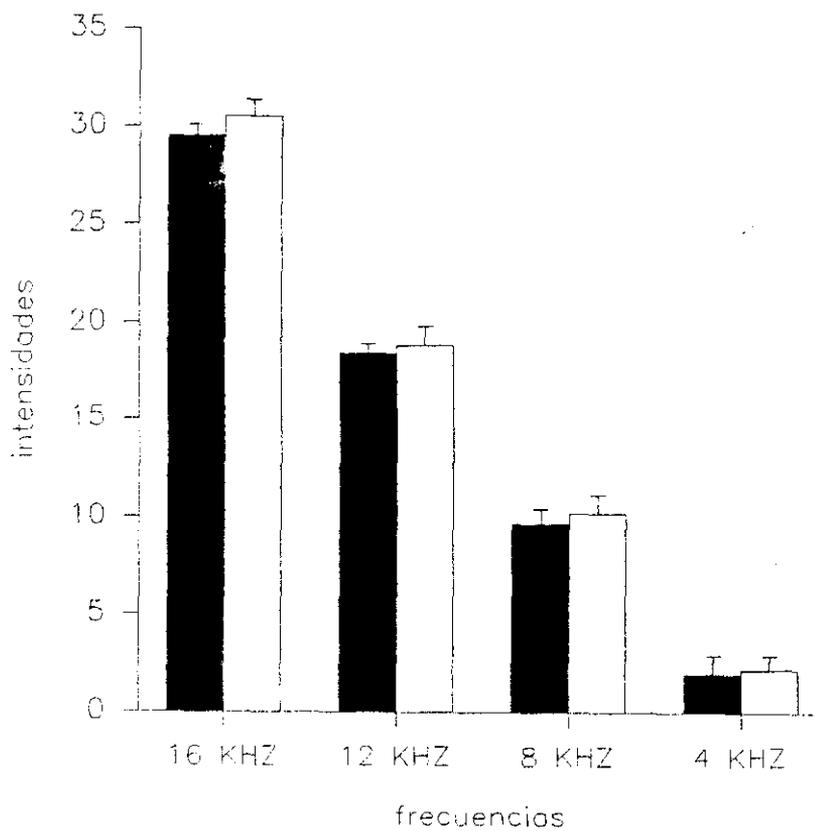


Figura 21: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo VI (□, N= 6)

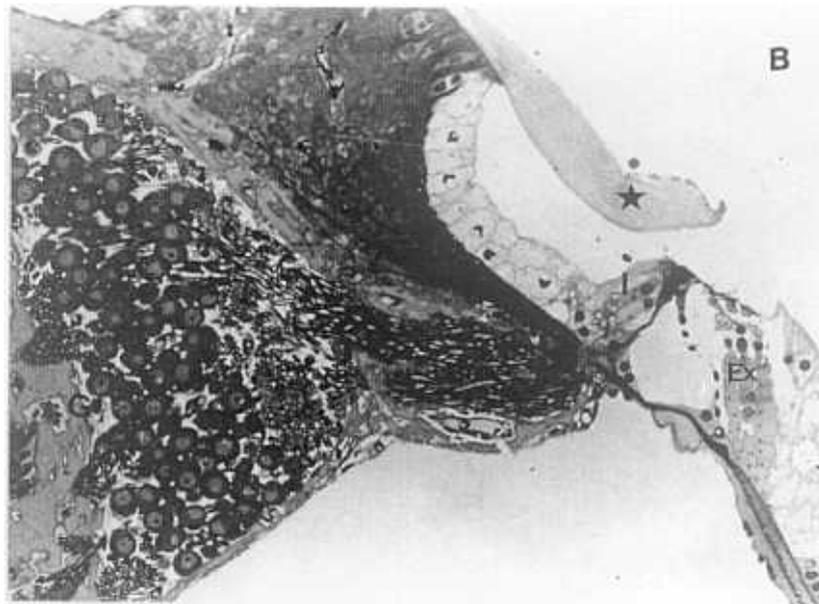
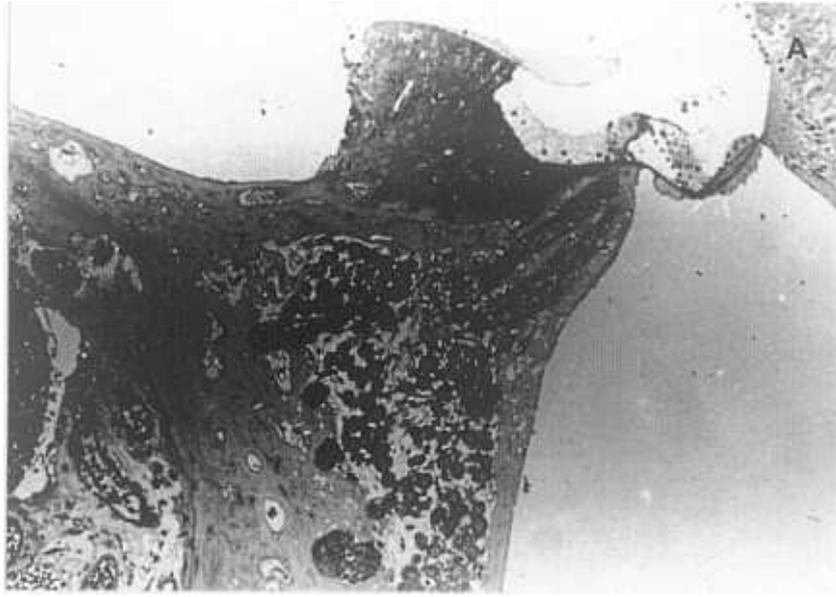


Figura 7: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (2 mg/g) el 2° día y el 3° día postnatal. a) Panorámica de un órgano de Corti y del ganglio de una espira media baja, en el que se observa una discreta disminución de neuronas. b) Detalle de un órgano de Corti (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)) y del ganglio espiral (G) de una espira media sin aparentes alteraciones. (a: Obj.10x; b: Obj.20x)

B.7. Grupo VII

En este grupo se utilizaron 3 animales, 2 hembras y un macho, que recibieron una inyección intraperitoneal de 2mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada durante 3 días consecutivos, el 2, 3 y 4 PN. No se observaron convulsiones en la hora posterior a la administración del neurotóxico. Los animales fueron registrados electrofisiológicamente a los 66, 67 y 70 días de vida. Los datos obtenidos del registro de la rata macho presentaron un comportamiento muy peculiar ya que en uno de los oídos no se pudo obtener señal electrofisiológica excepto a muy altas intensidades mientras que en el otro se obtuvieron latencias y amplitudes muy elevadas; debido a este extraño comportamiento estos datos fueron eliminados de la comparación estadística.

Los valores de la latencia fueron muy superiores a los valores controles y con una significación estadística muy alta ($p < 0,001$) para todas las intensidades y a todas las frecuencias. Sin embargo, los valores medios presentaron una desviación standard normal (tabla VIII y figura 22).

Los resultados obtenidos en la amplitud fueron inferiores a los valores control, no obstante, y debido a la gran desviación standard que presentaron (mayor al 50%), solamente resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,5$) las medias correspondientes a altas intensidades de estimulación en 16 KHz (39 y 37); altas y medias intensidades en 8 KHz (17, 16, 15, 14 y 13); dos intensidades en 12 KHz (24 y 21) y una (7) en 4 KHz (tabla VIII y figura 23).

Como puede observarse en la tabla 8 y en la figura 24, los umbrales de audición aumentaron en todas las frecuencias aunque

las medias no fueron estadísticamente significativas para ninguna de ellas.

El estudio morfológico de los cortes de cócleas pertenecientes a este grupo no se pudo llevar a cabo debido a problemas surgidos de improviso.

TABLA VIII: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo VII

16KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(µV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VII				CONTROL			GRUPO VII			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
39	28	0,83	0,05	4	1,12	0,06	***	28	60,85	29,30	4	29,43	16,76	*
38	28	0,95	0,09	4	1,20	0,04	***	28	55,59	27,28	4	26,85	15,31	NS
37	28	1,02	0,08	4	1,30	0,06	***	28	42,78	19,08	4	21,14	12,86	*
36	28	1,08	0,08	4	1,45	0,03	***	28	31,48	14,67	4	21,40	10,34	NS
35	28	1,18	0,10	4	1,47	0,02	***	28	12,50	6,73	4	9,61	4,08	NS
34	28	1,21	0,10	4	1,49	0,03	***	28	8,81	4,67	4	6,25	2,91	NS
33	28	1,25	0,10	4	1,62	0,08	***	28	5,91	3,14	4	3,40	2,06	NS
32	28	1,33	0,12	4	1,62	0,10	***	28	3,96	2,19	4	2,13	1,61	NS
31	28	1,43	0,13	3	1,81	0,18	***	28	2,71	1,34	3	2,50	0,75	NS
30	27	1,56	0,20	3	2,02	0,22	**	27	1,64	1,06	3	1,39	0,08	NS
29	15	1,63	0,25	1	2,19	0,00		15	1,21	0,63	1	0,65	0,00	

12KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(µV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VII				CONTROL			GRUPO VII			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
28	28	0,79	0,05	4	1,12	0,06	***	28	86,51	55,06	4	42,35	31,02	NS
27	28	0,80	0,05	4	1,14	0,06	***	28	78,71	43,60	4	38,70	30,54	NS
26	28	0,91	0,08	4	1,18	0,05	***	28	63,69	33,60	4	31,58	21,98	NS
25	28	0,94	0,09	4	1,22	0,05	***	28	51,81	26,06	4	26,03	16,46	NS
24	28	1,01	0,07	4	1,30	0,05	***	28	32,98	14,70	4	17,27	9,99	NS
23	28	1,07	0,08	4	1,37	0,03	***	28	26,98	13,38	4	18,00	7,90	NS
22	28	1,13	0,09	4	1,38	0,05	***	28	22,75	11,70	4	13,30	5,58	NS
21	28	1,18	0,08	4	1,49	0,04	***	28	15,07	8,18	4	4,96	2,80	*
20	28	1,26	0,09	4	1,50	0,07	***	28	8,94	6,53	4	2,90	1,35	NS
19	28	1,32	0,10	3	1,60	0,08	***	28	3,77	3,92	3	1,68	0,39	NS
18	17	1,38	0,13	3	1,64	0,07	**	17	1,29	1,10	3	0,84	0,13	NS

8KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(µV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VII				CONTROL			GRUPO VII			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
17	28	0,91	0,08	4	1,21	0,06	***	28	61,50	29,53	4	29,40	17,77	*
16	28	1,01	0,10	4	1,28	0,04	***	28	44,33	20,94	4	22,10	13,06	NS
15	28	1,07	0,10	4	1,35	0,04	***	28	33,37	15,32	4	15,87	9,39	*
14	28	1,13	0,09	4	1,41	0,03	***	28	25,79	11,63	4	11,94	6,22	*
13	28	1,33	0,12	4	1,68	0,03	***	28	9,23	5,02	4	3,71	1,53	*
12	28	1,44	0,10	4	1,72	0,10	***	28	5,02	3,04	4	2,59	1,13	NS
11	28	1,57	0,12	3	1,73	0,02	*	28	2,62	1,63	3	1,48	0,96	NS
10	23	1,67	0,12	2	1,88	0,22	*	23	1,70	1,22	2	0,97	0,61	NS
9	15	1,78	0,15	2	2,13	0,03	**	15	0,89	0,42	2	0,81	0,16	NS

4KHz														
LATENCIA(ms)								AMPLITUD(µV)						
INT.	CONTROL			GRUPO VII				CONTROL			GRUPO VII			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
8	28	1,07	0,10	4	1,39	0,11	***	28	39,33	20,10	4	19,01	12,55	NS
7	28	1,18	0,10	4	1,47	0,01	***	28	25,83	11,37	4	12,75	7,80	*
6	28	1,27	0,09	4	1,49	0,05	***	28	15,17	7,45	4	7,93	5,23	NS
5	28	1,43	0,11	4	1,70	0,08	***	28	7,92	4,36	4	6,82	2,87	NS
4	28	1,72	0,14	4	1,95	0,14	*	28	3,09	1,89	4	2,92	1,43	NS
3	26	1,88	0,17	3	2,17	0,28	*	26	2,09	1,55	3	2,03	0,31	NS
2	20	2,01	0,17	2	2,27	0,00	*	20	1,37	0,95	2	0,85	0,20	NS
1	11	2,11	0,20	0	0,00	0,00		11	0,74	0,44	0	0,00	0,00	

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, µV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

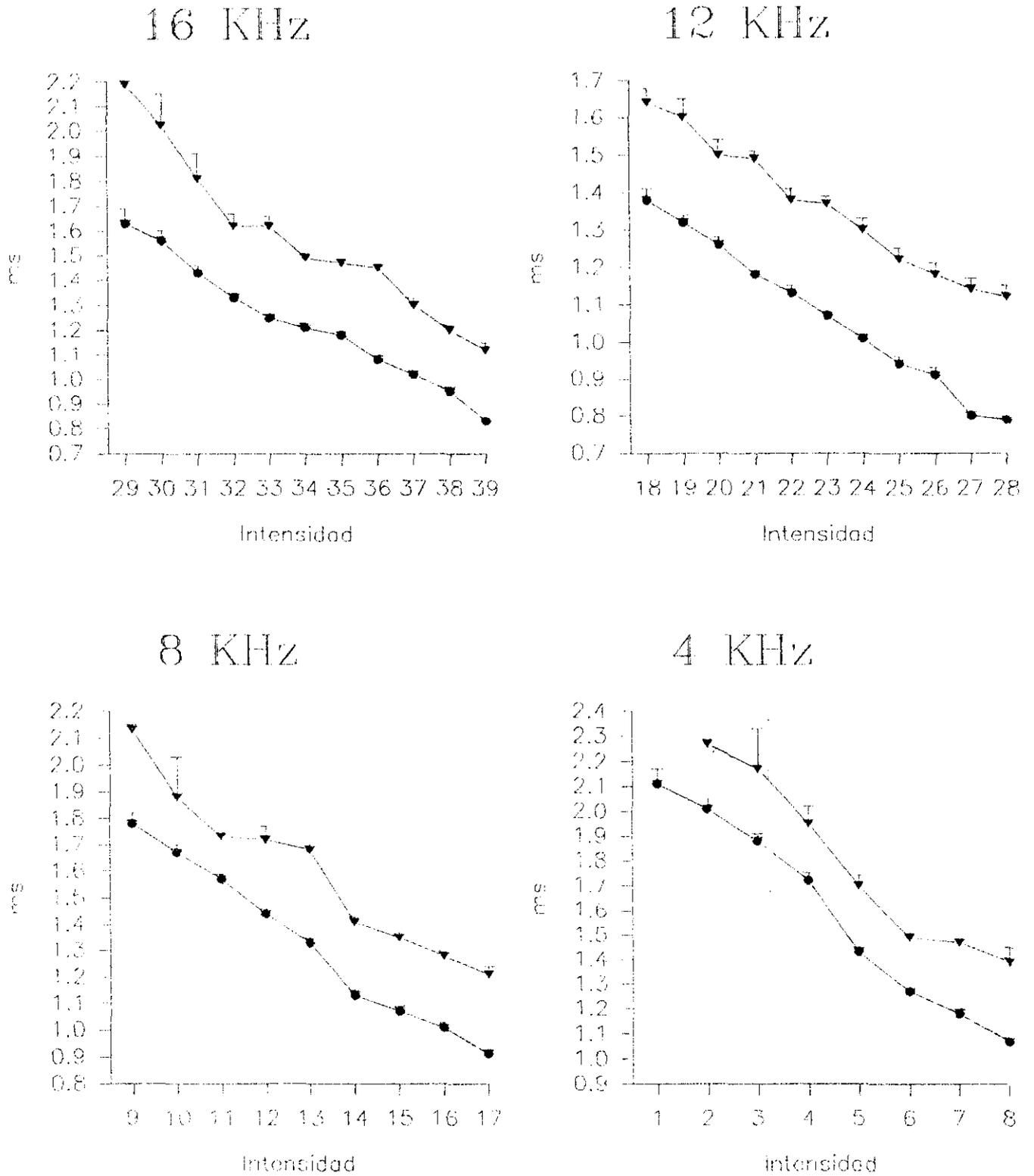
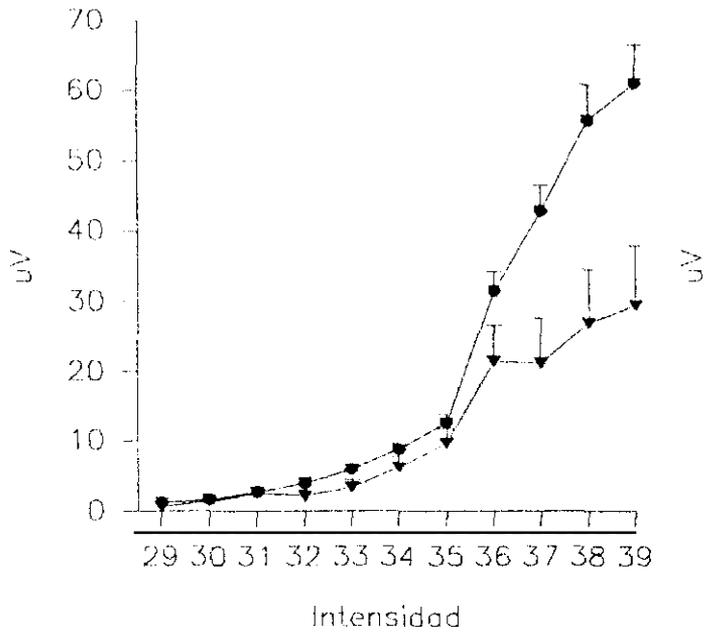
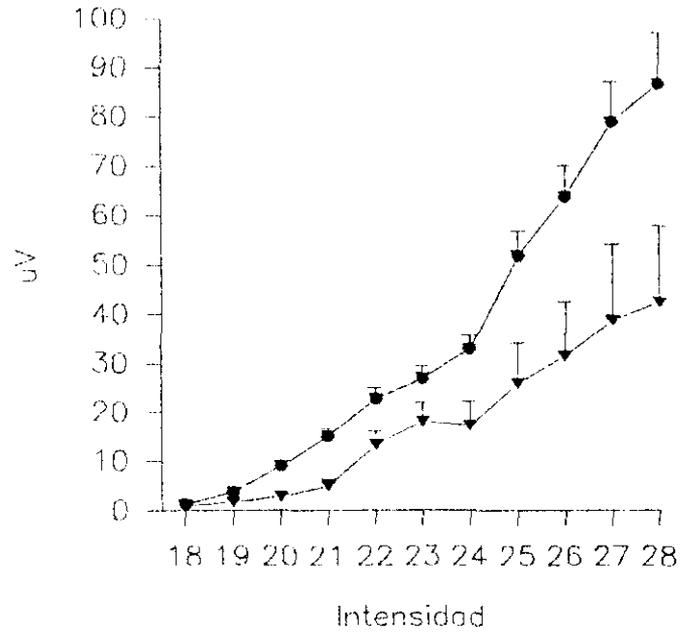


Figura 22: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados los días 2, 3 y 4 PN con GMS (▼ , N=4)

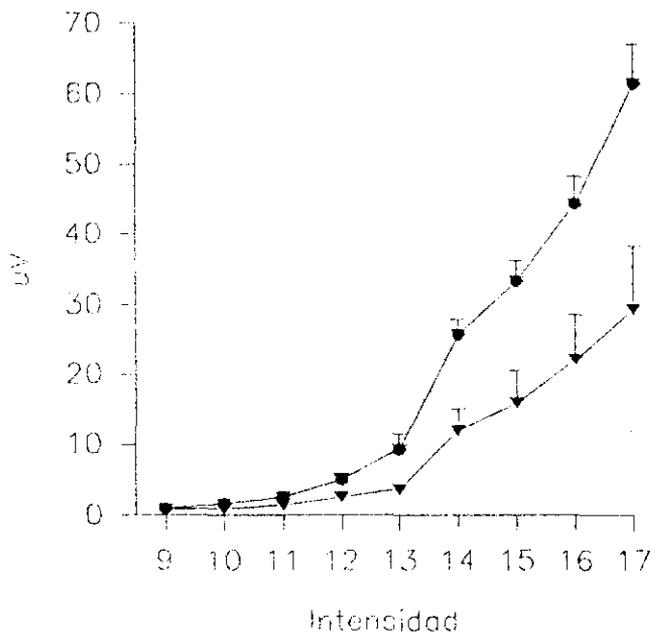
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

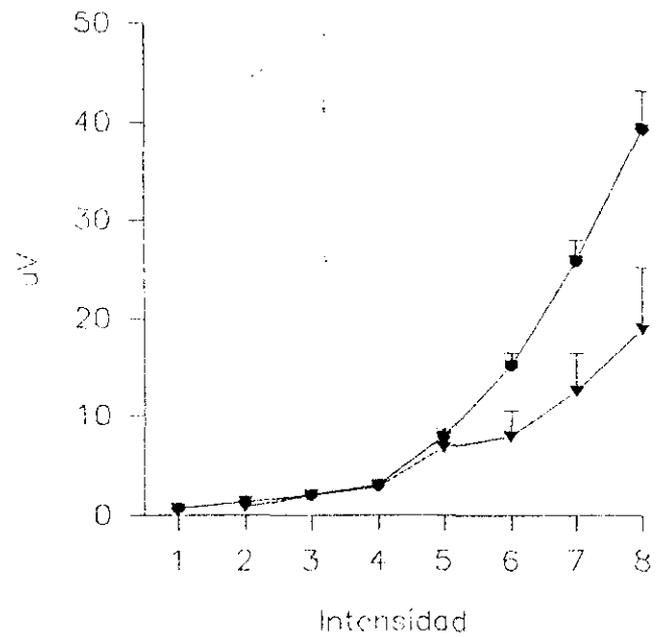


Figura 23: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados los días 2, 3 y 4 PN con GMS (▼ , N=4)

TABLA 8: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo VII

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO VII			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	4	30,25	1,26	NS
12 KHz	28	18,39	0,50	4	18,50	1,00	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	4	10,25	1,50	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	4	2,75	0,96	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

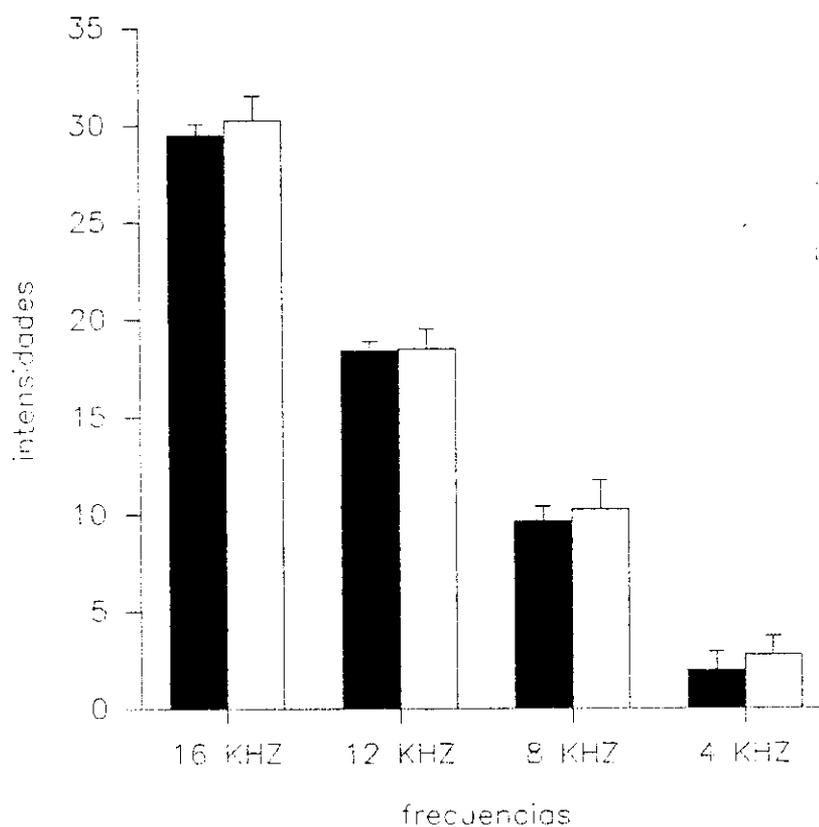


Figura 24: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo VII (□, N= 4)

B.8. Grupo VIII

En este grupo se utilizaron 6 animales hembras que recibieron una inyección intraperitoneal de 2mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada durante 8 días consecutivos, del 2 al 9 PN. Tres de los animales murieron durante el tratamiento: en los días 1, 5 y 6; en las ratas que murieron en los días 5 y 6 se registró una disminución del peso corporal con respecto al día previo a la muerte. Sólo en una de ellas se pudo observar rotaciones corporales atípicas durante la hora posterior a la administración del neurotóxico. Los animales que sobrevivieron al tratamiento fueron registrados electrofisiológicamente a los 70, 74 y 75 días de vida.

Las latencias fueron mayores que las registradas en los animales controles, y con muy alta significación estadística ($p < 0,001$) excepto en las intensidades próximas al umbral de audición a todas las frecuencias, menos a 12 KHz, y en la mayor intensidad de 12 KHz. Las desviaciones de la media fueron semejantes e incluso menores a las desviaciones obtenidas en los animales control. Hay que hacer notar que en altas frecuencias 16 y 12 KHz el aumento de la latencia sufre un brusco incremento al pasar de altas a medias intensidades (tabla IX y figura 25).

Las amplitudes fueron menores que las amplitudes control, presentaron, en general, una desviación muy por debajo del 50% y fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$ y $p < 0,001$) excepto en los valores próximos al umbral. Hay que destacar que en la frecuencia de 16 KHz se obtienen valores muy semejantes en las dos intensidades mayores (tabla IX y figura 26).

En cuanto a los umbrales, se produce un aumento en todas las frecuencias que es estadísticamente significativo para 16 Khz ($p < 0,001$) y 12 KHz ($p < 0,1$) (tabla 9 y figura 27).

Los cortes procedentes de las cócleas de este grupo mostraron una clara disminución de las neuronas del ganglio espiral coclear sobre todo en las espiras basales (Plancha 8).

TABLA IX: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo VIII

16KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO VIII				CONTROL			GRUPO VIII			P
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	
39	28	0,83	0,05	6	0,97	0,15	***	28	60,85	29,30	6	12,73	5,42	***
38	28	0,95	0,09	6	1,17	0,09	***	28	55,59	27,28	6	13,00	6,37	***
37	28	1,02	0,08	6	1,28	0,07	***	28	42,78	19,08	6	8,89	4,54	***
36	28	1,08	0,08	6	1,36	0,09	***	28	31,48	14,67	6	6,94	3,26	***
35	28	1,18	0,10	6	1,52	0,11	***	28	12,50	6,73	6	3,23	1,73	**
34	28	1,21	0,10	4	1,51	0,04	***	28	8,81	4,67	4	2,02	1,29	**
33	28	1,25	0,10	3	1,55	0,02	***	28	5,91	3,14	3	2,04	0,81	*
32	28	1,33	0,12	2	1,56	0,06	**	28	3,96	2,19	2	1,26	0,51	NS
31	28	1,43	0,13	2	1,74	0,20	**	28	2,71	1,34	2	0,94	0,47	NS
30	27	1,56	0,20	2	1,74	0,20	NS	27	1,64	1,06	2	1,10	0,58	NS
29	15	1,63	0,25	0	0,00	0,00		15	1,21	0,63	0	0,00	0,00	

12KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO VIII				CONTROL			GRUPO VIII			P
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	
28	28	0,79	0,05	6	0,82	0,11	NS	28	86,51	55,06	6	31,32	12,28	*
27	28	0,80	0,05	6	1,01	0,18	***	28	78,71	43,60	6	22,18	6,18	**
26	28	0,91	0,08	6	1,17	0,04	***	28	63,69	33,60	6	13,08	3,84	**
25	28	0,94	0,09	6	1,18	0,05	***	28	51,81	26,06	6	11,57	3,28	***
24	28	1,01	0,07	6	1,26	0,07	***	28	32,98	14,70	6	8,82	2,67	***
23	28	1,07	0,08	6	1,33	0,08	***	28	26,98	13,38	6	6,78	2,39	**
22	28	1,13	0,09	6	1,40	0,08	***	28	22,75	11,70	6	5,10	1,43	**
21	28	1,18	0,08	6	1,50	0,11	***	28	15,07	8,18	6	3,54	1,15	**
20	28	1,26	0,09	6	1,58	0,17	***	28	8,94	6,53	6	1,99	1,34	*
19	28	1,32	0,10	4	1,83	0,33	***	28	3,77	3,92	4	1,16	0,64	NS
18	17	1,38	0,13	1	1,64			17	1,29	1,10	1	0,84	0,00	

8KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO VIII				CONTROL			GRUPO VIII			P
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	
17	28	0,91	0,08	6	1,14	0,11	***	28	61,50	29,53	6	12,97	3,23	***
16	28	1,01	0,10	6	1,22	0,07	***	28	44,33	20,94	6	9,37	1,92	***
15	28	1,07	0,10	6	1,27	0,07	***	28	33,37	15,32	6	7,67	1,44	***
14	28	1,13	0,09	6	1,34	0,09	***	28	25,79	11,63	6	6,86	2,41	***
13	28	1,33	0,12	6	1,57	0,10	***	28	9,23	5,02	6	2,86	0,90	**
12	28	1,44	0,10	6	1,64	0,09	***	28	5,02	3,04	6	1,74	0,80	*
11	28	1,57	0,12	6	1,71	0,09	*	28	2,62	1,63	6	1,05	0,34	*
10	23	1,67	0,12	3	1,77	0,02	NS	23	1,70	1,22	3	1,09	0,48	NS
9	15	1,78	0,15	2	1,94	0,08	NS	15	0,89	0,42	2	0,75	0,41	NS

4KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(µV)						
	CONTROL			GRUPO VIII				CONTROL			GRUPO VIII			P
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	
8	28	1,07	0,10	6	1,33	0,14	***	28	39,33	20,10	6	12,28	3,84	**
7	28	1,18	0,12	6	1,33	0,13	**	28	25,83	11,37	6	7,40	2,13	***
6	28	1,27	0,09	6	1,44	0,10	***	28	15,17	7,45	6	4,57	1,67	**
5	28	1,43	0,11	6	1,60	0,12	***	28	7,92	4,36	6	2,89	0,21	*
4	28	1,72	0,14	6	1,84	0,14	NS	28	3,09	1,89	6	1,27	0,33	*
3	26	1,88	0,17	6	1,97	0,15	NS	26	2,09	1,55	6	0,88	0,31	NS
2	20	2,01	0,17	3	2,11	0,11	NS	20	1,37	0,95	3	1,39	0,71	NS
1	11	2,11	0,20	0	0,00	0,00		11	0,74	0,44	0	0,00	0,00	

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, µV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

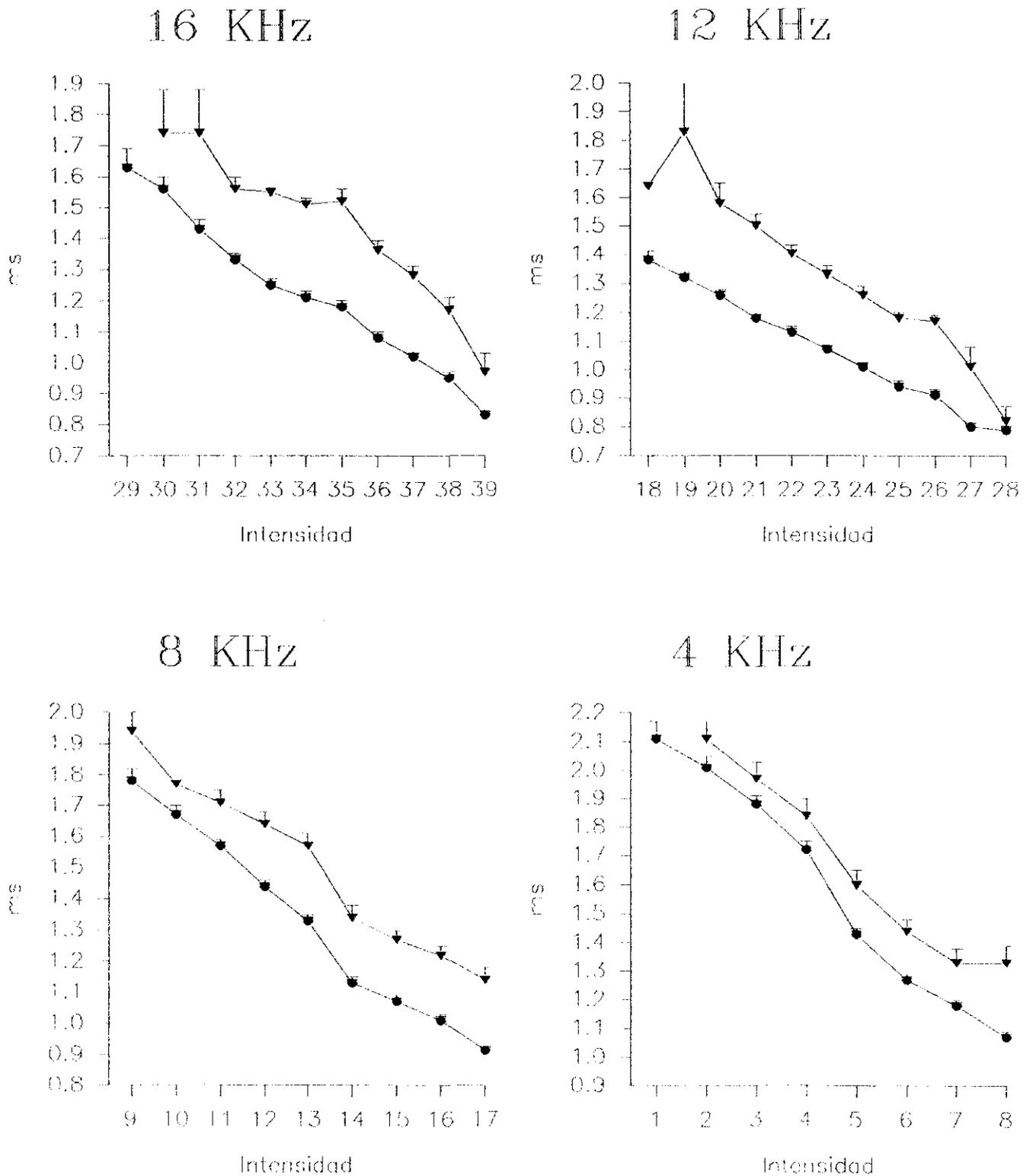
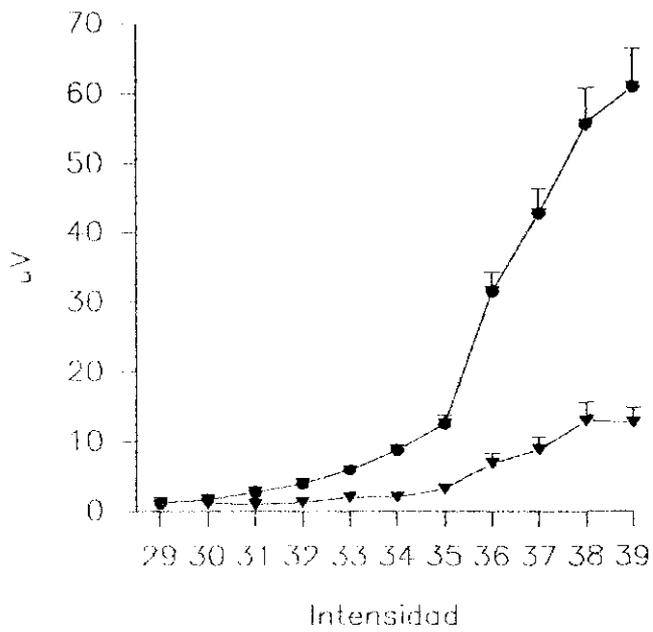
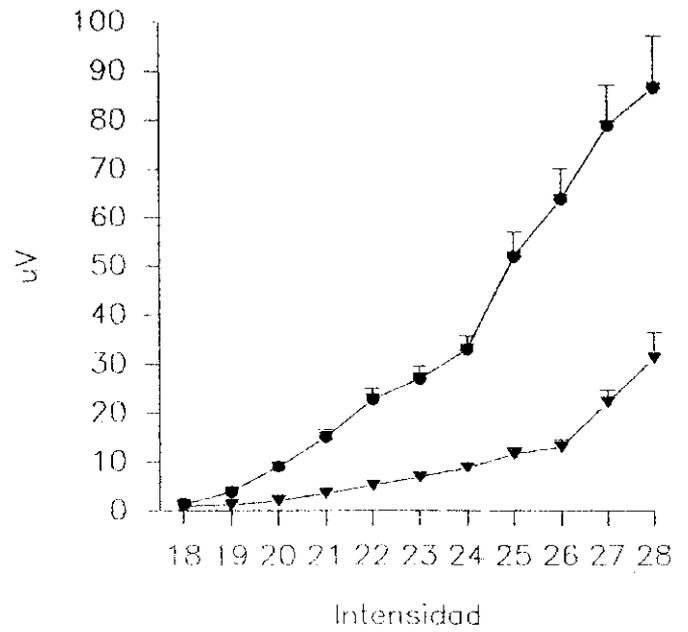


Figura 25: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N= 28) frente a los animales tratados los días 2 al 9 PN con GMS (▼ , N= 6)

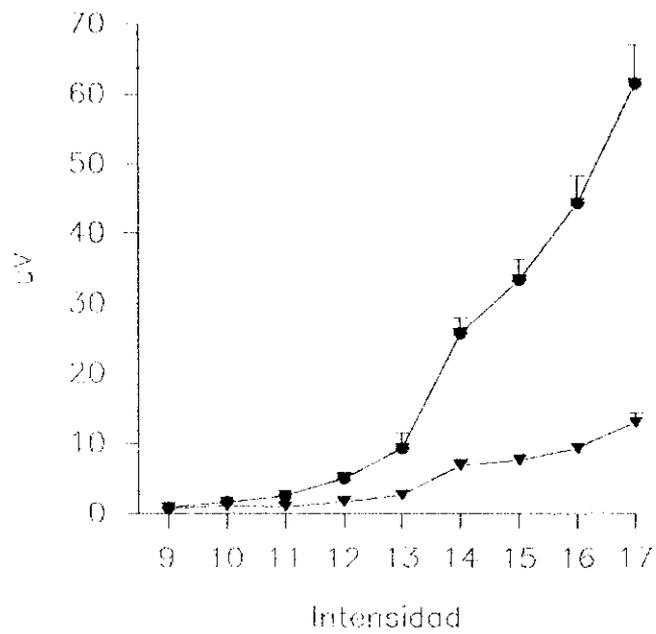
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

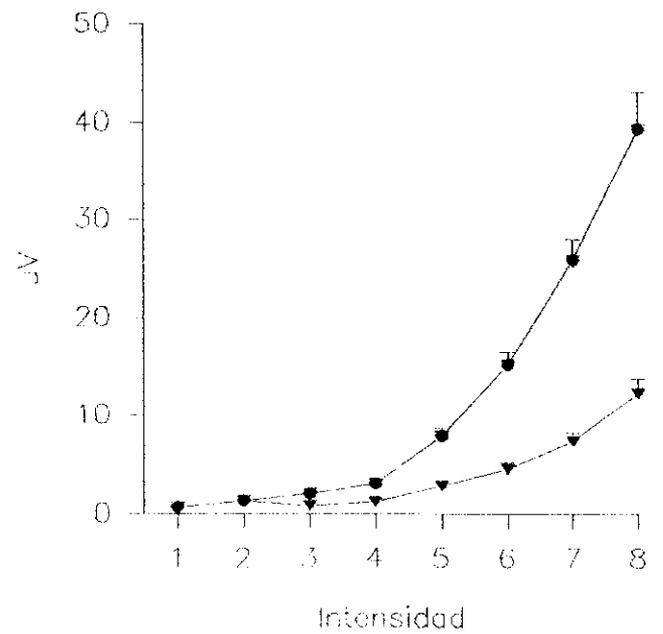


Figura 26: Amplitudes obtenidas en los animales controles (● , N=28) frente a los animales tratados los días 2 al 9 PN con GMS (▼ , N=6)

TABLA 9: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo VIII

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO VIII			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	6	32,83	2,32	***
12 KHz	28	18,39	0,50	6	19,17	0,75	**
8 KHz	28	9,64	0,78	6	10,17	0,98	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	6	2,50	0,55	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

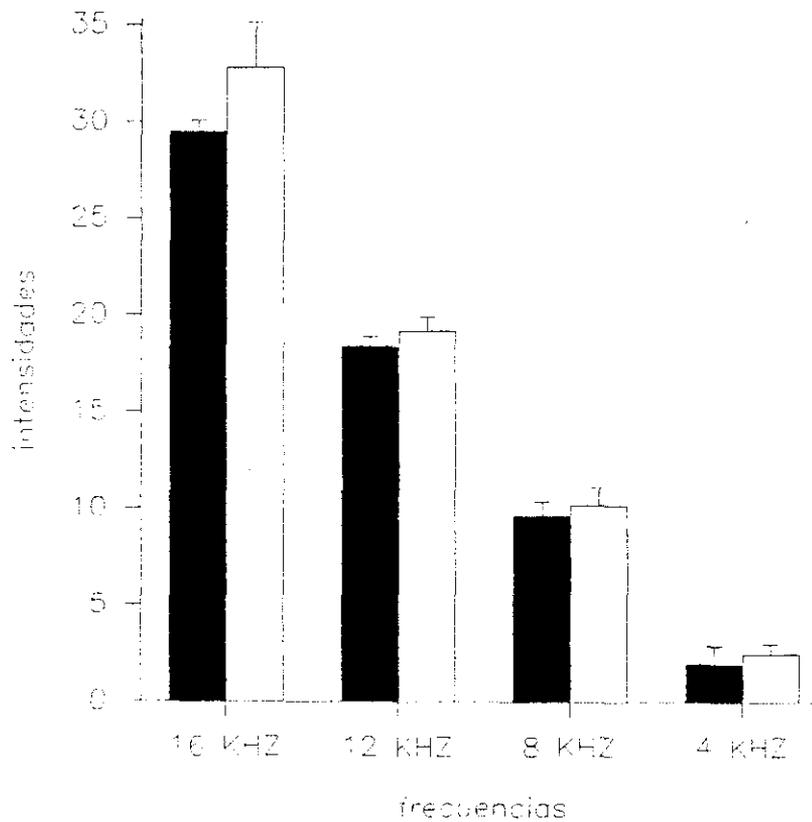


Figura 27: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo VIII (□, N= 6)

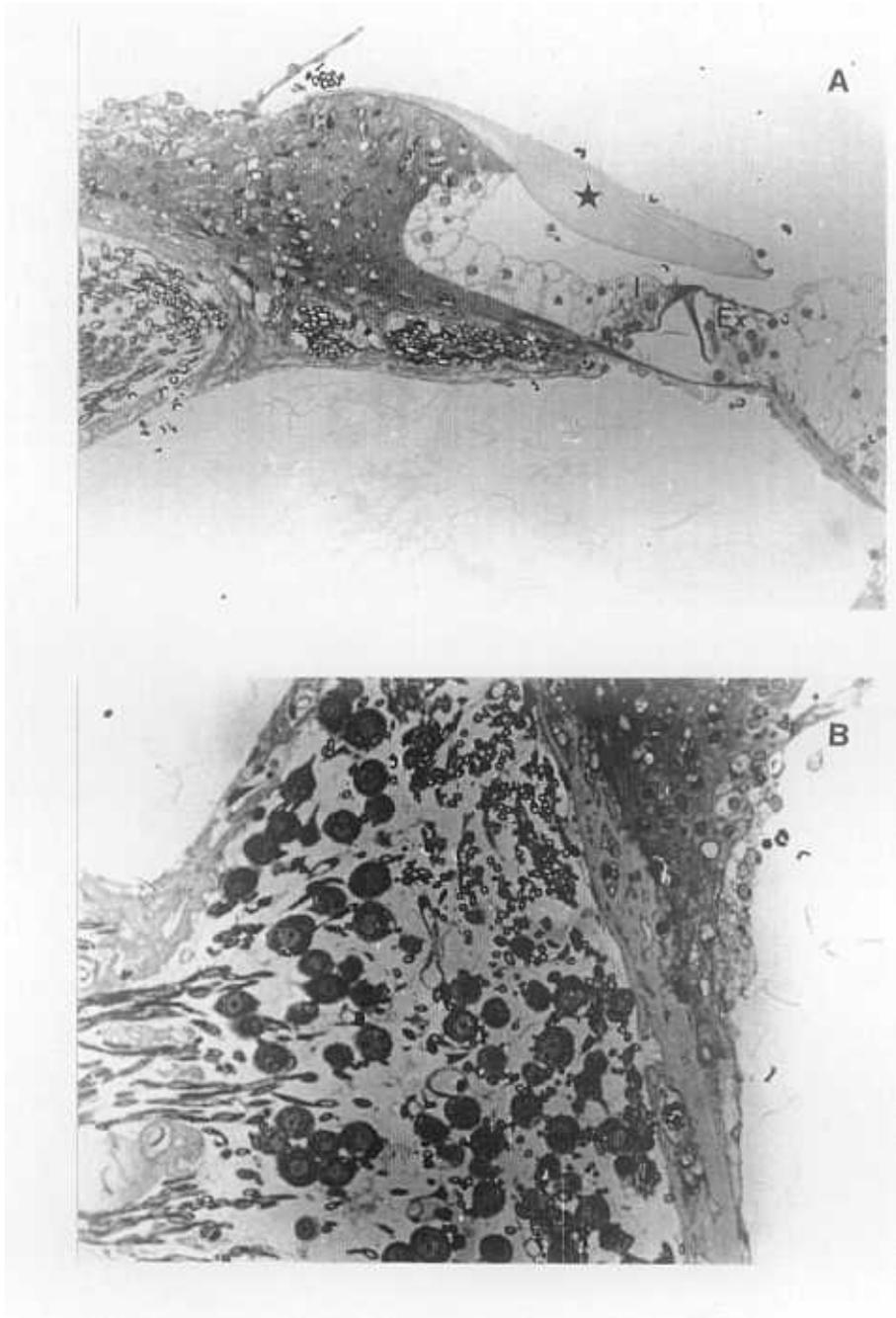


Figura 8: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (2 mg/g) del 2° día al 9° día postnatal. a) Detalle de un órgano de Corti situado en una espira media alta con pequeñas alteraciones edematosas bajo la célula ciliada interna (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex)). b) Detalle del ganglio espiral a nivel de la espira media, que muestra una disminución muy significativa de la población neuronal del ganglio. (a: Obj.20x; b: Obj.20x).

B.9. Grupo IX

En este grupo se utilizaron 2 animales hembras, que recibieron una inyección intraperitoneal de 2mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada durante 2 días consecutivos, el 6 y 7 PN. No se observaron convulsiones en la hora posterior a la administración del neurotóxico. Los animales fueron registrados electrofisiológicamente a los 71 y 72 días de vida.

Los valores de latencia no se diferenciaron de los valores control en ninguna de las frecuencias estudiadas, además presentaron una desviación standard de la media baja (tabla X y figura 28).

Los valores de amplitud resultaron más bajos a los obtenidos en los animales controles, no obstante resultaron ser estadísticamente no significativos. Tenemos que señalar que los datos de desviación standard de la media fueron menores del 50% para 16 KHz, pero superaron este porcentaje en las frecuencias de 12, 8 y 4 KHz (tabla X y figura 29).

Los umbrales de audición se incrementaron, sobre todo a la frecuencia de 16 KHz, pero no fueron estadísticamente significativos (tabla 10 y figura 30).

El estudio morfológico de las cócleas de este grupo no presentó grandes diferencias con respecto a las cócleas del grupo control, excepto en las espiras basales (Plancha 9).

TABLA X: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo IX

16KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IX				CONTROL			GRUPO IX		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
39	28	0,83	0,05	4	0,81	0,06	NS	28	60,85	29,30	4	38,43	7,76	NS
38	28	0,95	0,09	4	0,93	0,04	NS	28	55,59	27,28	4	33,88	11,07	NS
37	28	1,02	0,08	4	1,00	0,04	NS	28	42,78	19,08	4	26,43	9,92	NS
36	28	1,08	0,08	4	1,07	0,05	NS	28	31,48	14,67	4	20,13	8,51	NS
35	28	1,18	0,10	4	1,16	0,06	NS	28	12,50	6,73	4	8,25	4,21	NS
34	28	1,21	0,10	4	1,17	0,05	NS	28	8,81	4,67	4	5,41	2,80	NS
33	28	1,25	0,10	4	1,20	0,07	NS	28	5,91	3,14	4	3,26	1,54	NS
32	28	1,33	0,12	4	1,29	0,10	NS	28	3,96	2,19	4	3,09	2,49	NS
31	28	1,43	0,13	4	1,36	0,12	NS	28	2,71	1,34	4	1,71	0,71	NS
30	27	1,56	0,20	4	1,46	0,09	NS	27	1,64	1,06	4	1,20	0,30	NS
29	15	1,63	0,25	0	0,00	0,00		15	1,21	0,63	0	0,00	0,00	

12KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IX				CONTROL			GRUPO IX		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
28	28	0,79	0,05	4	0,76	0,02	NS	28	86,51	55,06	4	68,53	40,67	NS
27	28	0,80	0,05	4	0,79	0,05	NS	28	78,71	43,60	4	58,90	37,47	NS
26	28	0,91	0,08	4	0,86	0,06	NS	28	63,69	33,60	4	41,53	26,01	NS
25	28	0,94	0,09	4	0,91	0,05	NS	28	51,81	26,06	4	33,78	20,53	NS
24	28	1,01	0,07	4	1,02	0,06	NS	28	32,98	14,70	4	23,13	14,71	NS
23	28	1,07	0,08	4	1,07	0,05	NS	28	26,98	13,38	4	18,48	10,85	NS
22	28	1,13	0,09	4	1,11	0,07	NS	28	22,75	11,70	4	14,65	9,62	NS
21	28	1,18	0,08	4	1,18	0,08	NS	28	15,07	8,18	4	10,16	8,05	NS
20	28	1,26	0,09	4	1,26	0,13	NS	28	8,94	6,53	4	7,02	6,89	NS
19	28	1,32	0,10	4	1,35	0,12	NS	28	3,77	3,92	4	2,39	2,84	NS
18	17	1,38	0,13	2	1,39	0,08	NS	17	1,29	1,10	2	1,11	1,03	NS

8KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IX				CONTROL			GRUPO IX		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
17	28	0,91	0,08	4	0,89	0,04	NS	28	61,50	29,53	4	34,03	24,34	NS
16	28	1,01	0,10	4	1,02	0,05	NS	28	44,33	20,94	4	25,98	18,91	NS
15	28	1,07	0,10	4	1,07	0,05	NS	28	33,37	15,32	4	19,73	14,54	NS
14	28	1,13	0,09	4	1,12	0,06	NS	28	25,79	11,63	4	14,25	10,94	NS
13	28	1,33	0,12	4	1,34	0,06	NS	28	9,23	5,02	4	5,55	5,04	NS
12	28	1,44	0,10	4	1,44	0,08	NS	28	5,02	3,04	4	3,30	2,93	NS
11	28	1,57	0,12	4	1,55	0,08	NS	28	2,62	1,63	4	1,72	1,34	NS
10	23	1,67	0,12	2	1,66	0,08	NS	23	1,70	1,22	2	1,53	0,93	NS
9	15	1,78	0,15	1	1,80	0,00		15	0,89	0,42	1	1,25	0,00	

4KHz														
INT.	LATENCIA(ms)							AMPLITUD(uV)						
	CONTROL			GRUPO IX				CONTROL			GRUPO IX		P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X			
8	28	1,07	0,10	4	1,00	0,02	NS	28	39,33	20,10	4	23,77	18,16	NS
7	28	1,18	0,12	4	1,22	0,02	NS	28	25,83	11,37	4	14,24	12,66	NS
6	28	1,27	0,09	4	1,26	0,02	NS	28	15,17	7,45	4	8,19	6,91	NS
5	28	1,43	0,11	4	1,47	0,05	NS	28	7,92	4,36	4	4,81	4,39	NS
4	28	1,72	0,14	4	1,73	0,09	NS	28	3,09	1,89	4	2,10	1,74	NS
3	26	1,88	0,17	4	1,82	0,08	NS	26	2,09	1,55	4	1,56	1,75	NS
2	20	2,01	0,17	3	2,06	0,06	NS	20	1,37	0,95	3	0,93	0,84	NS
1	11	2,11	0,20	1	2,11	0,00		11	0,74	0,44	1	0,74	0,00	

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

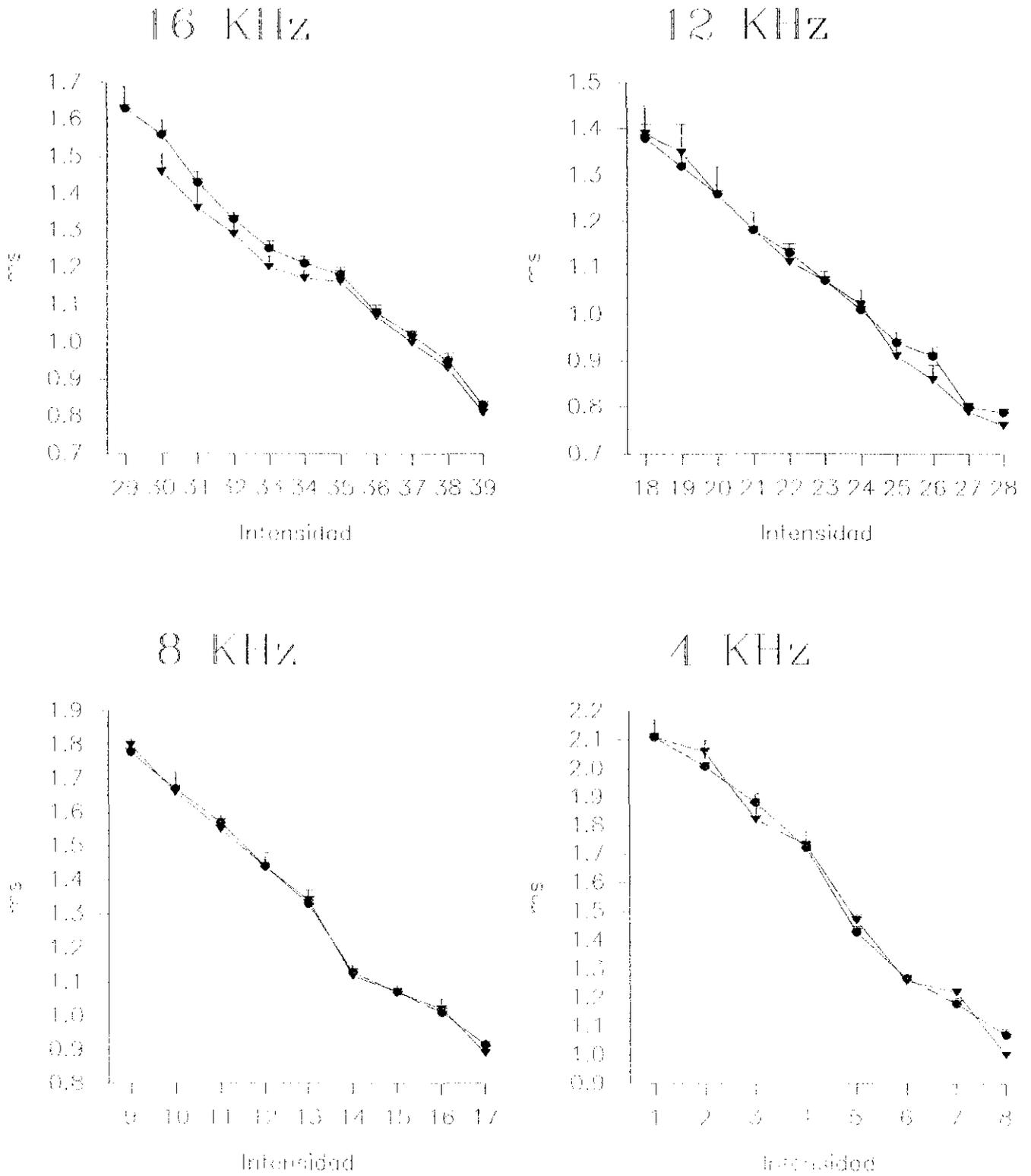
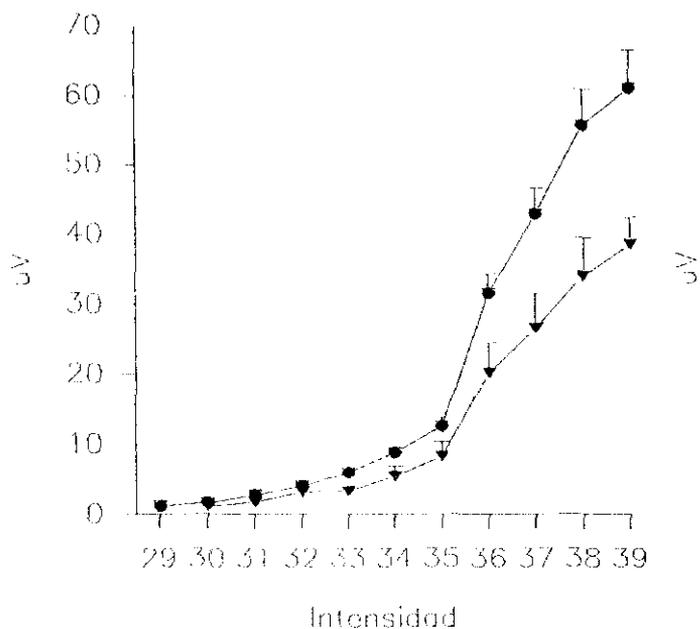
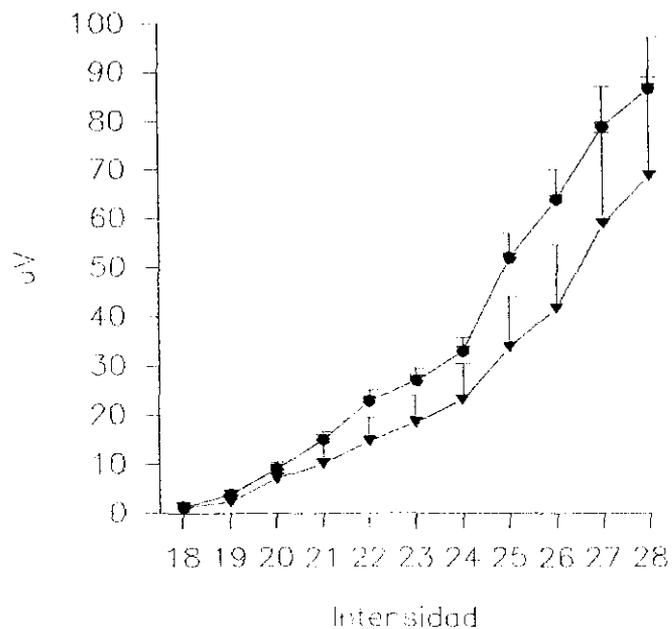


Figura 28. Talencias obtenidas en los animales controles (● , N = 28) frente a los animales tratados los días 6 y 7 PN con GMS (▼ , N = 4)

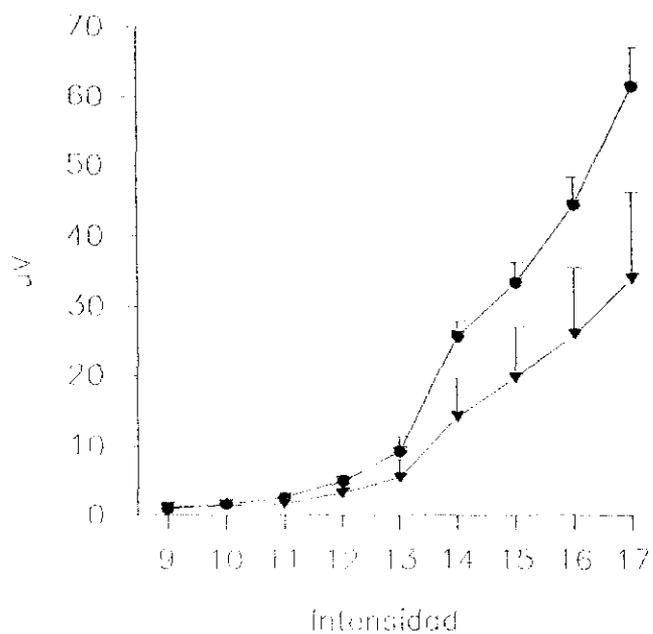
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

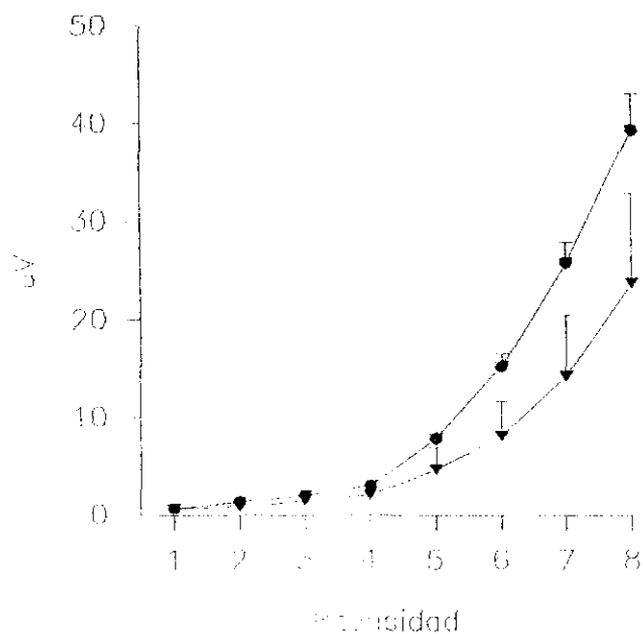


Figura 29: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados los días 6 y 7 PN con GMS (▼ , N=4)

TABLA 10: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo IX

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO IX			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	4	30,00	0,00	NS
12 KHz	28	18,39	0,50	4	18,50	0,58	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	4	10,25	0,96	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	4	2,00	0,82	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

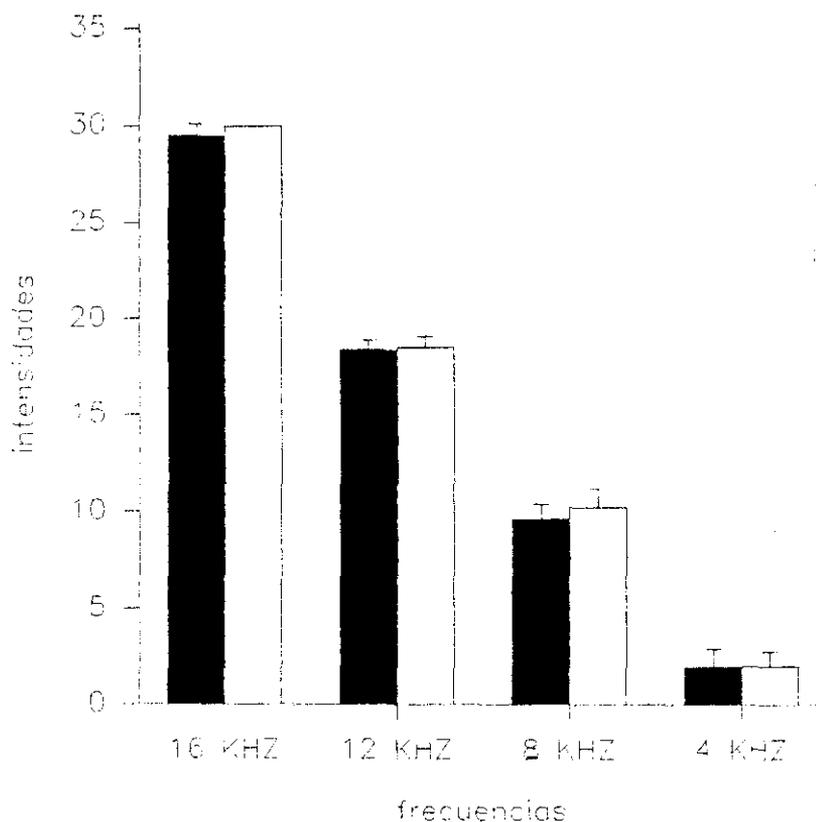


Figura 30: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo IX (□, N= 4)

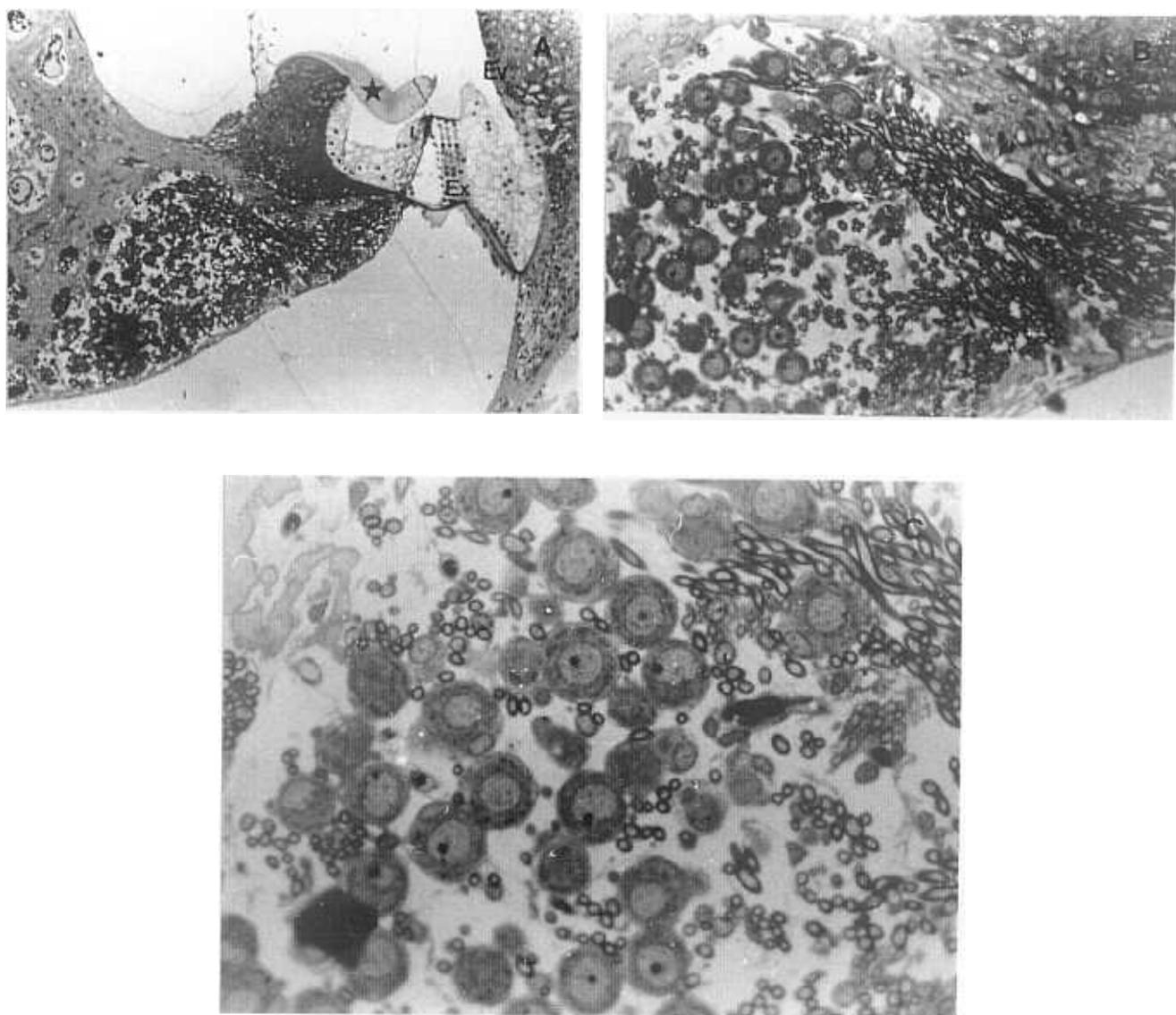


Figura 9: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (2 mg/g) el 6° día y el 7° día postnatal. a) Detalle de la rampa media en una espira basal (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex), estría vascular (Ev) y ganglio espiral (G)). b) y c) Detalles del ganglio espiral, que muestra una disminución significativa de la población neuronal del ganglio. (a: Obj.10x; b: Obj.20x; c: Obj.40x).

B.10. Grupo X

En este grupo se utilizaron 7 animales, 6 hembras y un macho, que recibieron una inyección intraperitoneal de 2mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada durante 3 días consecutivos, el 6, 7 y 8 PN. Solamente se observaron convulsiones en el animal macho durante la hora posterior a la administración del neurotóxico. Por otra parte uno de los animales hembra murió al segundo día de tratamiento, observándose pérdida de peso. Los restantes animales fueron registrados electrofisiológicamente a los 67, 70, 71, 72 y 73 (dos ratas) días de vida. Los registros obtenidos del animal que convulsionó durante el tratamiento resultaron ser muy dispares entre ambos oídos, ya que en el oído izquierdo no se pudieron obtener registros y en el oído derecho los datos de latencia y amplitud fueron muy elevados, por lo que se rechazaron para el estudio estadístico.

Los valores medios de las latencias fueron mayores a las latencias controles, aunque presentaron una desviación standard mayor a estos. En altas frecuencias (16 y 12 KHz) todos los valores de latencia resultaron ser significativamente mayores ($p < 0,001$) a los valores control. Para frecuencias medias (8 y 4 KHz) los valores de latencia a altas intensidades fueron significativamente más altos ($p < 0,001$), mientras que los valores a intensidades cercanas al umbral no fueron significativos estadísticamente con respecto a los datos control (tabla XI y figura 31).

Los valores de amplitud para este grupo fueron más bajos con respecto a los datos control y presentaron una desviación standard mucho menor al 50% obtenido en los animales control. Además, resultaron ser significativamente menores ($p < 0,001$)

para altas y medias intensidades de estimulación. No obstante, las medias no fueron estadísticamente distintas en intensidades cercanas al umbral, aunque se pudo observar una gradación según la frecuencia estimulate. Así, para 16 Khz hubo dos valores no significativo (30 y 29); para 12 Khz, dos valores (19 y 18); para 8 KHz, tres valores (11, 10 y 9); y cuatro valores (4, 3, 2 y 1) para 4 KHz (tabla XI y figura 32).

Con respecto a los valores de umbral, los datos mostraron que hubo un aumento para 16 y 12 KHz, siendo estadísticamente significativo para 16 KHz ($p < 0,001$), mientras que en las otras frecuencias los umbrales fueron menores a los valores control (tabla 11 y figura 33).

La observación microscópica de los cortes pertenecientes a las cócleas de este grupo indicó una pérdida de neuronas del ganglio espiral coclear, muy acentuada en las espiras basales (Plancha 10A, 10B y 10C).

TABLA XI: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo X

16KHz														
INT.	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO X			CONTROL			GRUPO X			P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
39	28	0,83	0,05	10	0,91	0,08	**	28	60,85	29,30	10	20,60	5,33	***
38	28	0,95	0,09	10	1,06	0,13	***	28	55,59	27,28	10	19,05	10,31	***
37	28	1,02	0,08	10	1,19	0,12	***	28	42,78	19,08	10	13,88	5,66	***
36	28	1,08	0,08	10	1,25	0,08	***	28	31,48	14,67	10	9,83	2,49	***
35	28	1,18	0,10	10	1,39	0,14	***	28	12,50	6,73	10	4,03	2,42	***
34	28	1,21	0,10	9	1,41	0,15	***	28	8,81	4,67	9	2,98	1,00	***
33	28	1,25	0,10	10	1,43	0,14	***	28	5,91	3,14	10	1,86	0,50	***
32	28	1,33	0,12	10	1,47	0,20	***	28	3,96	2,19	10	1,17	0,43	***
31	28	1,43	0,13	10	1,55	0,16	**	28	2,71	1,34	10	0,86	0,18	***
30	27	1,56	0,20	4	1,79	0,23	*	27	1,64	1,06	4	0,87	0,37	NS
29	15	1,63	0,25	0	0,00	0,00		15	1,21	0,63	0	0,00	0,00	

12KHz														
INT.	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO X			CONTROL			GRUPO X			P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
28	28	0,79	0,05	10	0,82	0,06	*	28	86,51	55,06	10	27,69	5,32	**
27	28	0,80	0,05	10	0,87	0,07	***	28	78,71	43,60	10	24,99	6,15	***
26	28	0,91	0,08	9	0,99	0,15	**	28	63,69	33,60	9	17,48	9,92	***
25	28	0,94	0,09	9	1,08	0,13	***	28	51,81	26,06	9	13,66	6,43	***
24	28	1,01	0,07	10	1,16	0,09	***	28	32,98	14,70	10	12,85	4,27	***
23	28	1,07	0,08	10	1,25	0,14	***	28	26,98	13,38	10	8,50	4,49	***
22	28	1,13	0,09	10	1,33	0,15	***	28	22,75	11,70	10	6,23	3,48	***
21	28	1,18	0,08	10	1,34	0,12	***	28	15,07	8,18	10	5,30	2,28	***
20	28	1,26	0,09	10	1,38	0,11	***	28	8,94	6,53	10	3,55	1,39	*
19	28	1,32	0,10	10	1,48	0,11	***	28	3,77	3,92	10	1,91	0,92	NS
18	17	1,38	0,13	8	1,70	0,19	***	17	1,29	1,10	8	1,03	0,89	NS

8KHz														
INT.	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO X			CONTROL			GRUPO X			P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
17	28	0,91	0,08	10	1,04	0,08	***	28	61,50	29,53	10	17,94	4,38	***
16	28	1,01	0,10	10	1,15	0,13	***	28	44,33	20,94	10	15,40	10,11	***
15	28	1,07	0,10	10	1,24	0,11	***	28	33,37	15,32	10	10,99	6,04	***
14	28	1,13	0,09	10	1,29	0,12	***	28	25,79	11,63	10	8,44	4,34	***
13	28	1,33	0,12	10	1,40	0,10	NS	28	9,23	5,02	10	5,04	3,80	*
12	28	1,44	0,10	10	1,56	0,10	**	28	5,02	3,04	10	2,50	1,10	*
11	28	1,57	0,12	10	1,65	0,11	NS	28	2,62	1,63	10	1,63	0,61	NS
10	23	1,67	0,12	10	1,78	0,12	*	23	1,70	1,22	10	1,06	0,59	NS
9	15	1,78	0,15	5	1,91	0,12	NS	15	0,89	0,42	5	0,87	0,43	NS

4KHz														
INT.	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO X			CONTROL			GRUPO X			P	
	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS	N	X	DS		
8	28	1,07	0,10	10	1,17	0,10	**	28	39,33	20,10	10	11,78	5,57	***
7	28	1,18	0,12	10	1,32	0,12	***	28	25,83	11,37	10	9,54	5,20	***
6	28	1,27	0,09	10	1,36	0,11	*	28	15,17	7,45	10	6,19	1,83	***
5	28	1,43	0,11	10	1,57	0,10	**	28	7,92	4,36	10	3,66	1,22	**
4	28	1,72	0,14	10	1,77	0,04	NS	28	3,09	1,89	10	2,11	0,86	NS
3	26	1,88	0,17	10	1,92	0,12	NS	26	2,09	1,55	10	1,31	0,60	NS
2	20	2,01	0,17	8	2,07	0,14	NS	20	1,37	0,95	8	1,36	0,82	NS
1	11	2,11	0,20	5	2,22	0,07	NS	11	0,74	0,44	5	0,81	0,28	NS

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

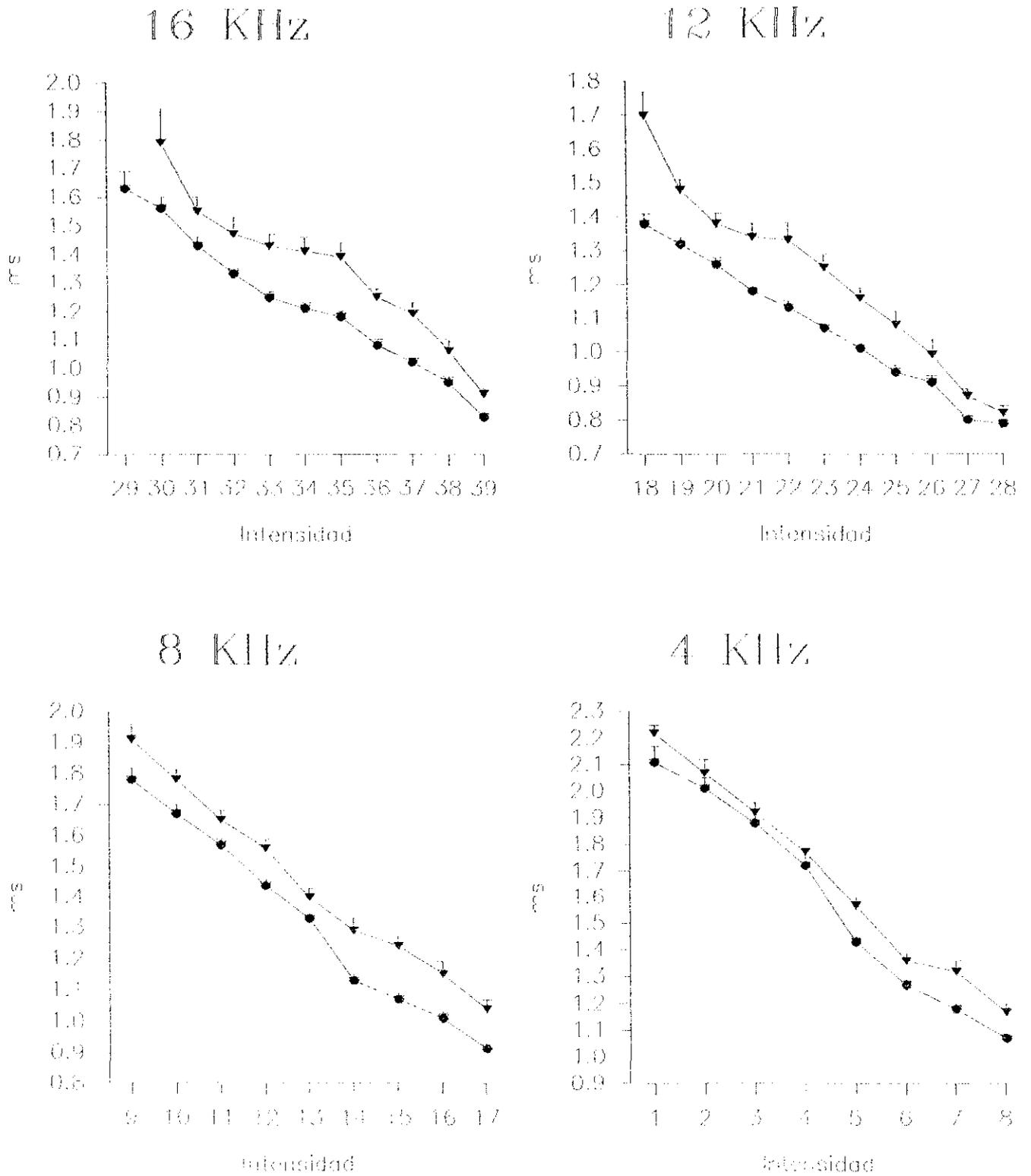
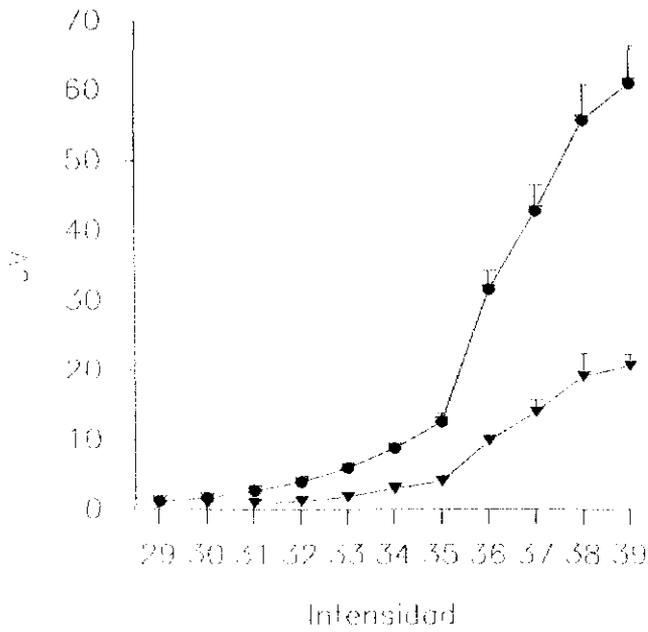
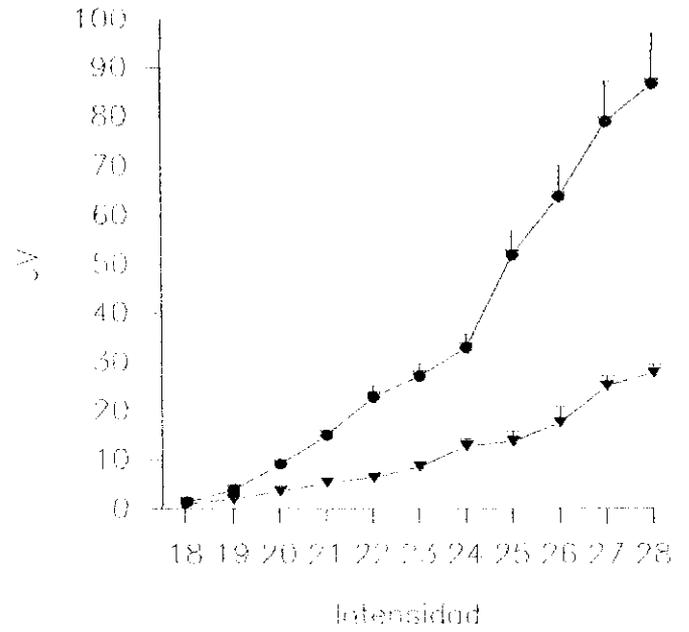


Figura 3E: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a los animales tratados los días 6, 7 y 8 PN con GMS (▼ , N=10)

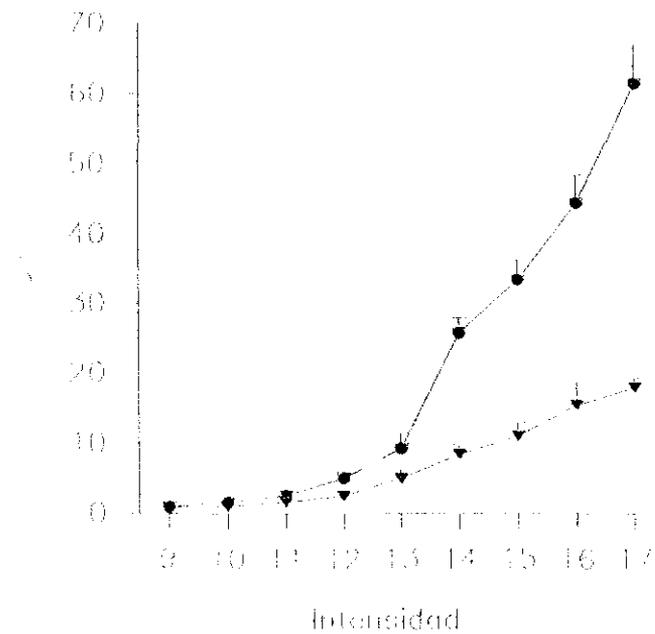
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

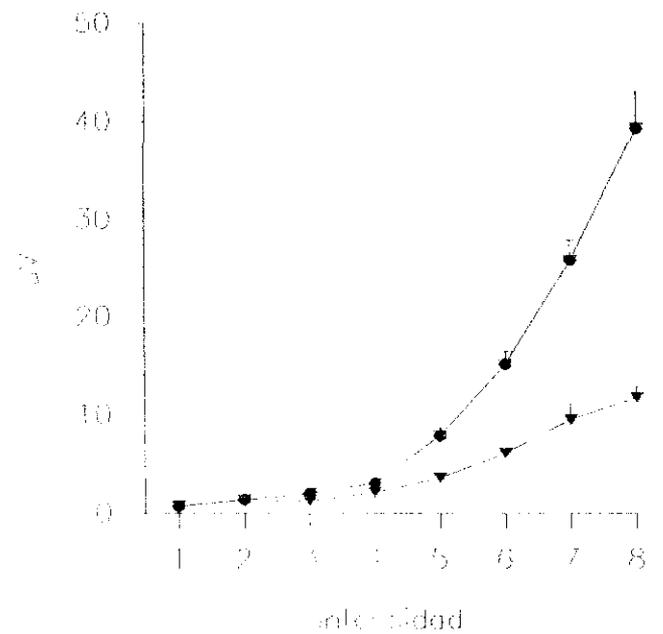


Figura 32: Amplitudes obtenidas en los animales controles (●, N=28) frente a los animales tratados los días 6, 7 y 8 PN con GMS (▼, N=10)

TABLA 11: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo X

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO X			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	10	30,60	0,52	***
12 KHz	28	18,39	0,50	10	18,20	0,42	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	10	9,50	0,53	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	10	1,70	0,82	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

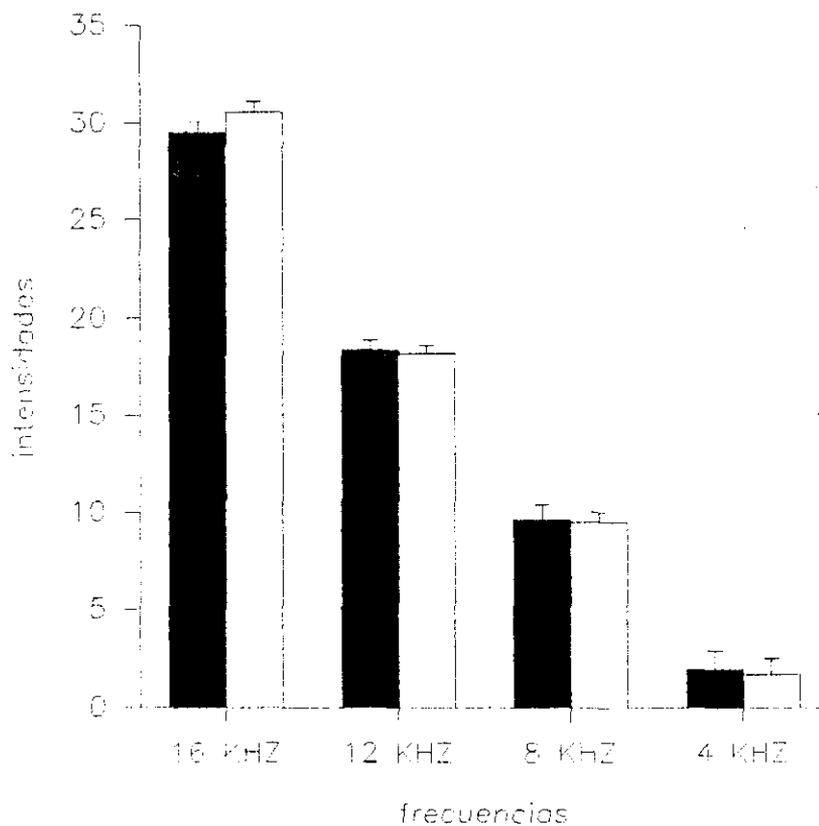


Figura 33: Umbrales (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo X (□, N= 10)

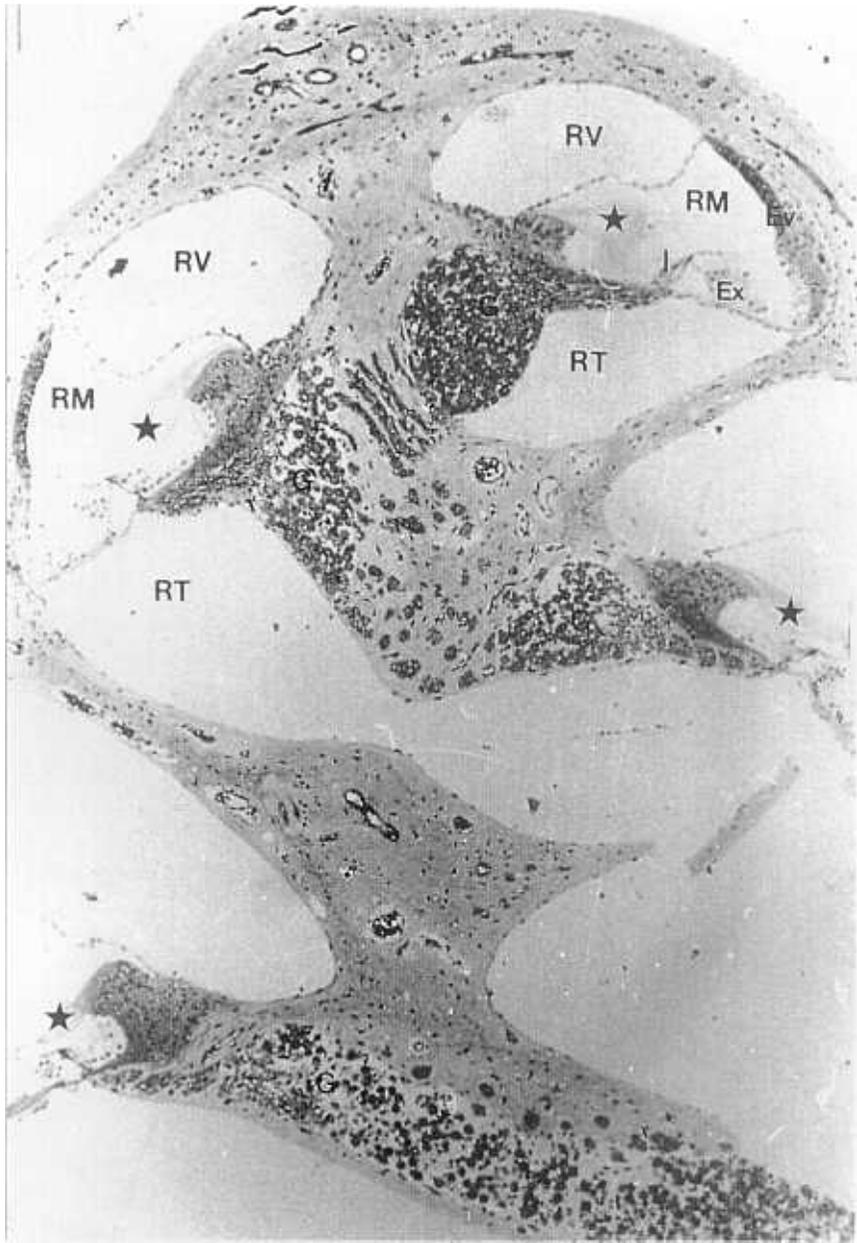


Figura 10A: Panorámica de una cóclea obtenida de un animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (2 mg/g) del 6° día al 8° día postnatal (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex), estria vascular (Ev) y ganglio espiral (G), rampa vestibular (RV), rampa media (RM), rampa timpánica (RT)). Las secciones del órgano de Corti a distintos niveles no presentan diferencias ni patologías significativas. El ganglio espiral muestra alteraciones muy importantes en la espira basal, medias a niveles medio bajo y medio alto, y muy escasas en el ápex. (Obj.5x).

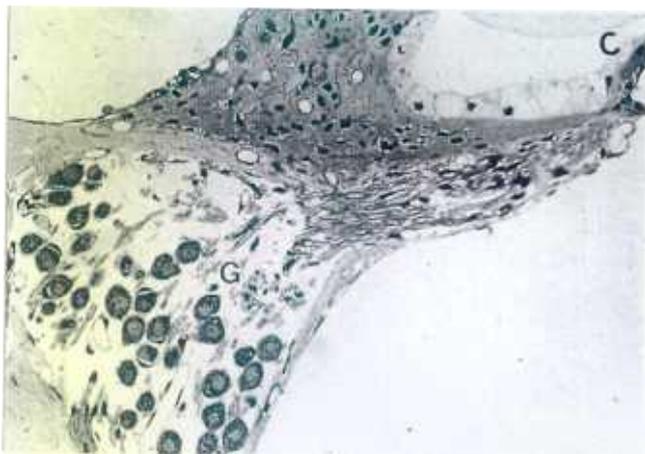
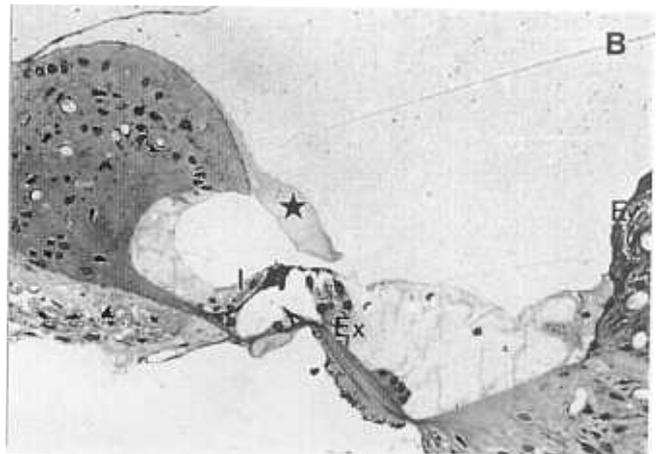
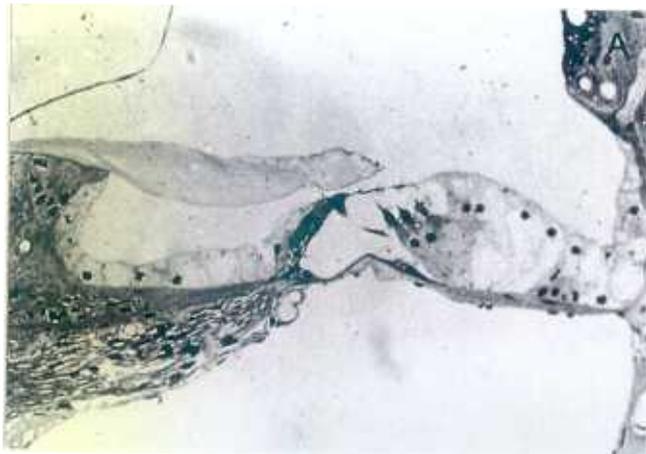


Figura 108: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (2 mg/g) del 6° día al 8° día postnatal. a) Detalle de un órgano de Corti de una espira media alta sin alteraciones significativas. b) Detalle de un órgano de Corti de una espira baja también sin alteraciones (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex), estria vascular (Ev) y ganglio espiral (G)). c) Detalle del ganglio espiral a nivel de una espira media alta con una disminución significativa de su población neuronal. d) Detalle del ganglio espiral a nivel de una espira baja, que muestra una disminución muy significativa de su población neuronal. (a: Obj.20x; b: Obj.20x; c: Obj.20x; d: Obj.20x).

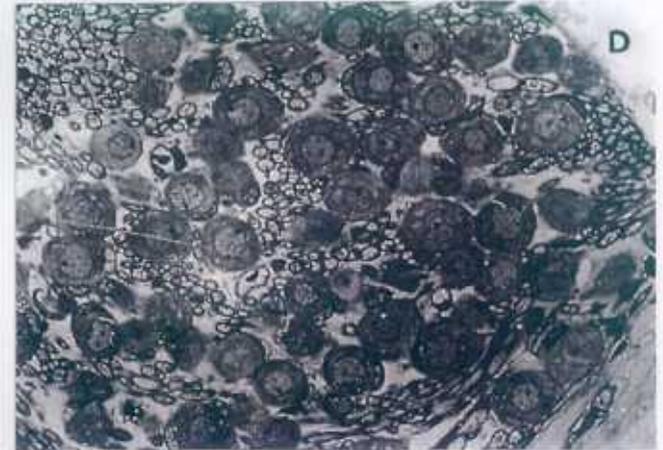
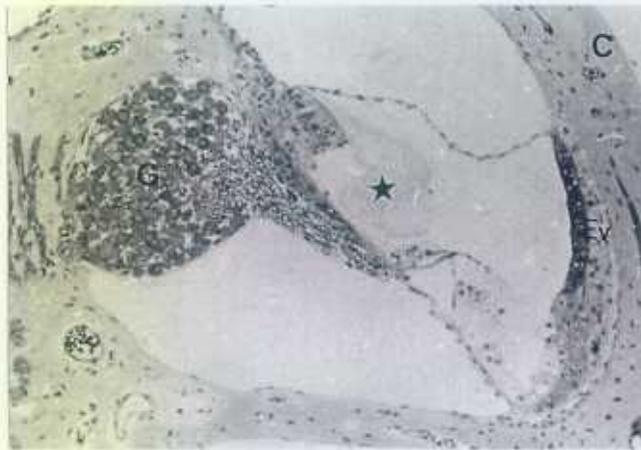
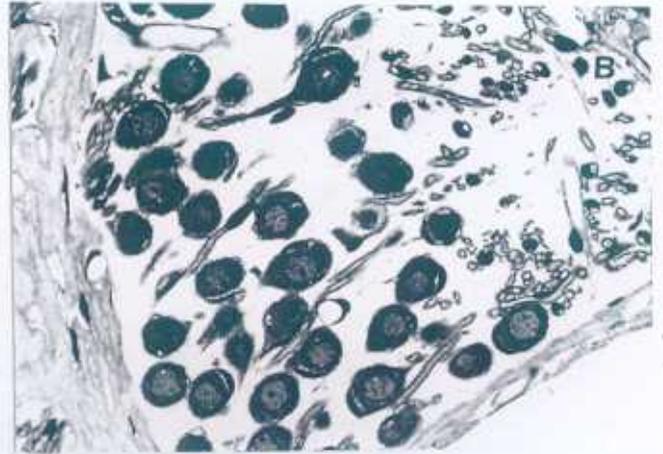


Figura 10C: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (2 mg/g) del 6° día al 8° día postnatal. a) Detalle de un órgano de Corti de una espira alta sin ningún tipo de alteraciones (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex), estría vascular (Ev) y ganglio espiral (G)). b) Detalle del ganglio espiral a ese nivel que muestra una gran reducción de la población neuronal. c) Detalle de un órgano de Corti de una espira apical sin ninguna alteración. d) Detalle del ganglio espiral, en los que se muestra una pequeña disminución de la población neuronal del ganglio. (a: Obj.20x; b: Obj.40x; c: Obj.10x; d: Obj.40x)

B.11. Grupo XI

En este grupo se utilizó un animal hembra que recibió una inyección intraperitoneal de 2mg de GMS por gramo de peso en un volumen de administración de 0,01ml de agua destilada durante tres días consecutivos, 11, 12 y 13 PN. No se observaron convulsiones en la hora posterior a la administración del neurotóxico. El animal se registró a los 32 días de vida y la estimulación fue con una gama menor de intensidades.

Los valores medios de la latencia fueron ligeramente inferiores, aunque no significativos, a los obtenidos en el grupo control. Las desviaciones standard fueron muy bajas (tabla XII y figura 34).

Los valores de amplitud fueron en general menores, aunque no significativamente distintos, a los valores control. Sólo un valor resultó ser significativamente menor al control ($p < 0,5$), la intensidad 31 en 16 KHz (tabla XII y figura 35).

Con respecto al umbral, se pudo observar un aumento que fue significativo a la frecuencia de 16 KHz ($p < 0,5$), aunque no para las demás frecuencias (tabla 12 y figura 36).

En el estudio morfológico de estas cócleas se observó pérdida neuronal en el gánlglio espiral coclear (Plancha 11).

TABLA XII: Latencias y amplitudes del grupo CONTROL y el grupo XI

16KHz														
	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO XI				CONTROL			GRUPO XI			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
39	28	0,83	0,05	2	0,78	0,00	NS	28	60,85	29,30	2	43,45	9,28	NS
38	28	0,95	0,09					28	55,59	27,28				
37	28	1,02	0,08					28	42,78	19,08				
36	28	1,08	0,08	2	1,02	0,00	NS	28	31,48	14,67	2	14,80	4,95	NS
35	28	1,18	0,10					28	12,50	6,73				
34	28	1,21	0,10					28	8,81	4,67				
33	28	1,25	0,10	2	1,13	0,00	NS	28	5,91	3,14	2	1,93	0,88	NS
32	28	1,33	0,12	2	1,19	0,03	NS	28	3,96	2,19	2	1,56	0,31	NS
31	28	1,43	0,13	2	1,23	0,03	NS	28	2,71	1,34	2	0,68	0,01	NS
30	27	1,56	0,20	1	1,33	0,00		27	1,64	1,06	1	0,50	0,00	
29	15	1,63	0,25	0	0,00	0,00		15	1,21	0,63	0	0,00	0,00	

12KHz														
	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO XI				CONTROL			GRUPO XI			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
28	28	0,79	0,05	2	0,72	0,03	NS	28	86,51	55,06	2	53,75	17,18	NS
27	28	0,80	0,05	2	0,74	0,00	NS	28	78,71	43,60	2	46,65	8,56	NS
26	28	0,91	0,08					28	63,69	33,60				
25	28	0,94	0,09					28	51,81	26,06				
24	28	1,01	0,07	2	0,98	0,00	NS	28	32,98	14,70	2	14,91	7,06	NS
23	28	1,07	0,08					28	26,98	13,38				
22	28	1,13	0,09					28	22,75	11,70				
21	28	1,18	0,08	2	1,13	0,00	NS	28	15,07	8,18	2	7,59	3,83	NS
20	28	1,26	0,09	2	1,21	0,06	NS	28	8,94	6,53	2	4,87	2,03	NS
19	28	1,32	0,10	2	1,27	0,03	NS	28	3,77	3,92	2	2,73	0,52	NS
18	17	1,38	0,13	2	1,39	0,03	NS	17	1,29	1,10	2	0,54	0,29	NS

8KHz														
	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO XI				CONTROL			GRUPO XI			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
17	28	0,91	0,08	2	0,82	0,00	NS	28	61,50	29,53	2	33,40	4,53	NS
16	28	1,01	0,10					28	44,33	20,94				
15	28	1,07	0,10					28	33,37	15,32				
14	28	1,13	0,09	2	1,08	0,02	NS	28	25,79	11,63	2	10,95	5,30	NS
13	28	1,33	0,12					28	9,23	5,02				
12	28	1,44	0,10	2	1,37	0,00	NS	28	5,02	3,04	2	3,22	2,11	NS
11	28	1,57	0,12	2	1,48	0,00	NS	28	2,62	1,63	2	2,29	1,06	NS
10	23	1,67	0,12	2	1,60	0,11	NS	23	1,70	1,22	2	1,12	1,15	NS
9	15	1,78	0,15	1	1,72	0,00		15	0,89	0,42	1	0,89	0,00	

4KHz														
	LATENCIA(ms)						AMPLITUD(uV)							
	CONTROL			GRUPO XI				CONTROL			GRUPO XI			
INT.	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	N	X	DS	P
8	28	1,07	0,10	2	0,96	0,03	NS	28	39,33	20,10	2	27,90	11,88	NS
7	28	1,18	0,12					28	25,83	11,37				
6	28	1,27	0,09	2	1,21	0,00	NS	28	15,17	7,45	2	7,36	0,91	NS
5	28	1,43	0,11	2	1,49	0,05	NS	28	7,92	4,36	2	3,34	2,39	NS
4	28	1,72	0,14	2	1,72	0,06	NS	28	3,09	1,89	2	1,67	0,98	NS
3	26	1,88	0,17	2	1,86	0,19	NS	26	2,09	1,55	2	1,39	0,75	NS
2	20	2,01	0,17	1	1,99	0,00		20	1,37	0,95	1	0,80	0,00	
1	11	2,11	0,20	1	2,07	0,00		11	0,74	0,44	1	0,74	0,00	

KHz= Kilohercios, ms= milisegundos, uV= microvoltios, N= número de oídos, X= media,

DS= desviación standard, P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

INT.= intensidad: (39) 1.8V, (38) 500mV, (37) 125mV, (36) 50mV, (35) 10mV, (34) 5mV, (33) 2.5mV, (32) 1mV, (31) 0.5mV, (30) 0.25mV, (29) 0.1mV, (28) 10V, (27) 4V, (26) 1V, (25) 490mV, (24) 100mV, (23) 50mV, (22) 25mV, (21) 12mV, (20) 6mV, (19) 3mV, (18) 1mV, (17) 1V, (16) 250mV, (15) 100mV, (14) 40mV, (13) 5mV, (12) 2.5mV, (11) 1mV, (10) 0.5mV, (9) 0.25mV, (8) 225mV, (7) 50mV, (6) 20mV, (5) 5mV, (4) 1mV, (3) 0.5mV, (2) 0.25mV, (1) 0.1mV.

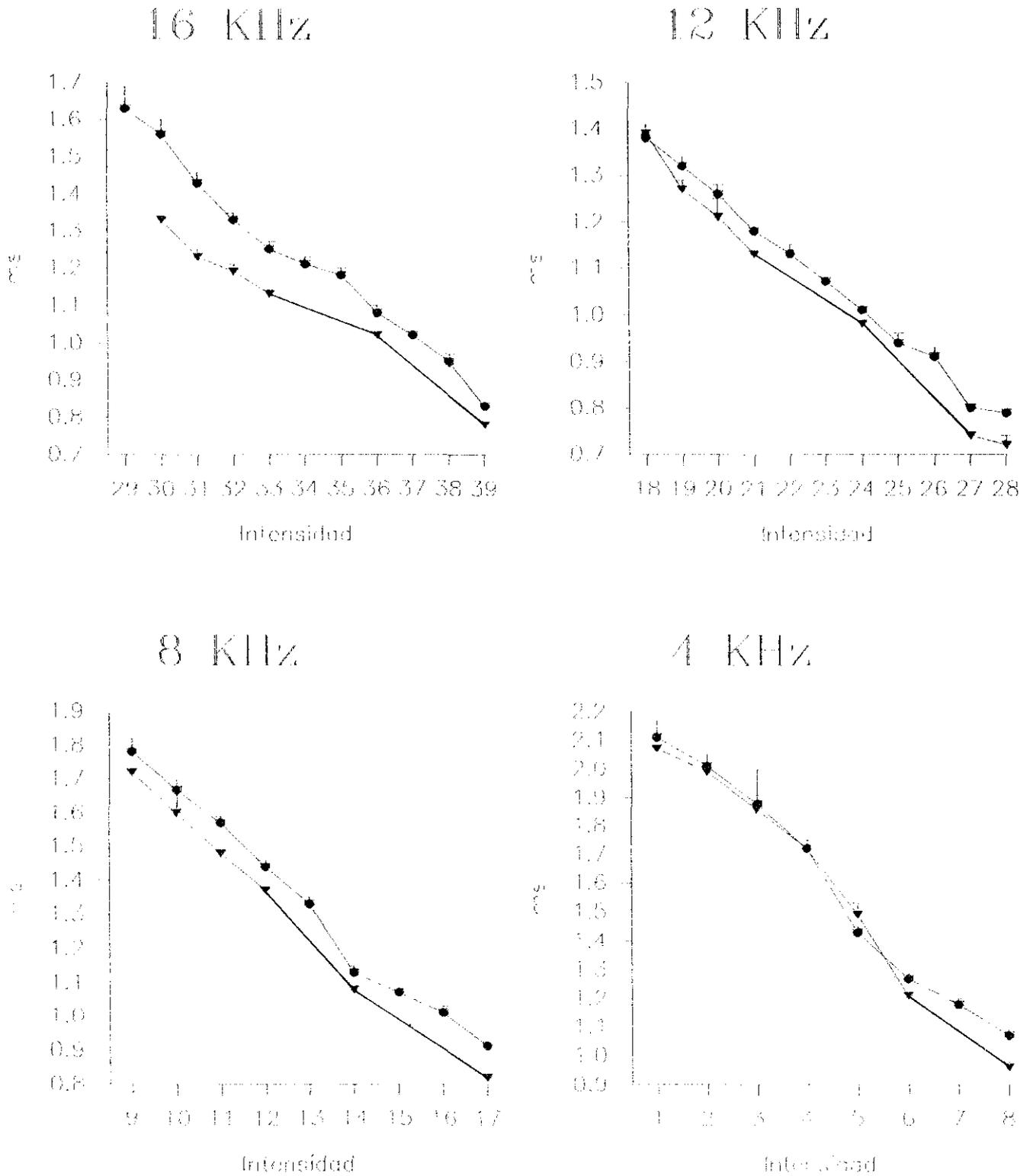
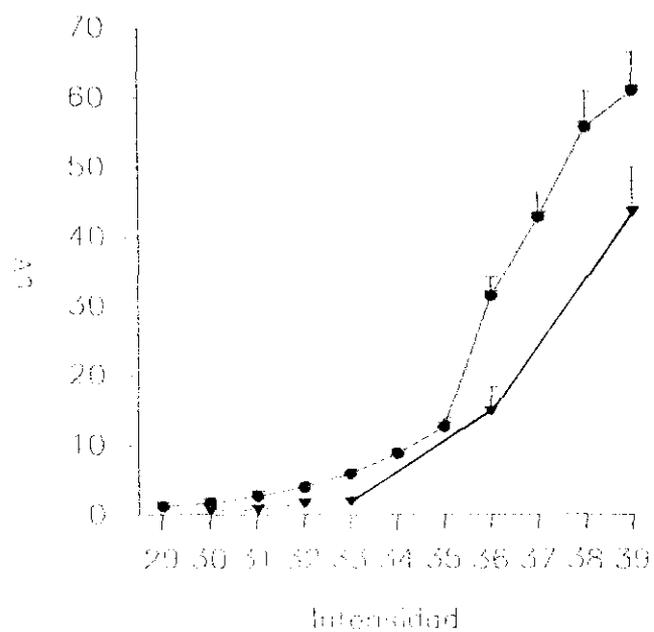
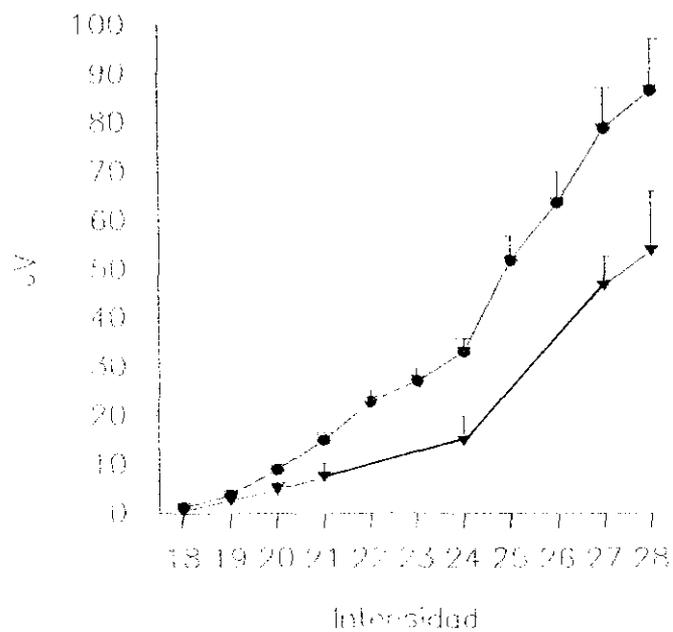


Figura 34: Latencias obtenidas en los animales controles (●, N=28) frente a los animales tratados los días 11, 12 y 13 PN con GMS (▼, N=2)

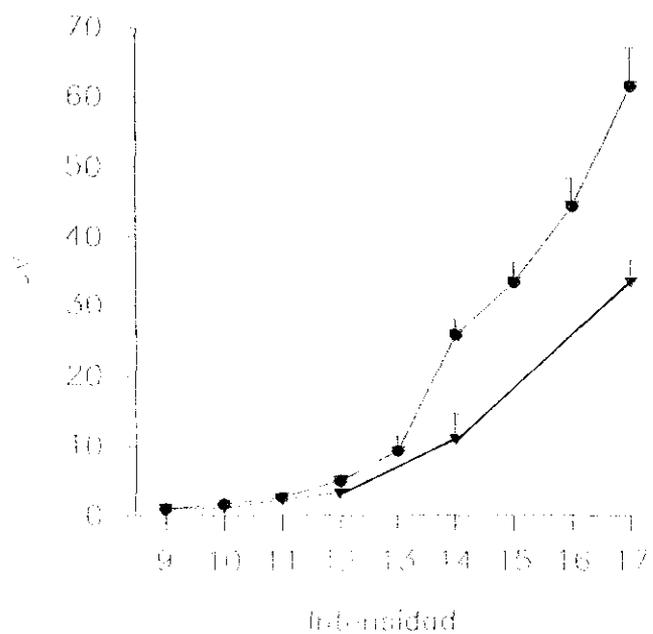
16 KHz



12 KHz



8 KHz



4 KHz

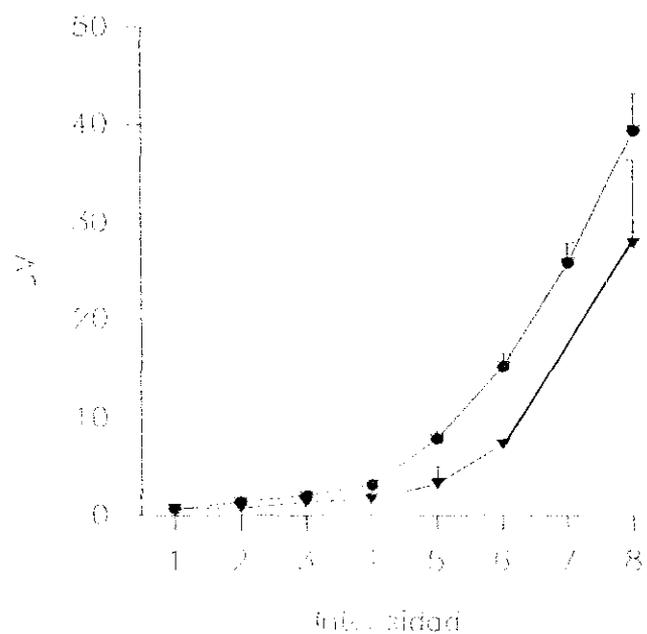


Figura 35: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N = 28) frente a los animales tratados los días 11, 12 y 13 PN con GMS (▼ , N = 2)

TABLA 12: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en el grupo CONTROL y el grupo XI

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO XI			P
	N	X	DS	N	X	DS	
16 KHz	28	29,50	0,58	2	30,50	0,71	*
12 KHz	28	18,39	0,50	2	18,00	0,00	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	2	9,50	0,71	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	2	2,00	1,41	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

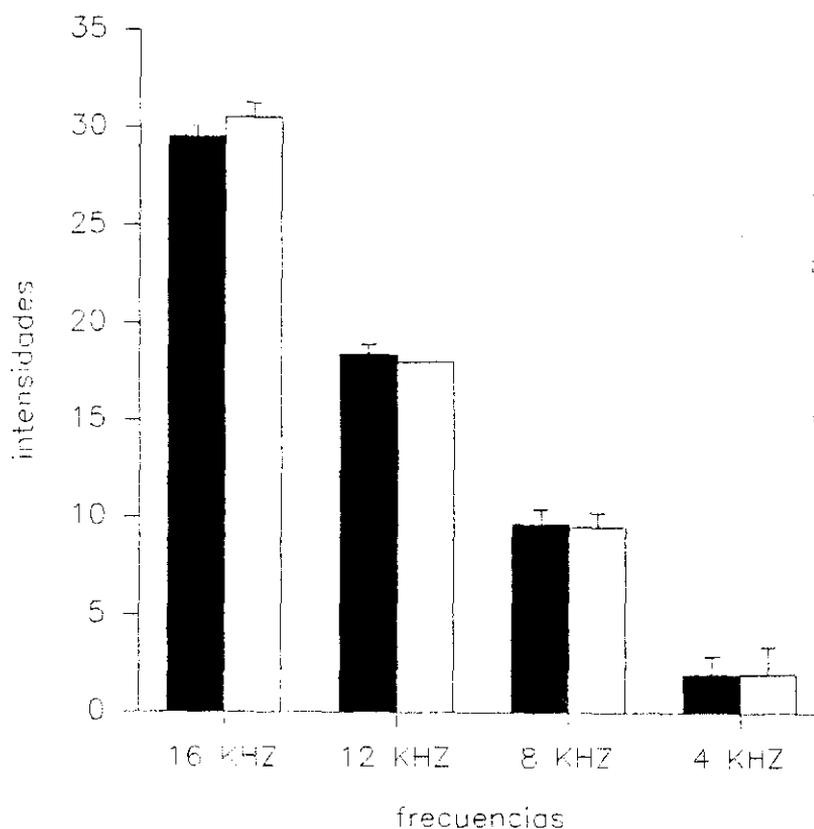


Figura 36: Umbrals (X+DS) de los grupos control (■, N= 28) y grupo XI (□, N= 2)

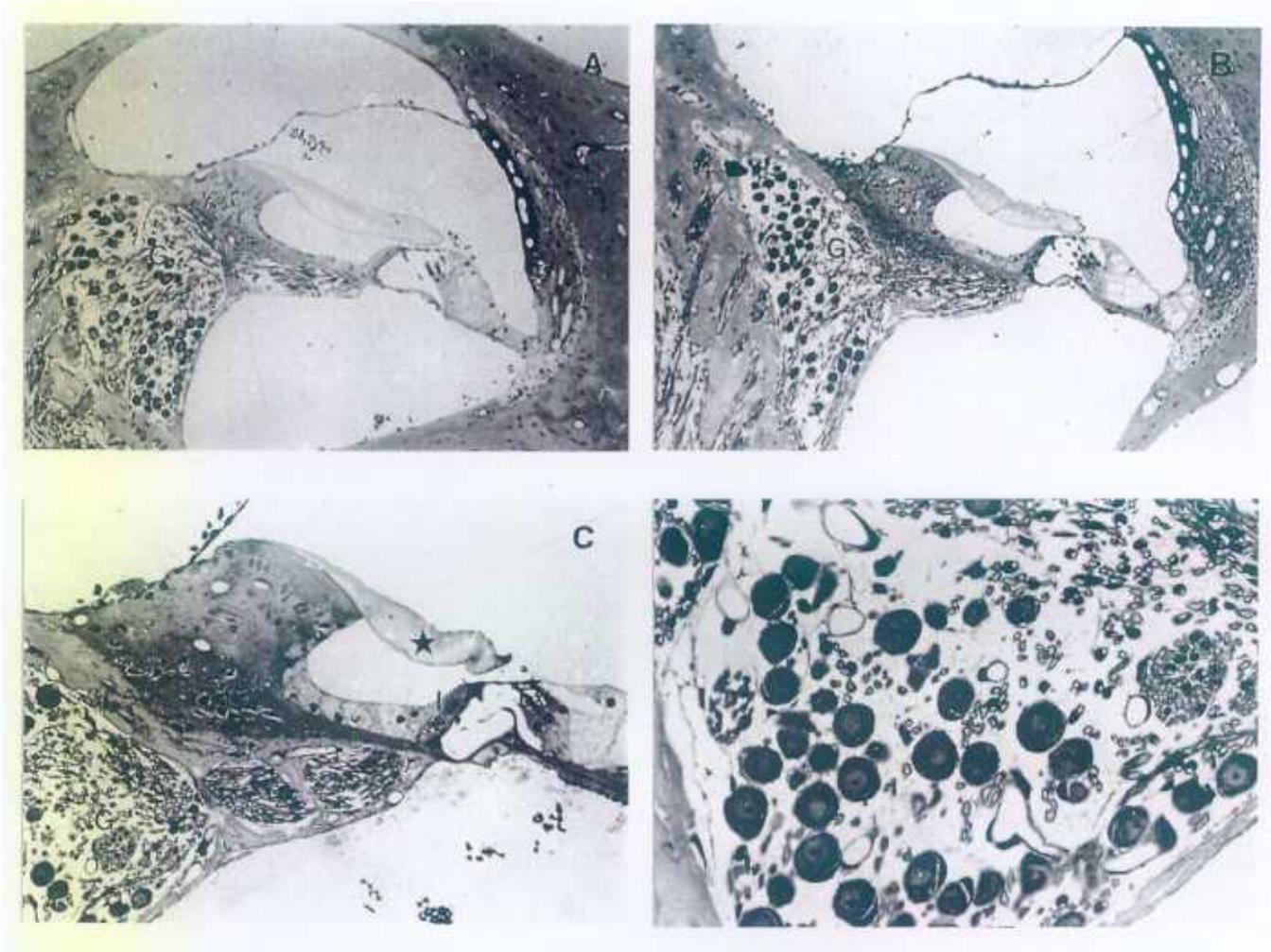


Figura 11: Animal adulto joven (30 días) tratado con glutamato monosódico (2 mg/g) del 11° día al 13° día postnatal. a) Panorámica de una espira coclear apical. b) Panorámica de una espira coclear media alta. En ambas panorámicas sólo se observan daños a nivel del ganglio espiral. c) Detalle de un órgano de Corti de una espira media (membrana tectoria (*), Célula ciliada interna (I), Células ciliadas externas (Ex), estría vascular (Ev) y ganglio espiral (G)). d) Detalle del ganglio espiral situado a nivel de una espira media, en el que se muestra una disminución significativa de la población neuronal del ganglio. (a: Obj.10x; b: Obj.10x; c: Obj.20x; d: Obj.40x).

DISCUSSION

A. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE GMS EN ANIMALES ADULTOS

A.1. Sobre la técnica utilizada

La administración de glutamato monosódico (GMS) es técnicamente complicada, ya que es necesario el uso de grandes concentraciones de esta sustancia para conseguir un efecto neurotóxico, debido a la gran efectividad de los mecanismos de protección ante el exceso de GLU que existen en el oído interno como en otras partes del Sistema Nervioso. Así, con la técnica de perfusión perilinfática, la más empleada, se han utilizado cantidades que para el GLU es de 5mM (Puel y cols., 1994) frente a 10 μ M de AMPA (Puel y cols., 1991b y 1994) o 1-5nM de AK (Juiz y cols., 1989; Pujol y cols., 1985).

Excepto el estudio morfológico de Juiz y cols. (1989) todos los demás autores que usan la administración perilinfática, se refieren a resultados de neurotoxicidad aguda, ya que los registros electrofisiológicos se llevan a cabo inmediatamente después de efectuar la instilación de perilinfa artificial conteniendo el neurotóxico. En estos experimentos se observó que si se efectúa un lavado del neurotóxico (AK, AMPA, NMDA) con perilinfa artificial se produce una recuperación total o parcial del potencial de acción compuesto del nervio VIII; sin embargo para elevadas concentraciones de AK o AMPA la abolición del PAC es total y no se produce recuperación (Puel y cols., 1994). Atendiendo a esta recuperación se hipotetizó que el decremento en la amplitud del PAC era causa directa del disparo asincrónico de las fibras del VIII par craneal debido a la presencia de sustancias que imitaban el efecto del neurotransmisor endógeno de la sinapsis entre las CCI y las dendritas de las neuronas de tipo I del ganglio espiral

coclear. Siendo nuestro objetivo el análisis de lesiones neuronales permanentes, nos decidimos por el estudio de la actividad fisiológica pasadas 24 horas después de la administración del fármaco.

Otra de las objeciones que presenta la instilación perilinfática (Juiz y cols., 1988) es la presencia de lesiones en el haz espiral interno producidas por mecanismos de descompresión de la ventana redonda debidas a la perforación de la lámina de los contornos en la técnica quirúrgica utilizada. No se puede descartar, sin embargo, que estas lesiones se produzcan a través de un mecanismo excitotóxico indirecto que implique la liberación del neurotransmisor endógeno. Así, el desequilibrio osmótico en la perilinfa y la endolinfa, producido por la perfusión de perilinfa artificial, podría provocar la liberación de GLU endógeno, de la misma manera que la perfusión de perilinfa con alto contenido en K^+ provoca un aumento de GLU perilinfático (Jenison y cols., 1985), que podría ser el responsable de las lesiones encontradas. Aunque estas lesiones por manipulación son transitorias, ya que se ha demostrado su ausencia en estudios a largo plazo (Juiz y cols., 1988 y 1989), nosotros nos decidimos por la administración intraperitoneal donde estos problemas no están presentes.

Cuando la administración se realiza por vía intraperitoneal, la concentración de GLU debe alcanzar unos niveles en sangre que permitan la llegada de cantidad suficiente al sistema nervioso que desborden los mecanismos de control de la barrera hematoencefálica y de aclaramiento por parte de neuronas y glía, permitiendo, por tanto, que se originen fenómenos de neurotoxicidad. Se ha comprobado, en ratones, que es necesaria una concentración de 750mM de GLU en

plasma, frente a la concentración normal de 112mM para alcanzar fenómenos de excitotoxicidad (Meldrum, 1993). En este sentido, se necesitan de 3 a 9 gramos de GMS por kilo de peso para poder lesionar el área postrema en ratas de 12 semanas (Phelix y Hartle, 1990) y 5 gramos por kilo de peso para producir fenómenos convulsivos en ratas de 60 días (Beas-Zarate y cols., 1989). Por otra parte y como comparación, son necesarias dosis de 5 a 10 mg de AK por kilo de peso para producir excitotoxicidad por vía intraperitoneal (Gil-Loyzaga y cols., 1993b; Hernández-Martínez, 1993; Holmes y Thompson, 1988).

En nuestros estudios preliminares pudimos observar por una parte, que con dosis iguales o superiores a 5 gramos por kilo la mortalidad era muy elevada 24 horas después del tratamiento y por otra parte que con dosis de 4 gramos de GMS por kilo de peso disminuía la mortalidad pero los resultados fisiológicos obtenidos eran muy cercanos a los obtenidos en animales controles. Debido a estas observaciones nos decidimos por un protocolo de trabajo que consistía en cuatro administraciones repetitivas de 4 gramos de GMS por kilo de peso durante cuatro días consecutivos y efectuar el análisis tanto fisiológico como morfológico el quinto día después de iniciado el tratamiento.

A.2. Sobre los resultados obtenidos

Los resultados fisiológicos obtenidos en los animales así tratados se pueden resumir en: mantenimiento de la latencia y disminución de la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio coclear, y, además, un ligero aumento del umbral de audición, sobre todo para altas frecuencias (tablas II y 2; figuras 4, 5 y 6).

Se postula que la latencia de la onda N1 del potencial de acción compuesto podría representar el disparo de las fibras más sensibles al estímulo acústico, es decir aquellas que presentan una mayor frecuencia de descarga espontánea y que conducen información sobre el inicio del estímulo. Por otra parte la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio coclear, que representaría la descarga sincrónica de las fibras de alta y baja frecuencia de descarga, aportaría información sobre la intensidad del estímulo. Por último, el otro parámetro que define cualquier sonido, es decir, la frecuencia, vendría dada por la disposición tonotópica de las fibras.

Teniendo en cuenta estos postulados previos, el hecho de que la latencia de la onda N1 se mantenga en los límites normales podría interpretarse como que la administración reiterativa de GMS no afecta de manera significativa al subgrupo de fibras de alta frecuencia de descarga espontánea. Sin embargo, la desviación estandar de los datos obtenidos de latencia en el grupo I es muy superior a los valores control en conjunto, sobre todo en las frecuencias agudas de 16 y 12 KHz. Esta observación unida a que los valores medios de estas dos altas frecuencias resultaron ser mayores a los controles aunque no significativos, nos indica una tendencia al aumento de la latencia de la onda N1 obtenida en los animales tratados; de hecho aparecen dos valores estadísticamente significativos en las intensidades 1,8V de 16 KHz y 4V de 12 KHz (ver intensidades 39 y 27 en tabla II y figura 4).

Con respecto al estudio de la amplitud del potencial de acción compuesto, que representaría la intensidad del estímulo, se pudo observar una clara disminución en los animales tratados con respecto a los animales control. Al comparar las

desviaciones estándar de la media pudimos observar que se mantenían en un rango del 50%, al igual que las obtenidas en los animales control. El descenso en la amplitud fue estadísticamente significativo para altas y medias intensidades de estimulación en todas las frecuencias, no obstante, para intensidades cercanas al umbral de audición se pudo observar que la significación estadística disminuía siguiendo una cierta gradación respecto a las frecuencias. Así, para 16 KHz hubo dos valores no significativos, para 12 KHz tres valores, 5 valores para 8 KHz y 4 intensidades no significativas para 4 KHz (tabla II y figura 5). Este conjunto de datos nos indican que el tratamiento con GMS indujo lesiones en las fibras del nervio coclear que fueron más graves en las espiras basales, donde se localizarían las frecuencias de 16 y 12 KHz, que en las espiras medias, lugar en el que se procesa la información para las frecuencias de 8 y 4 KHz.

En la tabla 2 y figura 6 aparecen los valores medios de los umbrales para las cuatro frecuencias estudiadas, se puede observar un aumento de los umbrales en todas las frecuencias y además que este aumento es estadísticamente significativo en la frecuencia de 16 KHz. Este dato corrobora la anterior observación de una lesión más intensa en espiras basales de la cóclea.

La observación microscópica de los cortes procedentes de las cócleas de aquellos animales tratados que presentaron una mayor latencia y menor amplitud, así como un umbral de audición mayor, mostró un efecto tóxico a nivel de las fibras aferentes del plexo espiral interno, más intenso en las espiras basales. En otras cócleas del mismo grupo, pero de los animales en los que el análisis fisiológico se diferenció en menor medida a los

datos control, se observaron lesiones de grado menor. El resto de las estructuras del órgano de Corti (células ciliadas, sistemas eferentes y fibras aferentes de tipo II, células de soporte, etc.) no presentaron alteraciones con respecto a los cortes control. El daño tóxico se caracterizó por una vacuolización de la zona terminal de las dendritas de las neuronas ganglionares de tipo I que proyectan bajo las CCIs. Se pudo observar que estas vacuolizaciones presentaban una distribución zonal bajo las CCIs dependiendo de la intensidad del daño neurotóxico. Así, en aquellas cócleas que mostraron menor afectación solamente se pudieron observar vacuolizaciones en la región modiolar (más interna) del haz espiral interno, mientras que en las cócleas que presentaron mayor daño, las vacuolizaciones se extendieron hacia la región de los pilares internos (área externa y colindante con las células de los pilares internos).

A.3. La hipótesis glutamatérgica

Tanto los datos electrofisiológicos como los morfológicos comentados más arriba coinciden en lo fundamental con los resultados presentados por otros autores que utilizando diversos antagonistas del ácido glutámico (AK, AMPA, QUIS e IBO) y con otras técnicas de administración (perfusión perilinfática o inyección iontoforética). Estos datos abogan por un papel del GLU como neurotransmisor aferente en la sinapsis entre las CCIs y las dendritas de las neuronas tipo I que presentarían receptores para el GLU. Una activación masiva y reiterada de estos receptores provocaría una depolarización continua de la fibra aferente que daría lugar a la entrada masiva de iones Na^+ acompañados por iones Cl^- y a la creación

de un desequilibrio osmótico, lo que conlleva una entrada de agua y produce la vacuolización y ruptura de los terminales nerviosos. Este proceso, según la hipótesis excitotóxica vendría continuado por una entrada de iones Ca^{2+} que provocaría cambios en el metabolismo celular y concluiría con la muerte neuronal.

De esta forma, los resultados obtenidos mediante registro unitario de las fibras del VIII par craneal demuestran que se produce un incremento en la frecuencia de descarga espontánea, seguido por un aumento del período de silencio postdescarga tras la perfusión perilinfática de GLU, o alguno de sus agonistas (Bobbin, 1979; Comis y Leng, 1979). Por lo tanto, este comportamiento unitario repercutiría en el potencial de acción compuesto del nervio coclear de forma que disminuiría su amplitud debido a la desincronización del disparo unitario (Bobbin y Thompson, 1978; Comis y Leng, 1979; Jenison y cols., 1986; Klinke y Oertel, 1977). Además, tras la instilación iontoforética de GLU, AK, NMDA o QUI en el área subsináptica de las CCIs (Ehrenberger y Felix, 1991; Felix y Ehrenberger, 1990) se obtiene un aumento de la descarga espontánea de las fibras aferentes, que es bloqueado por la instilación de antagonistas de los receptores de GLU (AP7 o GDEE).

Sin embargo, la presencia de los distintos subtipos de receptores de GLU en la cóclea se ha estudiado principalmente con la administración de los agonistas y antagonistas disponibles a la perilinfa y el subsiguiente registro electrofisiológico del PAC.

Así, se ha puesto en evidencia la presencia de receptores no-NMDA que responden a la acción del AK (Kusakari y cols., 1984; Jenison y cols., 1986), del QUI (Jenison y cols., 1986) y

del AMPA (Puel y cols., 1991b). También se ha evidenciado la presencia de estos receptores al utilizar antagonistas de los receptores de GLU como el kinurenato (Puel y cols., 1988 y 1989b), CNQX y DNQX (Litman y cols., 1989, Puel y cols., 1991b).

Los datos sobre la presencia de los receptores NMDA no fueron positivos hasta los estudios de Puel y cols. (1991a) que pusieron de manifiesto la reducción de la amplitud del PAC a altas intensidades de estimulación cuando la cóclea era perfundida con NMDA o con un antagonista específico de los receptores NMDA, el AP5. Estos autores concluyen que es necesaria una despolarización previa para que puedan ser activados los receptores NMDA presentes en las dendritas de las células ganglionares de tipo I.

Con respecto al estudio de la latencia de la onda N1 del PAC siempre se ha observado un aumento de este parámetro, aunque no siempre significativo, cuando se perfundía la cóclea con los agonistas del GLU como el AK (Kusakari y cols., 1984); AMPA (Puel y cols., 1991b) y NMDA (Puel y cols., 1991a).

Los datos morfológicos obtenidos tras la perfusión perilinfática de AK, AMPA, QUI, IBO y GLU y un corto período de supervivencia (5 minutos a 24 horas) evidencian una vacuolización de las fibras aferentes del haz espiral coclear. Además, con la administración intraperitoneal de AK se obtienen los mismos resultados morfológicos (Hernández-Martínez, 1993). La lesión producida es más extensa cuando se utilizan AK (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Gil-Loyzaga y cols., 1993b) o AMPA (Juiz y cols., 1989; Puel y cols., 1991b y 1994; Pujol y cols., 1985) que cuando se usan QUI, IBO o GLU (Hernández-Ortíz, 1992).

De esta forma, los datos obtenidos en el presente estudio se vienen a sumar al conjunto de resultados, tanto electrofisiológicos como morfológicos que apuntan a la actuación del GLU como principal neurotransmisor excitador coclear y por lo tanto, a la presencia de diversos tipos de receptores para GLU en las dendritas de las neuronas de tipo I del ganglio espiral coclear.

Así, el dato de la disminución de la amplitud del PAC junto a la observación microscópica de lesiones bajo las CCI's nos indican la presencia en las fibras tipo I de receptores sensibles a la acción del GLU. Además, esta disminución del PAC es, muy probablemente, debida a la destrucción de fibras tipo I y no a la desincronización en el disparo de estas mismas fibras.

Con respecto a la latencia de la onda N1 del PAC, su ligero incremento nos induce a pensar en la existencia de subpoblaciones de fibras tipo I. Estas subpoblaciones con diferentes características morfológicas y fisiológicas, ya han sido descritas en otro animal de experimentación, concretamente en el gato (Liberman, 1980 y 1982a y b; Liberman y Oliver, 1984). Estos autores diferencian al menos dos subpoblaciones de fibras aferentes tipo I según su comportamiento electrofisiológico, una de ellas con baja-media frecuencia de descarga espontánea frente a otra subpoblación con alta frecuencia de descarga espontánea. Además se apoyan en diferencias tanto morfológicas, las fibras pertenecientes a la subpoblación de alta frecuencia de descarga son más gruesas y tienen mayor número de mitocondrias, como en una distinta segregación bajo las CCI's, ocupando la mayor parte de las fibras de alta frecuencia de descarga la zona de los pilares

internos frente a la zona modiolar que está ocupada mayormente por las fibras de media-baja frecuencia de descarga. Esta hipótesis de distintas subpoblaciones de neuronas tipo I ha obtenido recientemente otro dato a favor (Leake y cols., 1993) a partir de lesiones localizadas en áreas tonotópicamente precisas del núcleo coclear ventral. Estos autores concluyen la existencia de una segregación de las neuronas tipo I en el eje ramba vestibular-ramba timpánica del ganglio espiral coclear, estando un gran porcentaje de las neuronas de alta frecuencia de descarga espontánea situadas en el área de la ramba vestibular y un gran porcentaje de las neuronas de baja-media frecuencia de descarga en el área de la ramba timpánica.

Por lo tanto, y basándonos en esta hipótesis, todavía no muy clarificada, y en la observación de que la mayoría de las lesiones están restringidas a la zona modiolar bajo las CCI's podemos concluir que la escasa afectación de la latencia de la onda N1 del PAC se debe a un diferente comportamiento ante el neurotóxico de estas dos subpoblaciones de fibras tipo I. De esta forma la subpoblación de alta frecuencia de descarga, situada en la región de los pilares, que originaría la información sobre el inicio del estímulo, y por lo tanto la latencia de la onda N1, presenta una distribución de receptores de GLU distinta a la presentada por la otra subpoblación de fibras tipo I que sería la más dañada por el efecto neurotóxico. Esta última subpoblación presentaría un mayor número de receptores NMDA y por tanto sería más sensible a la acción neurotóxica del GLU.

A.4. Efectos clínicos

La administración intraperitoneal reiterativa de GMS en animales adultos produjo la observación de crisis convulsivas y muerte en 5 animales. En el resto de los animales no podemos descartar la aparición de convulsiones puesto que la observación de los animales se llevó a cabo durante una hora después de la administración del fármaco.

Los fenómenos epilépticos se han relacionado con la liberación anómala de AAE, de hecho el AK cuando se administra por vía intracerebral o sistémica produce convulsiones (Ben-Ari, 1985). Por este motivo la administración de AK se ha propuesto como modelo de las diferentes formas de epilepsia (Nadler y cols., 1981). Más recientemente, la actividad convulsiva estuvo presente como marcador de neurotoxicidad cuando se aplicaban diferentes análogos glutamatérgicos en el tronco cerebral de ratas (Winn y cols., 1991) y existe un modelo de convulsiones en ratas mediante la aplicación intraperitoneal de GMS (Beas-Zarate y cols., 1989). Por lo tanto podemos hipotetizar que el mismo mecanismo neurotóxico que produjo las crisis convulsivas y la muerte en nuestras ratas adultas puede estar implicado en el daño aparecido en las fibras tipo I bajo las CCIs, observados en los animales que sobrevivieron al tratamiento, posiblemente a través del efecto directo sobre sus receptores.

A.5. Comparación del modelo con patologías relacionadas

Los efectos de una serie de patologías cocleares como la hipoxia-isquemia, trauma acústico y presbiacusia se han relacionado con los fenómenos neurotóxicos observados con la administración de agonistas del GLU (Puel y cols., 1994; Pujol

y cols., 1991 y 1993). De la misma forma, en el sistema nervioso central, otros muchos trabajos apoyan un mecanismo excitotóxico como mediador del daño isquémico. Así, Benveniste y cols. (1984) demostraron un elevación significativa de los niveles extracelulares de GLU después de 30 minutos de anoxia/isquemia. Además, existen tanto modelos de oclusión vascular (Drejer y cols., 1985; Gill y cols., 1987) como situaciones de presión intracraneal elevada (Duhaime y Ross, 1990) que apoyan esta hipótesis.

En condiciones normales el sistema encargado de la recaptación de GLU previene el acúmulo extracelular excesivo de AAE. Sin embargo, algunas situaciones patológicas, tales como crisis epilépticas o la anoxia/isquemia, producida por diferentes mecanismos, pueden producir el fallo de estos sistemas de recaptación de las neuronas y de los astrocitos, provocando un déficit energético que alteraría el sistema de recaptación activo del GLU, dependiente de energía. Este GLU es liberado de la reserva intraneuronal de neurotransmisor, y no desde las células gliales, como lo demuestra el que la liberación de GLU neuronal es Ca^{2+} dependiente, mientras que la liberación de GLU de los astrocitos es K^+ dependiente y Ca^{2+} independiente y no se modifica por la isquemia (Drejer y cols., 1985). La liberación de GLU inducida por isquemia en secciones de hipocampo está completamente abolida cuando se perfunde con medios sin Ca^{2+} conteniendo Co^{2+} (Benveniste y cols., 1984). También se previene la muerte celular de neuronas maduras en cultivo por medio de la adición de iones de Mg^{2+} los cuales, igual que el Co^{2+} , disminuyen la liberación sináptica del neurotransmisor.

El aumento en la concentración extracelular de K^+ produce liberación de GLU por medio de dos mecanismos diferentes: primero, el K^+ extracelular aumentado como consecuencia de la isquemia, produce despolarización y activación neuronal y por tanto liberación vesicular de GLU (Drejer y cols., 1985), en segundo lugar, se produce la disminución directa de la recaptación de membrana del GLU, lo cual aumentará el GLU extracelular, que a su vez producirá la liberación de ácido araquidónico, que también inhibe la recaptación. La suma de estos factores produce una despolarización prolongada que tendrá como consecuencia un desequilibrio osmótico, se liberará más K^+ cerrándose un ciclo con retroalimentación positiva. Como consecuencia de este desequilibrio iónico se produce la entrada de agua en el elemento postsináptico con el consiguiente edema de dendritas y soma neuronal (Olney y cols., 1986; Rothman, 1985). Cuando las neuronas están expuestas a concentraciones altas de GLU durante más de cinco minutos mueren (Choi, 1987). Parece que esta neurotoxicidad aguda del GLU es dependiente de Cl^- mientras que el Ca^{2+} sería el responsable de una neurotoxicidad de desarrollo más lento probablemente debido a una entrada excesiva de Ca^{2+} a través de los canales NMDA (Rothman y Olney, 1987).

Estos datos se correlacionan con el hecho de que las áreas del cerebro más vulnerables a la isquemia son las que reciben mayor número de aferencias excitadoras mediadas por AAE (Fagg y Foster, 1983), además el daño isquémico se previene con la lesión de estas vías.

Por otra parte los cambios citopatológicos isquémicos agudos observados en microscopía óptica consistentes en: edema dendrítico, degeneración edematosa aguda de los cuerpos

celulares neuronales y cambios picnóticos nucleares, son indistinguibles de los procesos degenerativos producidos por la administración oral de GLU en ratas jóvenes (Ikonomidou y cols., 1989) y de las típicas lesiones en el cuerpo neuronal inducidas por la administración exógena de agonistas del GLU. Por último, se ha demostrado que la administración de MK-801, antagonista específico de los receptores NMDA, protege 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), son debidos a mecanismos celulares que implican disminución de la excitabilidad neuronal y disminución de la liberación de GLU (Busto y cols., 1989; Duhaime y Ross, 1990).

El daño coclear producido por la hipoxia/isquemia y trauma acústico son muy parecidos, en ambas situaciones se observan alteraciones similares, que podrían implicar la intervención de un mecanismo patológico común; de hecho se ha propuesto que una exposición excesiva a ruidos produce la hipoxia/isquemia coclear (Hawkins, 1971; Mishrahy y cols., 1958). De esta manera la exposición durante 30-60 minutos a sonidos de intensidad mayor de 110 dB producen disminución significativa del flujo colear (Okamoto y cols., 1990; Scheibe y cols., 1990) y de la pO_2 en los líquidos del oído interno (Scheibe y cols., 1990; Thorne y Nuttal, 1987), sin modificar la presión arterial en otros territorios del organismo (Okamoto y cols., 1990; Scheibe y cols., 1990). No existe, sin embargo, una correlación significativa entre la disminución del flujo sanguíneo coclear,

la pO_2 endolinfática y la extensión del daño morfológico y funcional encontrado (Thorne y Nuttall, 1987 y 1989).

El primer cambio patológico observado 15-20 minutos después de la instauración del trauma (Beagley, 1965; Robertson, 1983) o de la hipoxia/isquemia (Billet y cols., 1989) es una dilatación dendrítica bajo las CCI con hinchazón mitocondrial de las neuronas del ganglio espiral que pueden ser reversibles. Estas alteraciones son similares a los cambios autolíticos observados en la cóclea humana postmortem (Lavigne-Rebillard y Pujol, 1988), tanto en fetos (Lavigne-Rebillard y Pujol, 1990) como en adultos, especialmente evidente en los pacientes fallecidos en situación hipóxica (Nadol y Burges, 1985). También este patrón de degeneración de las neuronas del ganglio espiral y de sus procesos periféricos es similar al que se observa tras la administración de AK, AMPA y GLU, lo que sugiere que el proceso degenerativo neuronal derivado de la hipoxia/isquemia y del trauma podría estar relacionado con el GLU (Eybalin y Pujol, 1989).

La utilización de antagonistas competitivos y no competitivos del NMDA en los modelos de degeneración de las neuronas ganglionares espirales, ha demostrado su efectividad en el bloqueo de la dilatación dendrítica de las neuronas aferentes tipo I lo que implica a los receptores NMDA en el proceso de degeneración neuronal. Por otra parte, la acción antagónica del DNQX sobre la dilatación masiva de las dendritas radiales inducida por AMPA (Puel y cols., 1991b) sugiere que, en la cóclea, los daños patológicos inducidos por anoxia/isquemia o trauma acústico que aparecen en las neuronas tipo I del ganglio espiral podrían estar mediadas por más de un tipo de receptor de GLU (Puel y Pujol, 1992).

En la presbiacusia, la atrofia de los vasos espirales afecta preferentemente y de forma más intensa al área basal coclear, por lo que las CCI's basales son las más expuestas a la afectación hipóxica. De hecho en la presbiacusia se observa la pérdida de células ciliadas con una distribución preferentemente basal que se correlaciona estrechamente con la distribución de las lesiones de las neuronas ganglionares (Pujol y cols., 1991). Se postula que las alteraciones anóxicas locales al afectar a la célula glutamatérgica desencadenaría la cascada de eventos neurotóxicos que concluyen 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 reactivas producen un aumento de la liberación de AAE (Pellegrini-Giampietro y cols., 1990).

Se ha demostrado en numerosos estudios las similitudes entre el daño hipóxico/isquémico coclear y el producido por modelos neurotóxicos (Puel y Pujol, 1992; Puel y cols., 1994; Pujol y cols., 1991, 1992 y 1993), también se ha comparado este modelo con el trauma acústico (Pujol, 1991). El modelo de isquemia desarrollado primero por Billet (1989) y luego por el equipo de Pujol (Puel y cols., 1994; Pujol y cols., 1992) consiste en, una vez decapitado el animal, se procede a la fijación del tejido pasado un tiempo determinado. A partir de este modelo se puede observar una lesión de los terminales aferentes tipo I bajo las CCI's en la zona modiolar al cabo de 5 minutos, al cabo de 10 minutos la lesión bajo las CCI's es total, abarcando tanto la zona modiolar como la de los pilares internos y las fibras edematosas alcanzan la habénula perforada. Además se pueden observar daños en las células ciliadas, estos daños consisten en vacuolizaciones celulares

que son mayores en las CCEs aunque también se observan en las CCIs. Pasados 20 minutos la lesión afecta también a los sistemas eferentes.

Estos autores proponen que existe un mecanismo común entre el daño causado por los antagonistas del GLU y el producido bajo las CCIs por la hipoxia/isquemia. Aún más, aportan datos sobre la protección ante el daño isquémico llevada a cabo por antagonistas de los receptores de GLU (Puel y Pujol, 1992; Puel y cols., 1994; Pujol y cols., 1993). Con respecto a esta protección llegan a la conclusión que la lesión producida por la isquemia es bloqueada casi totalmente por la administración de un antagonista de los receptores no-NMDA, el DNQX, no obstante, seguían apareciendo fibras lesionadas en la zona modiolar, bajo las CCIs. Con la administración de AP-5, un antagonista de los receptores NMDA, no conseguían protección ninguna. Pero si se administra una mezcla de antagonistas de receptores no-NMDA (DNQX) y NMDA (AP-5) (Puel y Pujol, 1992; Puel y cols., 1994) la protección ante la isquemia es total.

Nuestros datos sobre la lesión producida por la administración intraperitoneal de GMS en animales adultos nos llevan 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, así como en la presbiacusia. Aparte de la gradación de las lesiones encontradas desde la zona modiolar a la de los pilares internos, hemos de destacar que también hemos encontrado una gradación de las lesiones, tanto morfológica como electrofisiológica, según la espira coclear, siendo mayor en la espira basal y menor en la media y apical (figuras 4 y 5, plancha 2). Esta última gradación es típica tanto en

situaciones de hipoxia/isquemia como en presbiacusia (Billet y cols., 1989; Spoendlin y Schortt, 1988)

B. EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE GMS EN ANIMALES EN DESARROLLO

Como hemos comentado en la Introducción de esta Memoria de Tesis Doctoral, en el desarrollo del sistema nervioso central se aprecia que la sensibilidad de las neuronas a determinados neurotóxicos varía de forma importante. Por lo tanto, existe un proceso de regulación de receptores que hace que diferentes regiones sean más sensibles a uno u otro de los AAE administrados en función del estadio que se estudie. Esto podría deberse a un período crítico de expresión de receptores, por ejemplo Pellegrini-Giampietro y cols. (1992) sugieren un incremento de receptores AMPA/AK, en el cerebro de la rata, que para el neocortex podría situarse en torno al 4° día PN, mientras que en el hipocampo podría incrementarse entre el 7° y 21° día PN para luego disminuir. Por otro lado, es sabido que las estructuras sensoriales periféricas, como la retina y la cóclea, se desarrollan muy pronto, así el AK es tóxico en neuronas retinianas de pollo a los 6 días de desarrollo embrionario (Campana y Suburo, 1986).

B.1. Sobre otros modelos experimentales

Este proceso de regulación en la expresión de receptores no ha sido estudiado en la cóclea. Los pocos trabajos de neurotoxicidad coclear durante el desarrollo han incidido por una parte en la sensibilidad de las neuronas cocleares al AK en períodos concretos y aislados del desarrollo (Gil-Loyzaga y Pujol 1990a y b; Pujol y cols., 1985) y por otra en la sensibilidad de dichas neuronas ante la administración de GMS durante todo el período postnatal de desarrollo coclear (Janssen y cols., 1991; Janssen, 1992).

Pujol y cols. (1985) encuentran que pasados 5 minutos de la perfusión intracoclear de 1 nM de AK en ratas de 6 días de vida toda la región bajo las CCIs se haya lesionada y además observan el mismo tipo de daño bajo las CCEs. Estos autores concluyen que sus datos muestran la presencia de receptores sensibles al AK en las dendritas de las fibras tipo I que en esa edad postnatal inervan las CCIs y, probablemente, envían colaterales hacia las CCEs que luego serán sustituidas en gran parte por las fibras del sistema eferente medial (Lenoir y cols., 1980a y b). No obstante, estos autores también observaron la presencia de fibras aferentes tipo II que no resultaron dañadas.

En los estudios de Gil-Loyzaga y Pujol (1990a y b) se muestra la presencia de fibras sensibles al AK, pasados 10 minutos después de su administración, en estadio muy tempranos del desarrollo, el día 17 gestacional y el día 1 PN. Además, demuestran la toxicidad del AK en cultivos de neuronas cocleares desarrolladas a partir de células obtenidas de embriones de 18 días de gestación y mantenidas en cultivo durante 7 días (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990b). En un trabajo más extenso (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a) estos autores concluyen, primero, que el sitio de acción del AK en la cóclea es presináptico y está presente en las fibras tipo I en embriones de 17 días de gestación ya que no existe elemento presináptico diferenciado (células ciliadas) en estadios tan tempranos y, además estos receptores se encuentran distribuidos por toda la fibra no recubierta de cápsula mielínica; y segundo que en ratas de 1 día de vida el sistema aferente radial conecta tanto con las CCIs como con las CCEs. Estos estudios, limitados a períodos muy concretos del desarrollo nos indican que las

fibras aferentes del sistema radial poseen, en los estadios estudiados, receptores glutamatérgicos pero no aportan datos acerca de la posible reestructuración en cuanto a tipo o número de receptores durante el desarrollo en dichas fibras.

Por otro lado, el método utilizado por Janssen (Janssen y cols., 1991 y Janssen, 1992) con administración intraperitoneal de GMS durante todo el período de desarrollo coclear (desde el día 2 al día 9 PN) y estudio de los efectos en el animal adulto, adolece de la misma crítica, ya que no es posible separar los, probablemente, diferentes efectos neurotóxicos acaecidos en las distintas etapas del desarrollo coclear. Sin embargo, las características fundamentales (en cuanto al neurotóxico utilizado, vía de administración e inyecciones diarias) se aproximan mucho a la metodología usada por nosotros por lo que expondremos y discutiremos más ampliamente sus resultados, comparándolos con los obtenidos en este trabajo. La toxicidad del GMS, administrado intraperitonealmente durante el desarrollo, sobre áreas específicas del sistema nervioso central ha sido demostrada en multitud de trabajos (Chambille y Serviere, 1993; Lucas y Newhouse, 1957; Olney, 1969).

No obstante, no es hasta 1991 cuando Janssen y cols. demuestran su toxicidad en la cóclea. En este trabajo, usando técnicas electrofisiológicas (PEATC) observan un aumento del umbral de audición para altas frecuencias (mayor de 8 KHz), y un aumento de la latencia y una disminución de la amplitud de todas las ondas del PEATC provocado por clicks de 90 dB de intensidad en los animales tratados. Además en el estudio morfológico observan en los animales tratados un órgano de Corti normal en todo excepto en el número, diámetro y densidad de las neuronas ganglionares. La pérdida de estas neuronas es

mayor en las espiras basales (del 40 al 60% respecto al control) que en las espiras apicales (80-90% respecto al control).

En la discusión de sus resultados (Janssen y cols., 1991) subrayan el parecido existente entre la elevación del umbral de audición encontrado por ellos y el obtenido mediante trauma acústico y presbiacusia, acentuando la preservación de las células ciliadas internas aunque hayan perdido un gran porcentaje de sus aferencias, fenómeno también encontrado en casos de ataxia de Friedreich (Spoendlin, 1974), una enfermedad neurodegenerativa. Dentro de esta línea, descartan la semejanza con la ototoxicidad producida por antibióticos aminoglucósidos debido tanto al estadio en el que es posible producir esta ototoxicidad, a partir del día 10 PN (cuando la sinaptogénesis coclear ha concluido), como a las células afectadas (principalmente las células ciliadas externas).

Por otra parte, apunta dos posibles fenómenos ontogenéticos para explicar la correlación existente entre el gradiente neurotóxico (base-apex) debido a la administración de GMS y el gradiente de desarrollo coclear, donde la sinaptogénesis comienza en la parte basal y termina en la apical (Lenoir y cols., 1980a y b). El primero es la posibilidad de neurotoxicidad acumulativa y puesto que las espiras basales se desarrollan antes, la presencia de receptores funcionales en las fibras que inervan estas espiras es mayor en el tiempo que la presencia de receptores en las fibras que inervan las espiras apicales, estando por tanto más tiempo expuestos a la acción neurotóxica del GMS. El segundo hace referencia a características de la inervación glutamatérgica expresada únicamente en períodos concretos del desarrollo. Entre estas

características incluyen la mayor presencia de determinados subtipos de receptores así como el desarrollo de los sistemas de recaptación de GLU.

Por otra parte también hacen alusión a dos características morfológicas de las neuronas ganglionares que no presentaron un gradiente a lo largo de las espiras cocleares, es decir, el tamaño y la densidad celular. El mayor tamaño de estas neuronas fue evidente en los animales estudiados a la edad de 22 días pero no en aquellos registrados a los 105 días de vida. A la vista de estos datos, los autores sugieren que en los animales tratados las neuronas ganglionares alcanzan la madurez antes que en los animales controles, pudiendo esto reflejar los efectos estimulantes del crecimiento debidos al GLU o, por otra parte, ser un mecanismo compensatorio ante la reducción del número de neuronas ganglionares.

En un trabajo posterior, Janssen (1992), se demuestra que la neurotoxicidad debida el GMS es parcialmente bloqueada por dos antagonistas de receptores de GLU, uno de amplio espectro, el ácido kinurénico, y otro específico de los receptores NMDA, el MK-801. Además, obtienen un aumento del umbral de audición en los animales tratados solamente con los antagonistas. Estos resultados les conducen a sugerir la presencia de receptores NMDA en la neuronas ganglionares de la cóclea en desarrollo, y, además, debido a la toxicidad de los antagonistas, la existencia de complejos mecanismos de regulación de receptores a través de todo el proceso de desarrollo coclear estudiado (del día 2 al 9 PN).

Antes de discutir nuestros resultados con relación a los ya expuestos, creemos conveniente exponer las razones que nos

llevaron a elegir tanto los períodos de administración como las dosis de neurotóxico utilizadas en cada período.

Teniendo en cuenta que los principales períodos del desarrollo de la audición en la rata son (Lenoir y cols., 1980a y b):

1. Estadio de maduración sináptica aferente: días 1 al 4 PN.

2.- Estadio de la maduración sináptica eferente: días 6 al 9 PN.

3.- Comienzo del registro de potenciales evocados auditivos: días 9 al 12 PN.

4.- Registro de potenciales evocados auditivos con características adultas: días 15 al 18 PN.

Consideramos oportuno para nuestros objetivos estudiar los tres primeros períodos, mientras que el cuarto se encuentran ampliamente desarrollado en el primer apartado, correspondiente a animales adultos de este trabajo.

La elección de dos dosis (4 y 2 gramos de GMS por kilo de peso) distintas de neurotóxico y su administración durante 1, 2, 3 u 8 días se fundamenta en la idea de que se necesita una presencia de GMS en concentraciones muy altas o durante mucho tiempo para que pueda ejercer sus características neurotóxicas. De hecho Janssen y cols., en su primer trabajo (1991) emplean una dosis de 4 mg por gramo de peso administradas durante 8 días consecutivos, mientras que en el segundo (Janssen, 1992) llegan a la conclusión que es suficiente con 2 mg por gramo de peso para producir los mismos efectos excitotóxicos.

Por este motivo, elegimos una dosis muy alta (4mg por gramo de peso) y una administración única para observar los efectos del neurotóxico en los días más señalados del desarrollo

ontogénico, mientras que usamos 2mg por gramo de peso administrados durante 2, 3 u 8 días consecutivos para estudiar la toxicidad del GMS durante todo el desarrollo (8 días) y durante los períodos más significativos del desarrollo sináptico (administración durante 2 y 3 días consecutivos en los períodos comprendidos entre los días 2 y 6, 6 y 9, 9 y 12).

B.2. Administración única

La administración de 4mg de GMS por gramo de peso en los días más significativos del desarrollo coclear (días 2, 6, 9 y 15 PN) produjo efectos diferentes, dependiendo del día de administración (tabla 13 y figuras 37, 38 y 39). Así, se pudo comprobar tanto a nivel fisiológico como a nivel morfológico la carencia de efectos en las cócleas del grupo V (día 15 PN) (tablas VI y 6; figuras 16, 17 y 18). Esta ausencia de efectos puede ser debida a la funcionalidad de mecanismos que impiden la concentración de GLU en el sistema nervioso. Esta eficacia es debida, por una parte al desarrollo de la capacidad del epitelio intestinal y del hígado para transaminar los aminoácidos (Windmueller y Spaeth, 1980). Por otra parte, también estaría implicado el desarrollo de los mecanismos de aclaramiento de neurotransmisor en la cóclea. Además, podría tener especial relevancia la no expresión de determinados subtipos de receptor de GLU, en concreto los receptores NMDA, en determinados tipos de fibras aferentes, en concreto las fibras de alta frecuencia de descarga.

Por el contrario, la administración de una dosis única de GMS en los días 2, 6 y 9 PN (grupos II, III y IV, respectivamente) causó efectos observables tanto a nivel fisiológico como morfológico. Aunque los tres grupos mostraron

en general un aumento de la latencia, una disminución de la amplitud, un aumento del umbral de audición, y pérdida de neuronas ganglionares en espiras basales; estos efectos fueron diferentes en los tres grupos.

En la figura 37 que muestra los valores medios de la latencia podemos observar que se produce un aumento de esta en los tres grupos aludidos, con una gradación en cuanto a la frecuencia. Sin embargo, el grupo II mostró un comportamiento más homogéneo y estadísticamente más significativo, en intensidades medias y altas, respecto al control (tabla III) que los grupos III y IV. Además las latencias obtenidas en las cócleas pertenecientes al grupo III presentaron menor variabilidad que las del grupo IV (tablas IV y V), siendo los valores significativos en altas intensidades para el grupo III, mientras que para el grupo IV las intensidades medias fueron las estadísticamente significativas.

La figura 38, donde se representan las amplitudes de los cuatro grupos que recibieron una administración única de GMS, muestra que los valores medios de las amplitudes fueron muy semejantes para los grupos II, III y IV. No obstante, mientras que en el grupo II y III los valores de intensidades altas y medias fueron estadísticamente significativos, en el grupo IV los efectos del tratamiento fueron más variables.

Con respecto al umbral de audición (tabla 13 y figura 39) el aumento en 16 KHz fue una constante en los tres grupos, pero en el grupo III también se ven afectadas significativamente las frecuencias de 8 y 4 KHz, mientras que en el grupo II, es la frecuencia de 8 KHz la que también es estadísticamente significativa. En el grupo IV sólo es significativo el umbral para 16 KHz y con la probabilidad más baja ($p < 0,5$).

El análisis morfológico de las cócleas corroboró los resultados fisiológicos puesto que las pertenecientes al grupo V no se diferenciaron en nada respecto a las cócleas control, mientras que se pudo observar que la pérdida neuronal acaecida en las cócleas de los grupo II, III y IV seguía una pauta de disminución según avanzaba el desarrollo ontogénico coclear. Mientras que en el grupo II y III la lesión abarcó las espiras basales y medias, en el grupo IV sólo se observó lesión en la espira basal. Lo cual está en concordancia con la hipótesis de un desarrollo coclear donde la región basal es la encargada de codificar las frecuencias audibles (graves) en los primeros estadios del desarrollo y según avanza este, codifica frecuencias cada vez mas agudas (Rubel y Ryals, 1983).

Por lo tanto, y a la vista de estos resultados, podemos concluir que la presencia de elevadas concentraciones de GLU en días puntuales del desarrollo coclear (días 2, 6 y 9 PN) conduce a la pérdida de neuronas del ganglio espiral.

De la misma forma que en animales adultos, donde se ha demostrado la presencia de receptores AMPA/AK, que se presentarían con una mayor densidad en las fibras que informan sobre el inicio del estímulo, y NMDA, siendo las fibras que informan sobre la intensidad del estímulo las que presentarían una mayor densidad de este tipo de receptores; la presencia de estos dos tipos de receptores también ha sido demostrada en animales en desarrollo (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990a y b; Janssen, 1992; Pujol, 1985). Por lo tanto la presencia de elevadas concentraciones de GLU afectaría a ambos tipos de receptores tanto en edad adulta como en el desarrollo.

Si, tal y como hemos indicado más arriba, el parámetro de latencia del potencial de acción compuesto del nervio coclear

nos indica la actividad sincrónica de las fibras con alta densidad de receptores AMPA/AK, mientras que el parámetro de amplitud alude a las fibras con mayor presencia de receptores NMDA; las diferencias encontradas en la comparación de estos parámetros nos indican una presencia o sensibilidad distinta según el momento del tratamiento.

Así, el aumento homogéneo de la latencia obtenido en todos los registros de las cócleas del grupo II nos indica que en el día 2 PN las fibras que se encargan de la latencia son muy sensibles al efecto neurotóxico del GLU y esto podría ser debido a que en este momento del desarrollo expresan una mayor cantidad de receptores NMDA que los que expresarán en estado adulto. Esta hipótesis se enmarca en la necesidades neurotróficas de las fibras que en ese momento del desarrollo se encuentran en el estadio de formación de las sinapsis con las CCIs. De otro lado, no se puede descartar la presencia de otros tipos de receptores, los metabotrópicos, a los que no hacemos referencia por no existir en la bibliografía estudios referentes a su presencia en la cóclea en desarrollo y muy escasos en la cóclea adulta (Wenthold, 1994).

De igual forma, los resultados de la latencia en los grupos III y IV, nos indican que la posible mayor densidad de receptores NMDA en las fibras encargadas de informar sobre el inicio del estímulo podría mantenerse a lo largo del desarrollo, aunque la mayor variabilidad de estos resultados nos sugiere una menor sensibilidad, respecto al período de desarrollo ontogénico, de estas fibras ante la presencia del GLU en los días 6 y 9 PN.

Con respecto al parámetro de amplitud del potencial de acción compuesto del nervio octavo, la figura 38 nos muestra

que disminuye significativamente en los grupos II, III y IV, mientras que los valores del grupo V son semejantes a los valores obtenidos en el grupo control. En esta figura resulta llamativa la semejanza del efecto obtenido en los grupos II, III y IV a la frecuencia de 16 KHz, aunque ya se hace patente la mayor variabilidad de los resultados obtenidos en los grupos III y IV. Esta variabilidad queda mejor reflejada en las gráficas correspondientes a 12 y 8 KHz.

Estos datos nos sugieren que el efecto neurotóxico del GLU es más intenso en las espiras basales de la cóclea, las cuales codifican para altas frecuencias, mientras que en las espiras medias y apicales el GLU tiene un efecto menor, lo que está en concordancia con los resultados aportados por Janssen y cols. (1991). No obstante, nuestros datos nos permiten hipotetizar que este efecto neurotóxico es más efectivo en la primera etapa del desarrollo, grupo II, que en los sucesivos períodos ontogénicos, grupos III y IV.

La acción del GLU, en concentraciones tóxicas, sobre las fibras aferentes da lugar primero a una despolarización debido a la unión a los receptores AMPA/AK, que se continúa con una entrada excesiva de iones Ca^{2+} a través de los receptores NMDA cuyo canal ha sido desbloqueado por la separación de los iones Mg^{2+} a consecuencia del cambio en la polaridad de la membrana celular. Esta hipótesis neurotóxica puede ser el mecanismo de acción subyacente a los resultados obtenidos en los grupos, II, III y IV. Sin embargo, la expresión de cantidades superiores de receptores NMDA a lo largo de toda la espira coclear en la primera etapa del desarrollo ontogénico, grupo II, puede ser la causa de los efectos más acusados encontrados en este grupo respecto de los grupos III y IV. Además, la similitud en los

efectos encontrados en la frecuencia de 16 KHz en todos los grupos nos permite hipotetizar una presencia más duradera en el tiempo de los receptores tipo NMDA en las fibras que inervan la parte basal coclear o además, una acción más específica del GLU en las espiras basales, debida a una menor eficacia de los sistemas de recaptación. Estas sugerencias se encuentran avaladas por los resultados en los animales adultos, donde el efecto del GLU es mayor en las espiras basales.

En consecuencia de lo expuesto podemos afirmar que las fibras que informan sobre la amplitud, y que se piensa que poseen mayor número de receptores NMDA, son las más sensibles al efecto neurotóxico del GLU.

Con respecto a los umbrales obtenidos (tabla 13 y figura 39) se puede observar que los datos obtenidos en 16 KHz reflejan un aumento del mismo para todos los grupos, excepto el grupo V. Para las otras frecuencias este aumento es menos patente en todos los grupos. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Janssen y cols. (1991) que observan un aumento del umbral sólo para los frecuencias de 16 KHz o mayores. El significado fisiológico de estos datos pone en evidencia la existencia de fenómenos que hacen que la toxicidad del GLU sea más efectiva en altas frecuencias y, por otra parte representan un dato a favor de la presencia de varias subpoblaciones de fibras aferentes tipo I, alguna de las cuales es muy poco sensible a la neurotoxicidad del GLU.

El análisis morfológico de las cócleas pertenecientes a estos grupos puso en evidencia que las constituyentes del grupo V fueron semejantes a las cócleas control, mientras que en los otros grupos se observó una disminución del número de neuronas ganglionares. Este decremento fue más patente en el grupo II,

donde todos las cócleas estuvieron afectadas, con carencia de neuronas tanto en espiras apicales como medias. Sin embargo, no en todas las cócleas pertenecientes al grupo III y IV se observó igual afectación, encontrándose la lesión sobre todo en espiras basales.

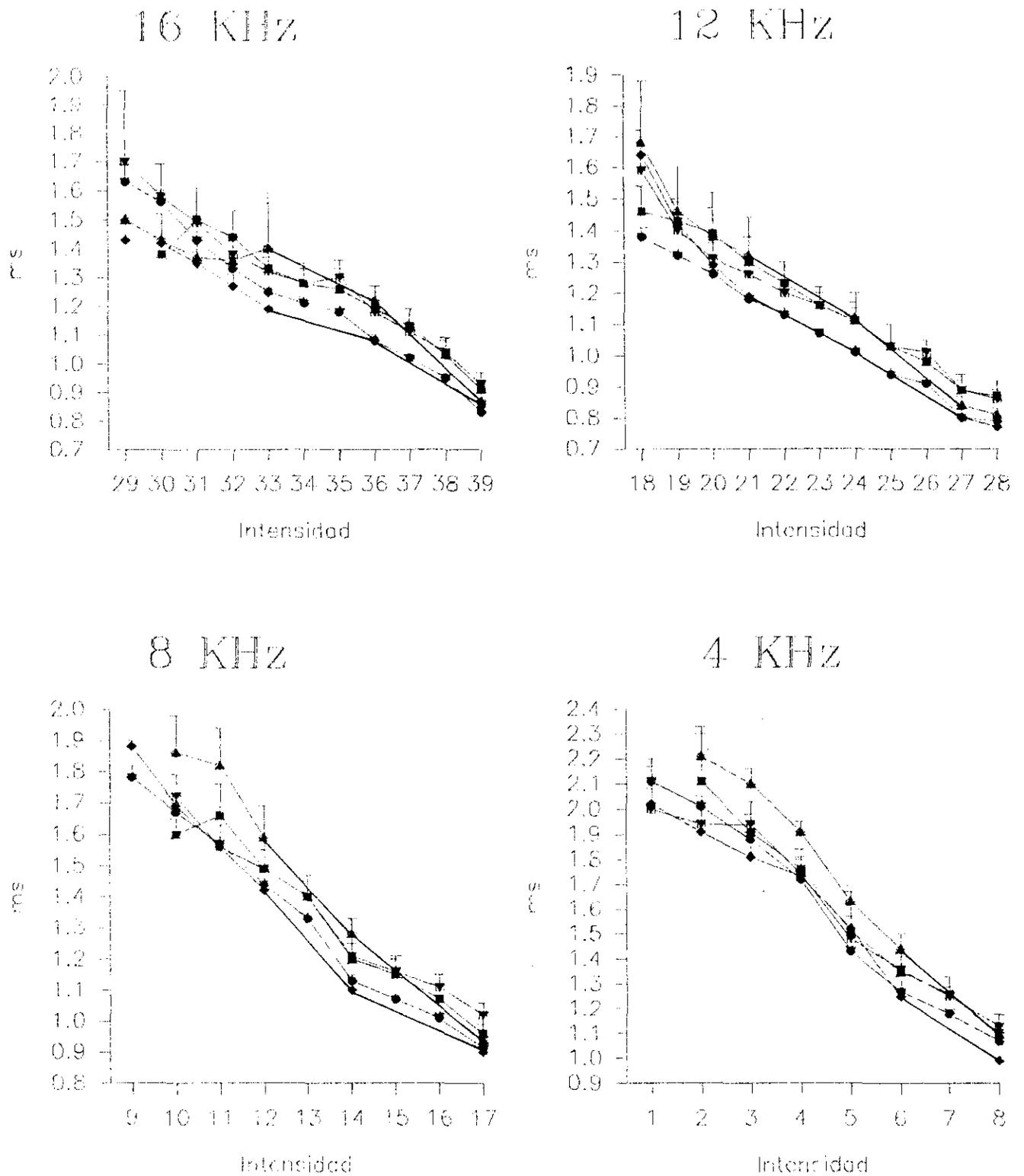


Figura 37: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a las obtenidas en los grupos que recibieron una sola administración de GMS en el día 2 PN (▼ , N=10); 6 PN (■ , N=8); 9 PN (▲ , N=4) y 15 PN (◆ , N=4)

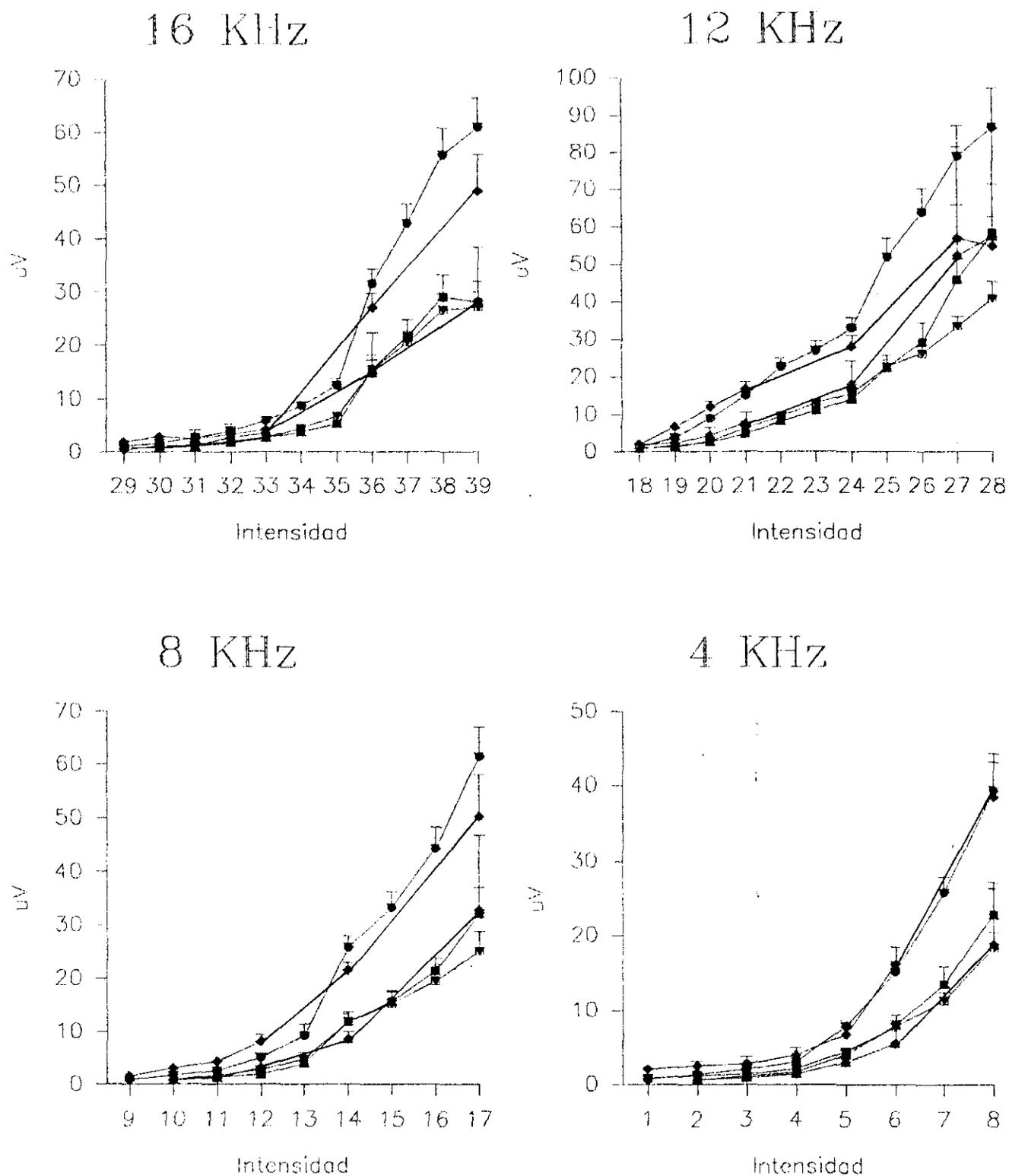


Figura 38: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a las obtenidas en los grupos que recibieron una sólo administración de GMS en el día 2 PN (▼ , N=10), 6 PN (■ , N=8); 9 PN (▲ , N=4) y 15 PN (◆ , N=4)

Tabla 13: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en los animales control frente a los obtenidos en los grupos que recibieron una sólo administración de GMS: grupos II, III, IV y V

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO II				GRUPO III				GRUPO IV				GRUPO V			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	P	N	X	DS	P	N	X	DS	P
16 KHz	28	29,50	0,58	10	30,40	0,97	**	8	30,75	0,71	***	4	30,50	1,91	*	4	29,75	0,96	NS
12 KHz	28	18,39	0,50	10	18,60	0,70	NS	8	18,75	0,89	NS	4	18,25	0,50	NS	4	18,25	0,50	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	10	10,30	0,67	*	8	10,63	0,52	**	4	10,25	0,50	NS	4	9,25	0,50	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	10	2,20	0,79	NS	8	2,75	0,71	*	4	2,00	0,00	NS	4	1,25	0,50	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad respecto al control (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

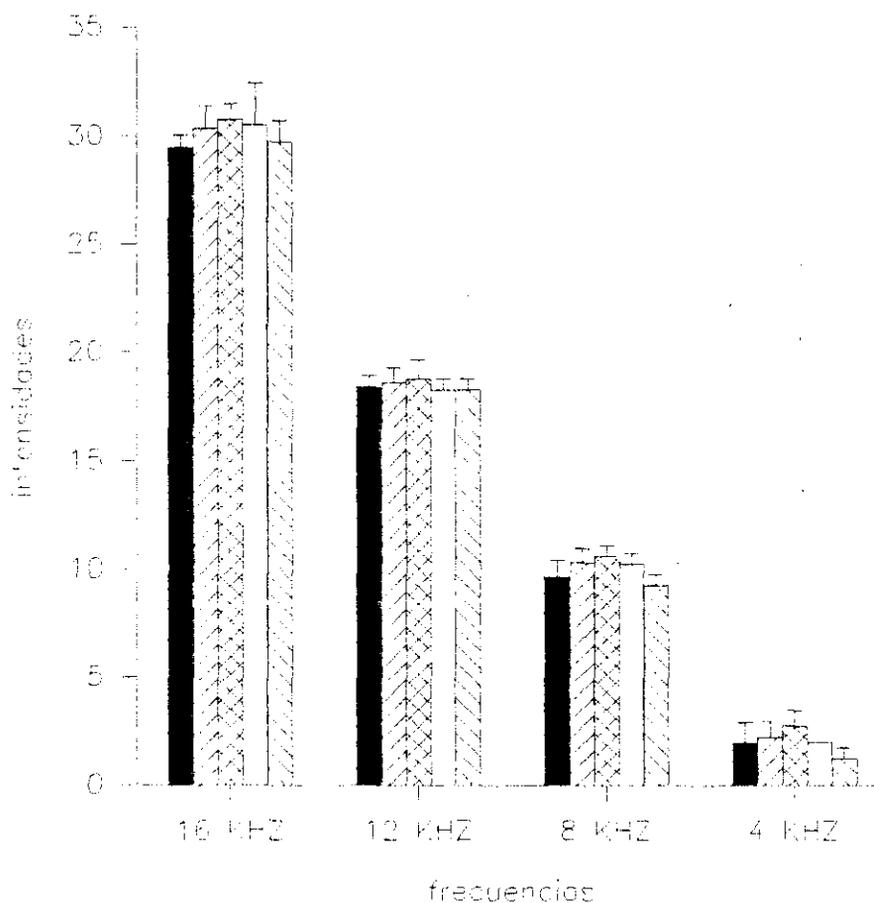


Figura 39: Umbrales (X+DS) del grupo control (■, N= 28) frente a los grupos II (▨, N= 10); III (▩, N= 8); IV (□, N= 4) y V (▧, N= 4)

B.3. Administración a partir del día 2 PN

En este apartado comparamos los efectos de la administración de sucesivas dosis de GMS inyectadas a partir del día 2 PN (figuras 40, 41 y 42; y tabla 14), aquí se incluye por tanto el grupo II (4mg de GMS en el día 2 PN), grupo VI (2mg de GMS en los días 2 y 3 PN), grupo VII (2mg de GMS en los días 2, 3 y 4 PN) y grupo VIII (2 mg de GMS durante los días 2 al 9 PN).

Como hemos expresado más arriba, uno de los objetivos de este estudio fue comparar los efectos del GMS administrado en distintas dosis y distintos periodos de tiempo. En la figura 40 se muestran las medias de las latencias de los grupos citados más arriba y podemos observar que las obtenidas en el grupo VIII son equiparables a las del grupo VII, a excepción de las altas intensidades en las frecuencias de 16 y 12 KHz, por lo que podemos concluir que el efecto del GMS sobre la latencia es casi idéntico si se administra a la misma dosis durante tres días del periodo de sinaptogénesis entre las fibras aferentes tipo I que si se inyecta durante todo el periodo ontogénico. Esta semejanza es más notable en altas frecuencias (16 y 12 KHz), mientras que en las frecuencias medias las diferencias entre estos dos grupos respecto al control se atenúan. Además, debemos llamar la atención sobre el brusco cambio de pendiente al pasar de altas a medias intensidades en las altas frecuencias observable en el grupo VIII, este hecho se corresponde con la observación morfológica de algunas neuronas ganglionares en las espiras basales de las cócleas de este grupo. Lo que representaría una mayor resistencia al efecto neurotóxico de algunas neuronas con alto umbral de estimulación.

Por otro lado, también se hace patente la gradación de neurotoxicidad obtenida en cuanto a la latencia, mientras que los resultados procedentes de los animales que recibieron dos administraciones de 2mg de GMS durante los días 2 y 3 PN no se diferenciaron de los controles, si lo hicieron los que recibieron una dosis mayor aunque en un sólo día, grupo II, y en mucho mayor grado los que recibieron tres administraciones sucesivas en los días 2, 3 y 4 al igual que los que fueron tratados durante 8 días seguidos.

En la figura 41 se muestra el mismo comportamiento, en cuanto a la disminución de la amplitud para los grupos II, VI y VII, mientras que en el grupo VIII esta disminución en amplitud fue mucho mayor. Estos resultados, la semejanza entre las medias de los grupos que recibieron 4mg de GMS durante un día y los que fueron tratados con 2mg de GMS durante los días 2 y 3 o 2, 3 y 4, se añaden a la hipótesis de que existe una subpoblación de fibras aferentes más sensible a la neurotoxicidad; es decir, las que informan sobre la intensidad del sonido y con un alto porcentaje de receptores NMDA en su membrana celular. Por otro lado el mayor decremento en la amplitud del grupo VIII nos indica que la mayor duración del tratamiento implica una disminución de mayor número de neuronas, y por tanto de una gradación de las fibras aferentes en cuanto a su sensibilidad ante la neurotoxicidad y por ende en una distinta densidad de los distintos tipos de receptores GLU.

A este respecto debemos añadir que, en contra de lo esperado, los resultados de amplitud del grupo VII presentaron una mayor desviación estandard, lo que nos sugiere que ante un tratamiento con GMS de corta duración se pueden dar fenómenos

de compensación entre los parámetros de latencia y amplitud. Es decir, el retardo en la percepción del sonido (latencia) es compensado con una mayor discriminación del mismo (amplitud).

Con respecto al umbral de audición (tabla 14 y figura 42) se pudo observar un aumento del mismo en todos los grupos en la frecuencia de 16 KHz, aunque no fue significativo para el grupo VII. Este aumento fue muy patente en el grupo VIII en 16 KHz e incluso en 12 KHz, sin embargo en los otros grupos no se hizo significativo en las frecuencias 12 KHz o inferiores. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Janssen y cols. (1991).

El análisis morfológico de todas las cócleas del grupo VIII reveló una pérdida muy acusada de las neuronas del ganglio espiral en las espiras basales, además las células que se conservaron presentaron una distribución mayoritaria en el área de la rama vestibular con escasas células en el área de la rama timpánica. Estas neuronas podría pertenecer a una subpoblación de fibras aferentes con alto umbral y alta frecuencia de descarga pero con una distribución sináptica en la zona de los pilares internos de las CCI's (Leake y cols., 1993), lo que estaría en concordancia con el cambio brusco de la pendiente en la curva de la latencia. La pérdida celular fue menos patente en los grupos II, VI y VII.

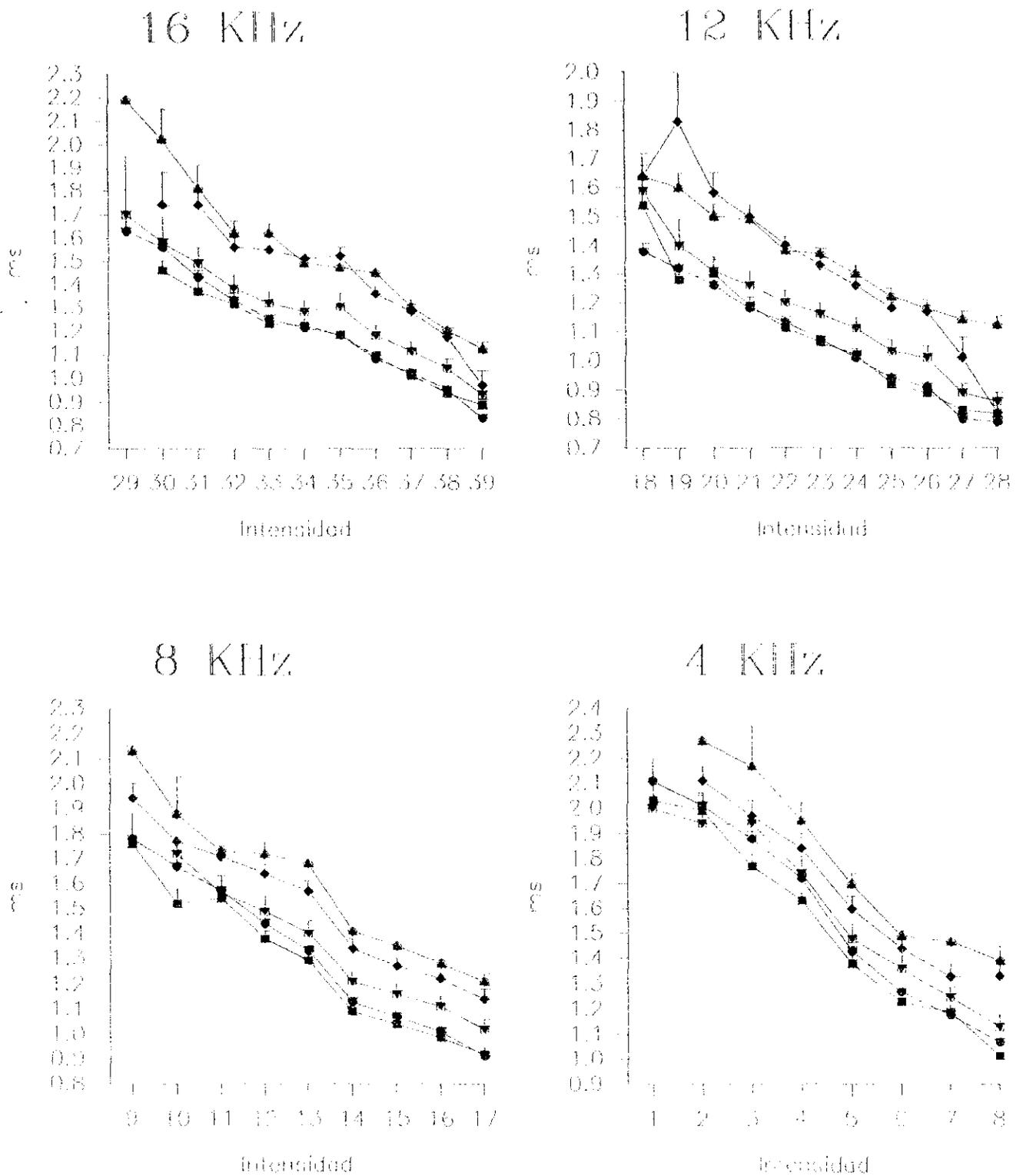


Figura 40: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a las obtenidas en los grupos que comenzaron el tratamiento el día 2 PN. GRUPO II (▼ , N=6); GRUPO VI (■ , N=6); GRUPO VII (▲ , N=4) y GRUPO VIII (◆ , N=6)

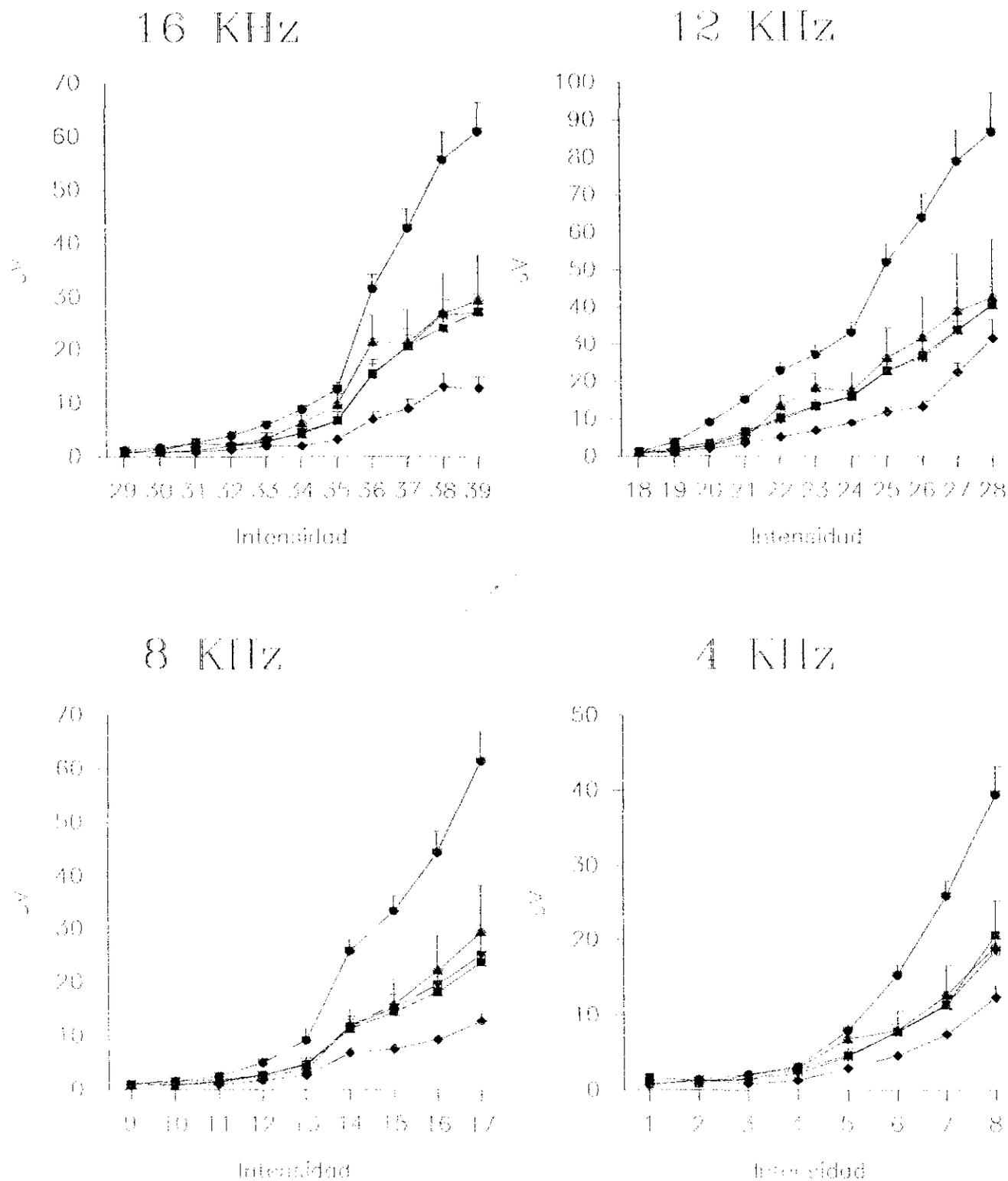


Figura 41: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N =28) frente a las obtenidas en los grupos que comenzaron el tratamiento el día 2 PN. GRUPO II (▼ , N = 10); GRUPO VI (■ , N = 6); GRUPO VII (▲ , N=4) y GRUPO VIII (◆ , N =6)

Tabla 14: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en los animales control frente a los obtenidos en los grupos que comenzaron el tratamiento con GMS el día 2 PN: grupos II, VI, VII y VIII

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO II				GRUPO VI				GRUPO VII				GRUPO VIII			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	P	N	X	DS	P	N	X	DS	P
16 KHz	28	29,50	0,58	10	30,40	0,97	**	6	30,50	0,84	**	4	30,25	1,26	NS	6	32,83	2,32	***
12 KHz	28	18,39	0,50	10	18,60	0,70	NS	6	18,83	0,98	NS	4	18,50	1,00	NS	6	19,17	0,75	**
8 KHz	28	9,64	0,78	10	10,30	0,67	*	6	10,17	0,98	NS	4	10,25	1,50	NS	6	10,17	0,98	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	10	2,20	0,79	NS	6	2,17	0,75	NS	4	2,75	0,96	NS	6	2,50	0,55	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard

P= probabilidad respecto al control (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

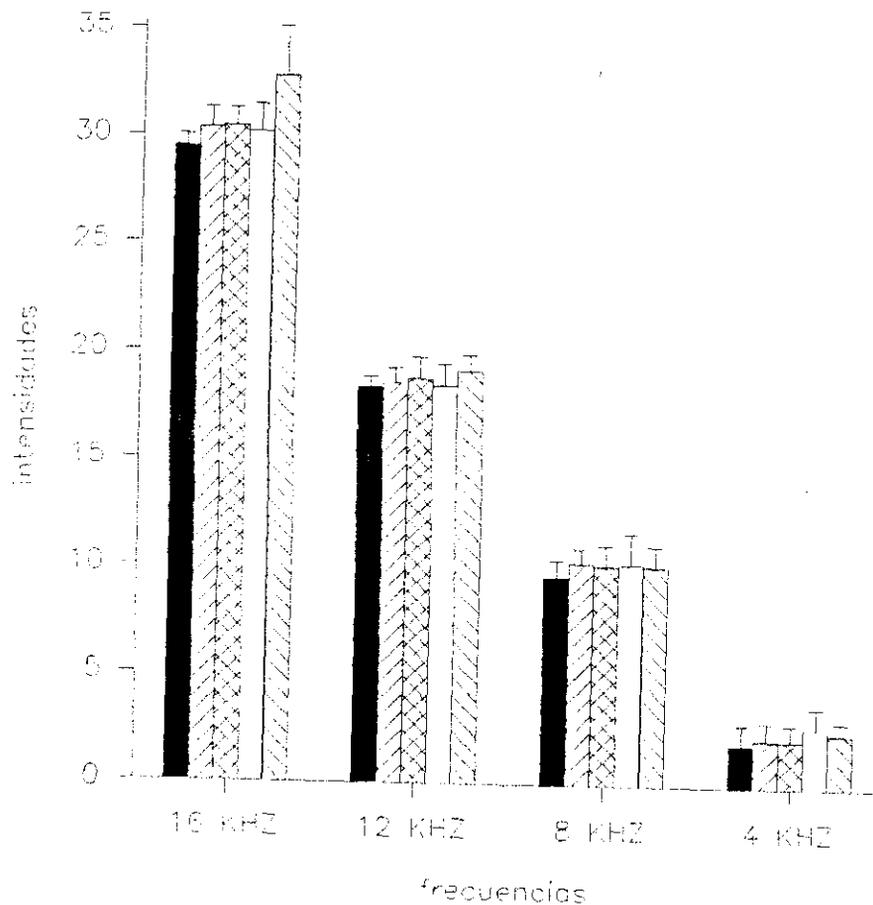


Figura 42: Umbrales (X+DS) del grupo control (■, N= 28) frente a los grupos II (▨, N= 10); VI (▩, N= 6); VII (□, N= 4) y VIII (▧, N= 6)

B.4. Administración a partir del día 6 PN

En este apartado comparamos los efectos de la administración de sucesivas dosis de GMS inyectadas a partir del día 6 PN (figuras 43, 44 y 45, tabla 15), aquí se incluye por tanto el grupo III (4mg de GMS en el día 6 PN), grupo IX (2mg de GMS en los días 6 y 7 PN) y grupo X (2mg de GMS en los días 6, 7 y 8 PN).

Al igual que en el anterior apartado, el comportamiento de la latencia fue gradual según el tratamiento. Así, los animales del grupo IX presentaron una latencia que no se diferenció de la control, mientras que en los del grupo X, tratados durante tres días con GMS, se obtuvo el mayor aumento; y en los animales del grupo III, este aumento fue intermedio (figura 43). De igual forma, las diferencias entre los grupos disminuyeron en las frecuencias más bajas (8 y 4 KHz).

En las amplitudes (figura 44) también se puede observar una gradación de los efectos neurotóxicos del GLU. El más afectado fue el grupo X, seguido por el III y el IX.

El aumento del umbral de audición se produjo solamente para los grupos III para 16, 8 y 4 KHz y X para la frecuencia de 16 KHz (tabla 15 y figura 45).

El análisis morfológico reveló la pérdida de neuronas ganglionares en las espiras basales de la cóclea y también se pudo percibir una posible gradación del daño, siendo mayor para el grupo X, seguido del III y por último en el grupo IX, donde la pérdida celular fue discreta.

Estos resultados indican también la presencia de varios subgrupos de fibras aferentes. Uno de ellos, con alta densidad de receptores NMDA muy sensible al efecto neurotóxico del GLU, otro con alta densidad de receptores AMPA/AK y que pudieran

seguir expresando en este momento del desarrollo receptores NMDA. Y por último un subgrupo de fibras con poca sensibilidad a los efectos neurotóxicos del GLU, que podrían estar incluidas entre las fibras no lesionadas descritas por Pujol y cols. en 1985.

Por otro lado también se puede observar que mientras que en los grupos II, VI y VIII el decremento de la amplitud es muy semejante, los resultados de las amplitudes obtenidas en los grupos III, IX y X presentan un gradación muy acusada. Esto puede sugerir que en el período de desarrollo de las sinapsis aferentes de las CCIs las fibras presentan una menor diferencia entre ellas, respecto a la densidad de receptores; mientras que en el período de desarrollo de la inervación de las CCEs, las fibras que hacen sinapsis con las CCIs presentan ya una segregación en cuanto a la densidad de receptores.

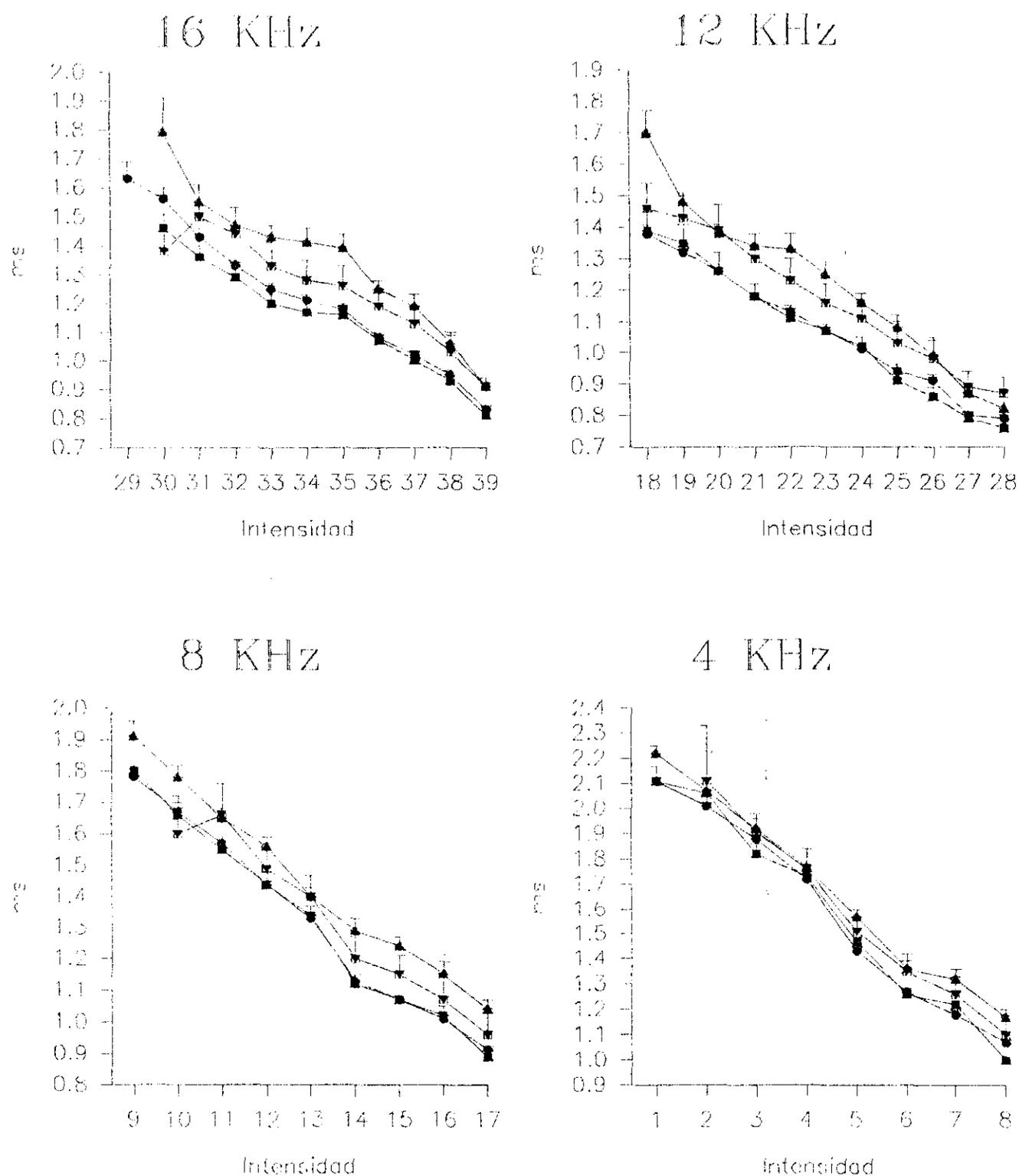


Figura 43: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a las obtenidas en los grupos que comenzaron el tratamiento el día 6 PN. GRUPO III (▼ , N=8); GRUPO IX (■ , N=4) y GRUPO X (▲ , N=10)

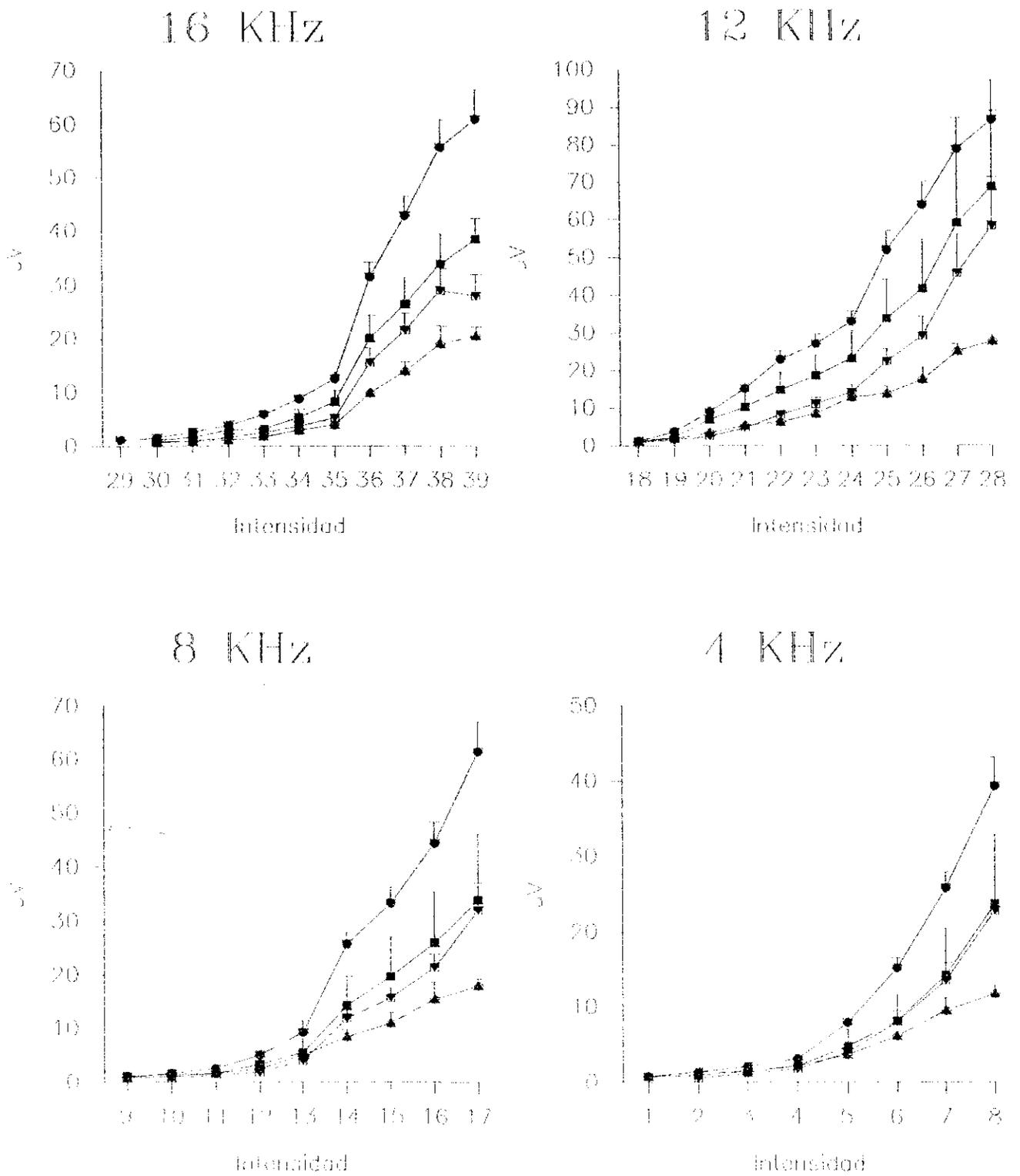


Figura 44: Amplitudes obtenidas en los animales controles (● , N = 28) frente a las obtenidas en los grupos que comenzaron el tratamiento el día 6 PN. GRUPO III (▼ , N = 8); GRUPO IX (■ , N = 4) y GRUPO X (▲ , N = 10)

Tabla 15: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en los animales control frente a los obtenidos en los grupos que comenzaron el tratamiento con GMS el día 6 PN: grupos III, IX y X

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO III				GRUPO IX				GRUPO X			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	P	N	X	DS	P
16 KHz	28	29,50	0,58	8	30,75	0,71	***	4	30,00	0,00	NS	10	30,60	0,52	***
12 KHz	28	18,39	0,50	8	18,75	0,89	NS	4	18,50	0,58	NS	10	18,20	0,42	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	8	10,63	0,52	**	4	10,25	0,96	NS	10	9,50	0,53	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	8	2,75	0,71	*	4	2,00	0,82	NS	10	1,70	0,82	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad respecto al control (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

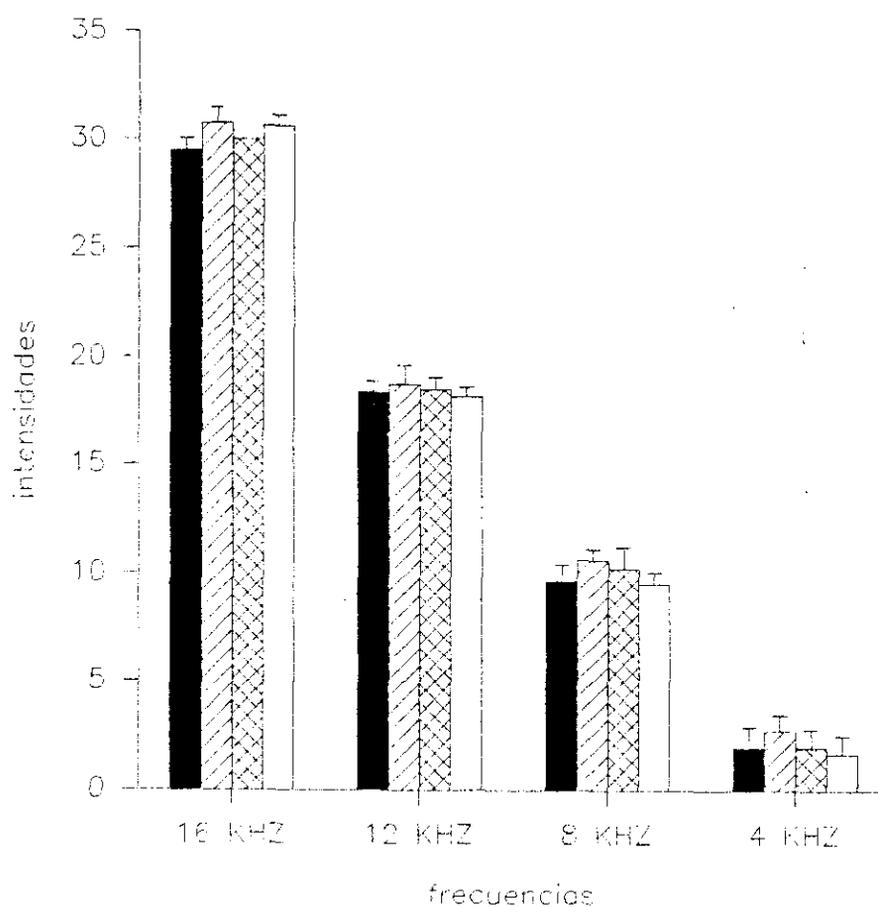


Figura 45: Umbrales (X+DS) del grupo control (■, N= 28) frente a los grupos III (▨, N= 8); IX (▩, N= 4) y X (□, N= 10)

B.5. Administración a partir del día 9 PN

En este apartado comparamos los efectos de la administración de sucesivas dosis de GMS inyectadas a partir del día 9 PN (figuras 46, 47 y 48 y tabla 16), aquí se incluye por tanto el grupo IV (4mg de GMS en el día 9 PN) y el grupo XI (2mg de GMS en los días 11, 12 y 13 PN).

El comportamiento de la latencia en estos dos grupos fue completamente distinto, mientras que el grupo IV fue por lo general mayor que la control, en el grupo XI las latencias fueron incluso menores a las control (figura 46). Además, las latencias obtenidas en el grupo XI presentaron una desviación estándar muy alta, y en la frecuencia de 16 KHz los valores próximos al umbral fueron menores a los valores control. Todo ello, junto a la observación morfológica de las cócleas de este grupo, donde sólo se aprecia pérdida neuronal muy relevante en una de ellas; nos lleva a sugerir que los efectos neurotóxicos del GLU administrado intraperitonealmente durante el desarrollo se hacen menos patentes en este estadio (día 9 PN). Esta pérdida de la efectividad neurotóxica puede ser debida a la conjunción de factores que ya hemos comentado.

En la figura 47 podemos observar que en los dos grupos se produjo disminución de la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio coclear. Este decremento presentó una tendencia contraria a la observada en los apartados anteriores, es decir, el grupo XI con un tratamiento de tres días mostró unas amplitudes mayores a las observadas en el grupo IV.

Con respecto a los umbrales (tabla 16 y figura 48), en los dos grupos se observó un aumento significativo en la frecuencia de 16 KHz.

La observación microscópica de las cócleas pertenecientes a estos dos grupos reveló una ausencia de lesiones en el ganglio espiral coclear, a excepción de unas pequeñas pérdidas de neuronas en la espira basal.

Estos datos nos sugieren que alrededor del día 9 PN en la cóclea se ha completado la segregación de las fibras tipo I en varios subgrupos con distinta distribución y densidad de los dos principales subtipos de receptor de GLU (AMPA/AK y NMDA). Un subgrupo de fibras tipo I con poca expresión de receptores NMDA, alta frecuencia de descarga espontánea y bajo umbral de estimulación, situada su sinapsis en la zona de los pilares internos bajo las CCIs y su cuerpo neuronal cercano a la rampa vestibular y encargado de la latencia y con un sensibilidad escasa ante los fenómenos neurotóxicos. Otro con muchos receptores NMDA, baja frecuencia de descarga espontánea y alto umbral de estimulación, cuya sinapsis está situada en la zona modiolar bajo las CCIs y el cuerpo celular en la zona de la rampa timpánica, principal encargado de la amplitud del potencial de acción compuesto auditivo. Entre estos dos subtipos se situarían una gradación de fibras con respecto a su densidad y subtipos de receptores glutamatérgicos; y además se puede hipotetizar la presencia de otro subtipo insensible a la acción neurotóxica del GLU, que estaría representado por las células que se mantienen en el ganglio espiral después del tratamiento de mayor duración. Esta última hipótesis estaría respaldada por los resultados de Rueda y cols. (1989) que obtienen una muerte neuronal del 40% después de un tratamiento neurotóxico muy potente con AK y un período de supervivencia de 10 o más días.

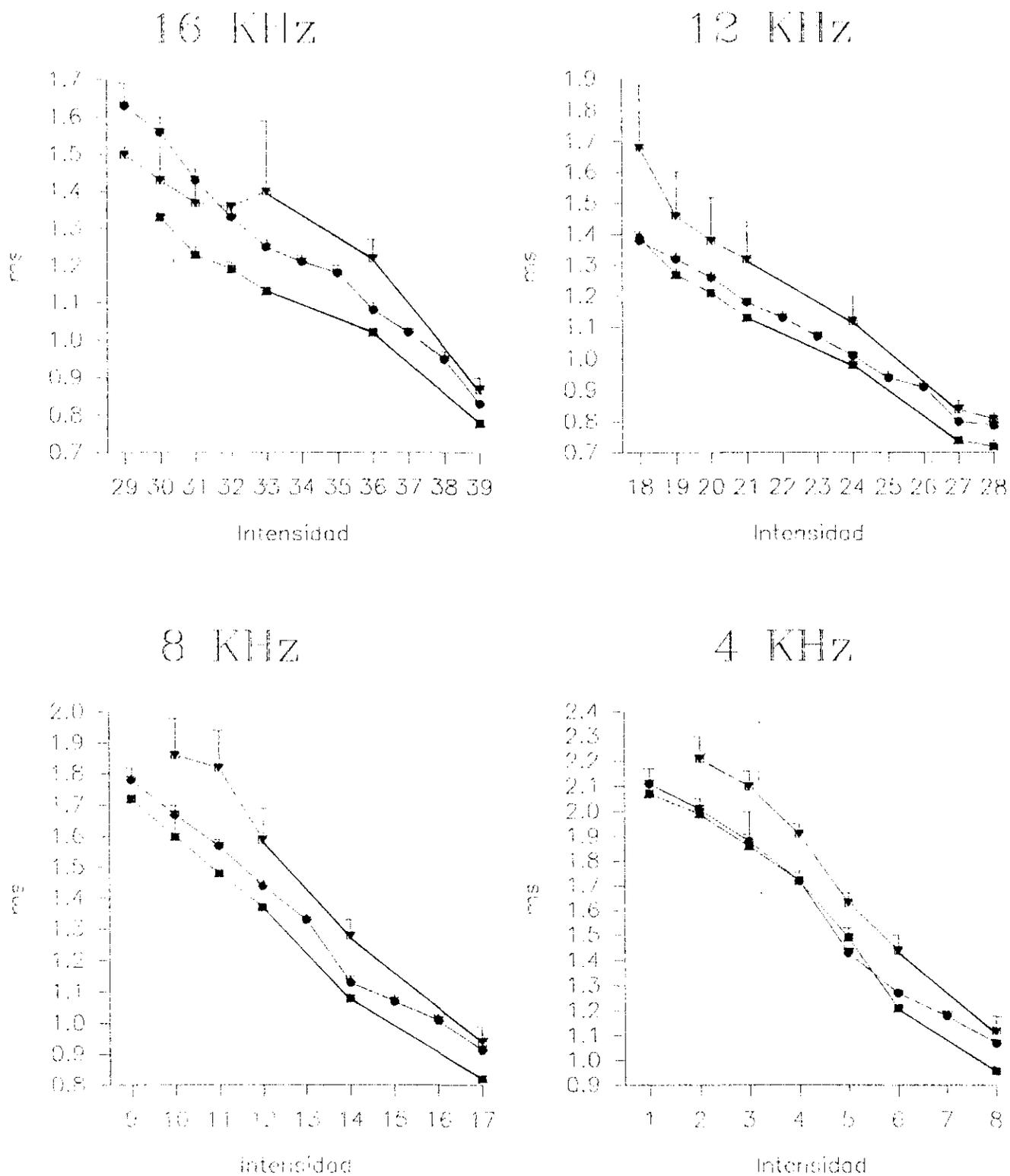


Figura 46: Latencias obtenidas en los animales controles (• , N=28) frente a las obtenidas en los grupos que comenzaron el tratamiento a partir del día 9 PN. GRUPO IV (▼ , N=4) y GRUPO XI (■ , N=2)

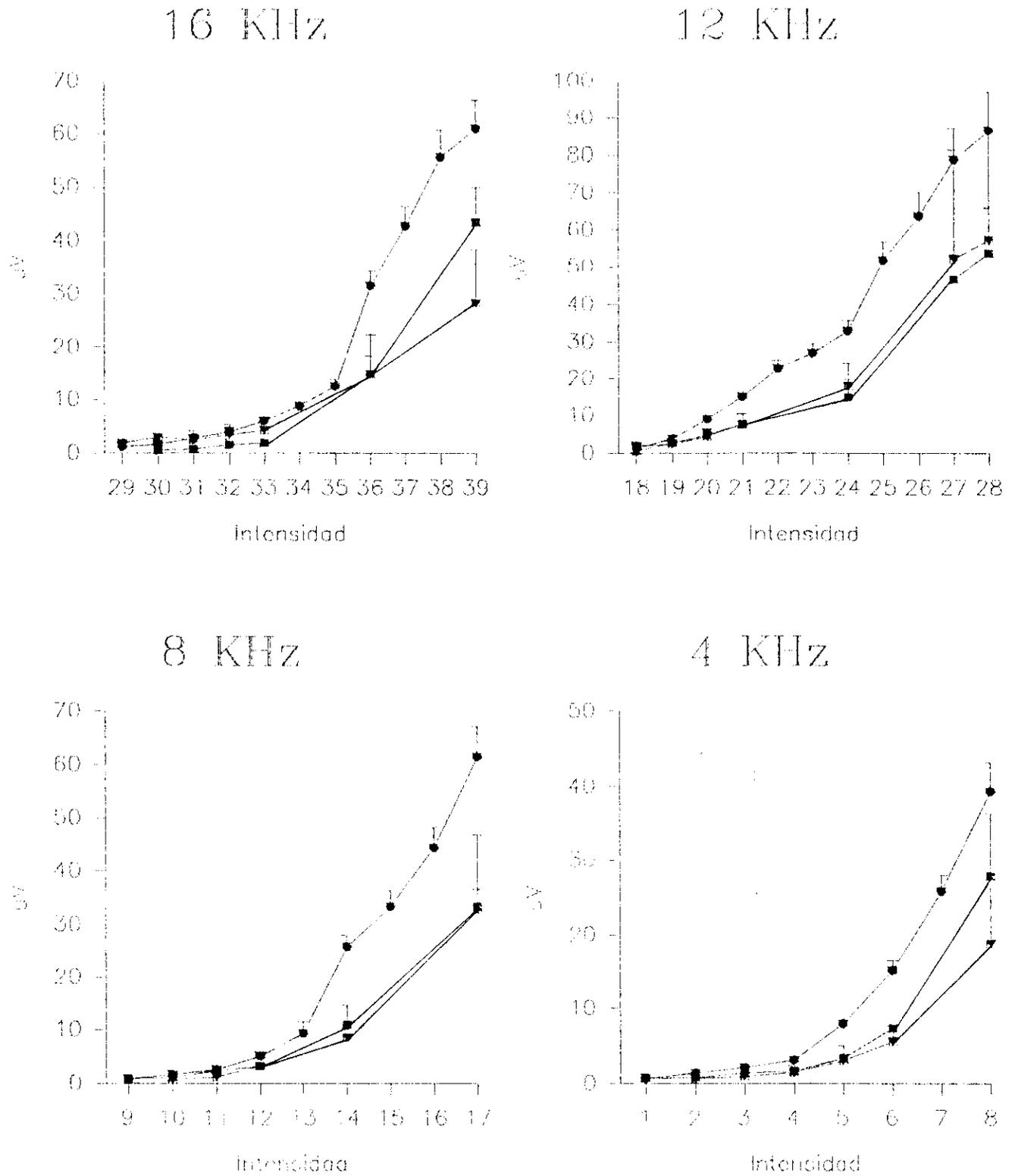


Figura 47: Amplitudes obtenidas en los animales controles (• , N=38) frente a las obtenidas en los grupos que comenzaron el tratamiento a partir del día 9 PN. GRUPO IV (▼ , N=4) y GRUPO XI (■ , N=2)

Tabla 16: Comparación de las medias de los umbrales obtenidos en los animales control frente a los obtenidos en los grupos que comenzaron el tratamiento con GMS a partir del día 9 PN: grupos IV y XI

FRECUENCIA	CONTROL			GRUPO IV				GRUPO XI			
	N	X	DS	N	X	DS	P	N	X	DS	P
16 KHz	28	29,50	0,58	4	30,50	1,91	*	2	30,50	0,71	*
12 KHz	28	18,39	0,50	4	18,25	0,50	NS	2	18,00	0,00	NS
8 KHz	28	9,64	0,78	4	10,25	0,50	NS	2	9,50	0,71	NS
4 KHz	28	1,96	0,96	4	2,00	0,00	NS	2	2,00	1,41	NS

KHz= Kilohercios, N= número de oídos, X= media, DS= desviación standard
P= probabilidad respecto al control (NS= no significativa; * < 0,5; ** < 0,01; *** < 0,001).

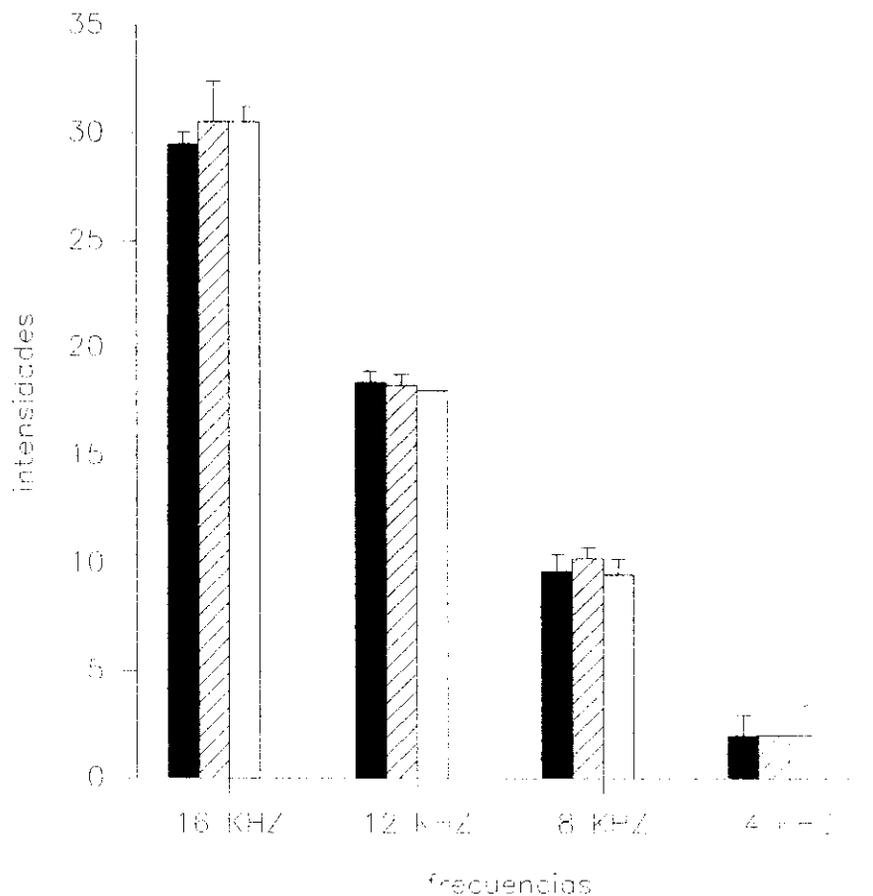


Figura 48: Umbrales (X+DS) del grupo control (■, N= 28) frente a los grupos IV (▨, N= 4) y XI (□, N= 2)

B.6. Efectos clínicos

Dentro de los diversos efectos clínicos observados en nuestros animales, debemos destacar la muerte de 3 animales durante el tratamiento más prolongado (grupo VIII), lo que representa el 50% de la muestra estudiada. En dos de estos animales fue patente la pérdida de peso corporal antes de la muerte. En otros grupos de tratamiento también se produjeron muertes, así: una rata (16%) en el grupo II y otra (16%) en el grupo X en la que se observó pérdida de peso.

En el trabajo de Janssen y cols. (1991) no se hace alusión a la posible muerte de animales debida a la administración de GMS, aunque en un trabajo más reciente (Janssen, 1992) sí se hace referencia a la alta mortalidad encontrada en animales que recibieron ácido kinurénico (400mg/Kg/día). Por lo tanto, podemos suponer que en su estudio de la administración de GMS durante 8 días a razón de 4mg/g/día no se produjeron decesos. Por otro lado, sus condiciones de estabulación (reparto del número de crías por hembra) difieren de las nuestras donde las camadas no fueron separadas de su madre y todas ellas recibieron algún tipo de tratamiento.

Sin embargo, en los animales adultos tratados con GMS (apartado A.) también se pudieron observar decesos debidos al tratamiento, por lo que se puede sugerir que existe una distinta sensibilidad individual al GMS y las ratas usadas por nosotros, aunque pertenecientes a la misma cepa que las utilizadas por Janssen y cols. (1991), fueran más sensibles al tratamiento con GMS. En este marco se puede incluir la observación de convulsiones en uno de los animales, fenómeno característico de la epilepsia y de hecho la administración de

GMS en animales adultos es un modelo epiléptico (Beas-Zarate y cols., 1989).

Otro de los efectos clínicos observados fue el distinto comportamiento electrofisiológico de los dos oídos de un mismo animal tratado con GMS durante el desarrollo (dos animales pertenecientes a los grupos V y X). Aunque en los animales controles se pudieron observar pequeñas diferencias entre ambos oídos, lo normal fue que uno de ellos presentara menor latencia y mayor amplitud que el otro oído. Sin embargo, en estos dos animales los dos oídos presentaron unas diferencias muy marcadas, pudiéndose afirmar que mientras que en uno de los oídos no se logró señal bioeléctrica en el otro esta señal presentó unas características anormales de latencia (elevada) y amplitud (elevada). Además, estos datos electrofisiológicos fueron después avalados por el análisis microscópico de las cócleas. En las cócleas donde no se recogió señal fisiológica, el canal de Rosenthal se encontraba vacío de neuronas, mientras que en las cócleas en las que sí se registró señal, el ganglio espiral coclear presentaba una morfología casi normal, aunque se observaron espacios vacíos en las espiras basales.

Con respecto a estas observaciones se pueden sugerir varias interpretaciones. Una de ellas es la posibilidad de que en estos animales la llegada del GMS por vía sistémica a una de las cócleas y/o el sistema de recaptación y aclaramiento de neurotransmisor de la otra estuvieran parcialmente bloqueados. Por lo tanto la cóclea más irrigada o con menor efectividad del mecanismo de aclaramiento estaría mucho más afectada. Sin embargo, el incremento en la latencia, y la escasa pérdida neuronal nos señalan que sí hubo afectación en la cóclea menos dañada y además que se produjo un fenómeno de compensación ya

que aunque la llegada de la información sonora estaba afectada, esta información era muy clara (elevada amplitud). No obstante, estas hipótesis no se pueden compaginar con la idea de que la población con alta densidad de receptores NMDA, la que se ocupa de la amplitud, es la más afectada en todos los tratamientos.

C. IMPLICACIONES EN LA CLINICA HUMANA

Aunque las principales implicaciones clínicas, es decir: la hipoxia-isquemia, trauma acústico y presbiacusia han sido tratadas ampliamente en el apartado A.5. creemos conveniente recalcar en este epígrafe que se postula que todos los mecanismos allí expuestos son generalmente válidos tanto en estado adulto como en la ontogenia.

Sin embargo hay que tener en cuenta que en el hombre, el sistema nervioso del recién nacido y concretamente la cóclea (Lavigne-Rebillard y cols., 1985; Lavigne-Rebillard y Pujol, 1986, 1987, 1988 y 1990; Pujol y Lavigne-Rebillard, 1985) se encuentra en una fase de diferenciación mucho más avanzada que en los roedores. Así, la cóclea de la rata de 3-4 semanas correspondería a la de un feto humano de seis meses de gestación (Lavigne-Rebillard y cols., 1985; Lavigne-Rebillard y Pujol, 1986, 1987, 1988 y 1990; Pujol y Lavigne-Rebillard, 1985). Además se han encontrado equivalencias entre el desarrollo del cerebro de un niño recién nacido con el de una rata de 12 días de vida (Romijn y cols., 1991). Lo cual explicaría en parte el hecho de que las crías de primates parecen ser poco sensibles a los efectos de altas dosis de GLU (Reynolds y cols., 1971).

No obstante, es sabido que las lesiones de origen hipóxico-isquémico en los recién nacidos pueden dejar secuelas en los procesos de aprendizaje, además de conducir a diferentes grados de sordera que puede ser más o menos transitoria (Cycowicz y cols., 1988; López-Moya, 1986). Por otra parte, se ha demostrado que la administración neonatal de GMS afecta al aprendizaje en las ratas (Kubo y cols., 1993). Por estas razones pensamos que el modelo utilizado por nosotros es

aceptable para simular y estudiar los mecanismos que actúan en la cóclea en los procesos hipóxicos-isquémicos, tanto en adultos como durante el desarrollo.

CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de glutamato monosódico a ratas adultas y durante el desarrollo afectó morfológica y funcionalmente al receptor auditivo. No obstante, los efectos neurotóxicos presentaron diferentes características en adultos y en animales inmaduros.

2. En los animales adultos la lesión funcional se caracterizó por una reducción de la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio auditivo y vacuolizaciones en las fibras sensoriales aferentes de tipo I que contactan con la zona modiolar de las CCIs. Sin embargo, la latencia del potencial de acción compuesto no presentó alteraciones significativas.

3. Los animales adultos que recibieron la administración de glutamato monosódico durante el desarrollo, presentaron una reducción de la amplitud y un incremento de la latencia del potencial de acción compuesto del nervio auditivo. La lesión morfológica se caracterizó por una pérdida de fibras nerviosas aferentes de tipo I y también de neuronas ganglionares.

4. Con respecto a las dosis de glutamato monosódico utilizadas podemos concluir que, en nuestros animales, la dosis de 4mg por gramo fue la más neurotóxica. No obstante, los resultados obtenidos tras la administración de 2mg por gramo de peso durante tres días consecutivos fueron similares a los observados en animales tratados una sóla vez con 4 mg por gramo de peso de glutamato monosódico. La administración de dosis de 2 mg por gramo de peso durante dos días consecutivos produjo menos efectos neurotóxicos que la administración de la misma

dosis durante tres días consecutivos de donde concluimos que puede existir una relación directa dosis/efecto.

5. Las diferencias de resultados obtenidos en relación con el período de administración fueron:

5.a. La administración de glutamato monosódico durante el estadio de maduración sináptica aferente (días 2 al 4 postnatal) produjo una neurotoxicidad severa con aumento de la latencia, disminución de la amplitud e incremento del umbral del PAC, fundamentalmente en frecuencias agudas. Las lesiones morfológicas fueron mayores en las espiras basales y medias.

5.b. La administración de glutamato monosódico durante el estadio de maduración sináptica eferente (días 6 al 9 postnatal) indujo una neurotoxicidad severa con aumento de la latencia y disminución de la amplitud del PAC, inferiores a las observadas en el estadio previo. Asimismo, se observó un aumento del umbral de audición en frecuencias agudas que se correlacionó con las mayores lesiones morfológicas que aparecían en espiras basales y medias.

5.c. La administración de glutamato monosódico durante la etapa del inicio del registro de los potenciales evocados auditivos (días 9 al 12 postnatal) tuvo como efecto una discreta neurotoxicidad que no afectó a la latencia y sólo escasamente a la amplitud del PAC y al umbral de audición en las frecuencias agudas. Morfológicamente se apreciaron escasas lesiones en espiras basales cocleares.

5.d. La administración de glutamato monosódico durante todo el período ontogénico coclear tuvo como resultado una neurotoxicidad muy severa que afectó de forma significativa a todos los parámetros estudiados.

6. Los presentes resultados confirman estudios previos que proponen que el glutamato es el principal neurotransmisor activador coclear de la sinapsis aferente primaria. En concreto, abogan por una segregación de las fibras aferentes tipo I según el número y densidad de los distintos subtipos de receptores glutamatérgicos que expresen en la edad adulta y, además los datos obtenidos de los animales tratados durante el desarrollo indican una posible regulación de la expresión de los distintos subtipos de receptores durante esta etapa.

7. El glutamato administrado a dosis elevadas actúa como un neurotóxico tanto en animales adultos como en desarrollo. Lo que aporta nuevas informaciones sobre el posible papel del glutamato en la fisiopatología de diversos tipos de sordera y concretamente en aquellos en los que fenómenos de hipoxia o isquemia provoquen alteraciones en la liberación de glutamato endógeno o en su recaptación.

BIBLIOGRAFIA

- Allen A.R. y Starr A. (1978). Auditory brain stem potentials in Monkey (*M. Mulata*) and man. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 45: 55-63.
- Altschuler R.A., Sheridan C.E., Horn J.W. y Wenthold R.J. (1989). Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 42: 167-164.
- Andine P., Lehmann A., Eilren K., Wennberg E., Kjeller I., Nielsen T. y Hagberg H. ((1988). The excitatory amino acid antagonist kynurenic acid administered after hypoxic-ischemia in neonatal rats offers neuroprotection. *Neurosci. Lett.* 90: 208-212.
- Anniko M., Thornell L.E. y Wroblewski R. (1988). Recent advances in inner ear cytochemistry. *Microanalytical and immunomorphological investigations.* *Prog. Neurobiol.* 30: 209-269.
- Aran J.M. y Portman C. (1967). L'electrococleograme: Methode et premiers resultatats chez l'enfant. *Revue Laryngol.* 90: 615-634.
- Aran J.M, Dancer A. Dolmazon J.M., Pujol R. y Tran Ba Huy P. (1988). *Physiologie de la Cochlee.* INSERM/ Editions Médicales Internationales, Paris.
- Arima T., Uemura T. y Yamamoto T. (1983). Cytoskeletal organization in the supporting cells of the guinea-pig organ of Corti. *Hear. Res.* 24: 169-175.
- Aruffo C., Ferszt T., Hildebrandt A.B. y Cervos-Navarro J. (1987). Low doses of L-monosodium glutamate promote neuronal growth and differentiation in vitro. *Dev. Neurosci.*, 9: 228-239.
- Ashmore J.F. y Meech R.W. (1986). Ionic basis of membrane potential in outer hair cells of guinea pig cochlea. *Nature* 322: 368-371.
- Ashmore J.F. (1987). A fast motile response in guinea pig outer hair cells: The cellular basis of the cochlear amplifier. *J. Physiol. (London)* 388: 323-347.
- Balazs R., Jorgensen O.S. y Hack N. (1988). N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*, 27: 437-451.
- Baudry M., Arst D., Oliver M. y Lynch G. (1981). Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Dev. Brain Res.* 1: 37-48.
- Beagley H.A. (1965). Acoustic trauma in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 69: 479-495.
- Beal M.F., Ferrante R.J., Swartz K.J. y Kowall N.W. (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci.*, 11: 1649-1659.
- Beas-Zarate C., Schliebs R., Morales-Villagran A. y Feria-Velasco A. (1989). Monosodium L-glutamate-induced convulsions: changes in uptake and release of catecholamines in cerebral cortex and caudate nucleus of adult rats. *Epilepsy Res.* 4: 20-27.
- Békésy G. von (1951). DC-potentials and energy balance of the cochlear partition. *J. Acoust. Soc. Amer.* 23: 576-582.
- Békésy G. von (1960). *Experiments in hearing.* Mc Graw Hill, New York.
- Ben-Ari Y., Tremblay E., Ottersen O.P. y Meldrum B.S. (1980). The role of epileptic activity in hippocampal and remote cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain Res.* 191: 79-97.
- Ben-Ari Y., Tremblay E., Berger M. y Nitecka L. (1984). Kainic acid seizure syndrome and binding sites in developing rats. *Dev. Brain Res.* 14: 284-288.

- Ben-Ari Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-403.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A. y Diemer N.H. (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.
- Bertman L., Welch F.A. y Harp J.R. (1981). Cerebral protective effect of low grade hypothermia. *Anesthesiology* 55: 495-498.
- Billet T.E., Thorne P.R. y Gavin J.B. (1989). The nature and progression of injury in the organ of Corti during ischemia. *Hear. Res.* 41:189-198.
- Bledsoe Jr.S.C., Bobbin R.P. y Chihal D.M. (1981). Kainic acid: An evaluation of each action on cochlear potentials. *Hear. Res.* 4: 109-120.
- Bobbin R.P. y Thompson M.H. (1978). Effects of putative transmitters on afferent cochlear transmission. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 87: 185-190.
- Bobbin R.P. (1979). Glutamate and aspartate mimic the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 34: 389-393.
- Bobbin R.P., Ceasar G. y Fallon M. (1990). Potassium induce release of GABA and other substances from the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 46: 83-94.
- Bobbin R.P., Ceasar G. y Fallon M. (1991). Changing cation levels (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+}) alters the release of glutamate, GABA and other substances from the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 54: 135-141.
- Bock R.M. y Steel K.P. (1984). Use of albino animals for auditory research. *Hear. Res.* 13: 201-202.
- Bosher S.K. y Warren R.L. (1971). A study of the electrochemistry and osmotic relationships of the cochlear fluids in the neonatal rat at the time of the development of the endocochlear potential. *J. Physiol (London)* 212: 739-761.
- Brown M.C., Nuttall A.L. y Masta R.Y. (1983). Intracellular recordings from cochlear hair cells: Effects of stimulation of the crossed olivocochlear efferents. *Science Wash. D.C.* 222: 69-72.
- Brown M.C. y Nuttall A.L. (1984). Efferent control of cochlear inner hair cell responses in the guinea pig. *J. Physiol. (London)* 354: 625-646.
- Brown M.C. (1987) Morphology of labeled afferent fibers in guinea pig cochlea. *J. Comp. Neurol.* 260:591-604.
- Brownell W.E. (1984). Microscopic observation of cochlear hair cell motility. *Scann. Electron Microsc.* 3: 1401-1406.
- Brownell W.E., Bader C.R., Bertrand D. y De Ribaupierre Y. (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science Wash. D.C.* 277: 194-196.
- Busto R., Globus M.Y.T., Dietrich E., Martínez E., Valdés I., y Ginsberg M.D. (1989). Effect of mild hypothermia on ischemia-induce release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20: 904-910.
- Cabezudo L. (1978). The ultrastructure of the basilar membrane in the cat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 86: 160-175.
- Cajal S.R. (1919). Acción neurotrópica de los epitelios. *Trab. Lab. Invest. Biol. U. Madrid.* 17: 181-228.

- Campana H. y Suburo A. (1986). The effect of kainic acid on the developing chick retina. *Dev. Brain Res.* 26: 315-317.
- Campochario P. y Coyle J.T. (1978). Ontogenic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 2025-2029.
- Carrier E., Abonnenc, M. y Pujol R. (1975). Maturation des réponses unitaires à la stimulation tonel dans le ferf cochléaire du chaton. *J. Physiol (Paris)*. 70: 129-138.
- Carrier E. y Pujol R. (1978). Early effects of efferent stimulation on the kitten cochlea. *Neurosci. Lett.* 3: 21-27.
- Carrier E., Lenoir M. y Pujol R. (1979). Development of cochlear frequency selectivity tested by compound action potential tuning curves. *Hear. Res.* 1: 197-201.
- Carney P.R. y Silver J. (1983). Studies of cell migration and axon guidance in the developing distal auditory system of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 215: 359-369.
- Carrasco V.N., Prazma J., Faber J.E., Triana R.J. y Pillsbury H.C. (1990). Cochlear microcirculation. Effect of adrenergic agonists on arteriole diameter. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 116: 411-417.
- Comis S.D. y Leng G. (1979). Action of putative neurotransmitters in the guinea pig cochlea. *Exp. Brain Res.* 36: 119-128.
- Corey D.P. y Hudspeth A.J. (1979). Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature (London)* 281: 675-677.
- Corti A. (1851). Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères. *Z. Wis. Zool.*: 109-169.
- Cousillas H., Cole K.S. y Johnstone B.M. (1988). Effect of spider venom on cochlear nerve activity consistent with glutamatergic transmission of hair cell afferent dendrite synapse. *Hear Res.* 36: 213-220.
- Coyle J.T. (1983). Neurotoxic action of kainic acid. *J. Neurochem.* 4: 1-11.
- Crowley D.E. y Hepp-Reymond M.C. (1966). Development of cochlear function in the ear of the infant rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 62: 427-432.
- Cycowicz Y., Schmucl M., Freeman S., Wanszelbaum A. y Shomer H. (1988). Perinatal hypoxia and auditory brainstem response thresholds: no evidence of permanent hearing loss. *Hear. Res.* 33: 239-244.
- Chambille I. y Serviere J. (1993). Neurotoxic effects of neonatal injection of monosodium L-glutamate (L-MSG) on the retinal ganglion cell layer of the golden hamster: anatomical and functional consequences on the circadian system. *J. Comp. Neurol.* 338: 67-82.
- Chandler J.P. (1984). Light and electron microscopic study of the basilar papilla of the duck, *Anas platyrhynchos*. II. Embryonic development. *J. Comp. Neurol.* 22: 523-542.
- Choi D.W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7: 369-379.
- Choi D.W. y Rothman S.M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 171-182.
- Dallos P., Schoeny Z.G. y Cheatham M.A. (1972). Cochlear summing potentials: descriptive aspects. *Acta Otolaryngol. Supl.* 302: 1-46.

- Dallos P. (1986). Neurobiology of cochlear inner and outer hair cells: intracellular recordings. *Hear. Res.* 22: 185-198.
- Dallos P. (1991). Auditory Physiology and Perception. En: *Advances in Biosciences*. Cazals, Demany y Horner (eds). Pergamon Press.
- Dancer A. y Francke R. (1982). Intracochlear sound pressure measurements in guinea pigs. *Hear. Res.* 2: 191-206.
- Dancer A. (1988). Biomécanique de l'Audition. En: *Physiologie de la Cochlée*, p. 27-73. Aran J.M., Dancer A, Dolmazon J.M., Pujol R. y Tran Ba Huy P. (Eds). INSERM/Editions Médicales Internationales, Paris.
- Davis H., Gernandt B.E. y Riesco-MacClure J.S. (1950). Threshold of action potentials in ear of guinea pig. *J. Neurophysiol.* 13: 73-87.
- Davis H. y Zerlin S. (1966). Acoustic relations of the human vertex potential. *J. Acoustic Soc.* 39: 109-116.
- Davis H. (1983). An active process in cochlear resonance. *Hear. Res.* 9: 79-90.
- Drejer J., Benveniste H., Diemer N.H. y Schousboe A. (1985). Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J. Neurochem* 45: 145-151.
- Drescher M.J., Drescher D.G. y Medina J.E. (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.
- Dudek S.M. y Bear M.F. (1989). A biochemical correlate of the critical period for synaptic modification in the visual cortex. *Science*, 246: 673-675.
- Duhaime A.C. y Ross D.T. (1990). Degeneration of hippocampal CA1 neurons following transient ischemia due to raised intracranial pressure: evidence for a temperature-dependent excitotoxic process. *Brain Res.* 512: 169-174.
- Egebjerg J., Bettler B., Hermans-Borgmeyer Y. y Heinemann S. (1991). Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351: 745-748.
- Ehrenberger K. y Felix D. (1991). Glutamate receptors in afferent cochlear neurotransmission in guinea pigs. *Hear. Res.* 52: 73-80.
- Eybalin M. y Pujol R. (1983). A radioautographic study of [3H]-L-glutamate and [3H]-L-glutamine uptake in the guinea pig cochlea. *Neuroscience* 9: 863-871.
- Eybalin M., Rebillard G., Jarry T. y Cupo A. (1987). Effect of noise level on the met-enkephalin content of guinea pig cochlea. *Brain Res.* 418: 189-192.
- Eybalin M. y Pujol R. (1989). Cochlear neuroactive substances. *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 246: 228-234.
- Eybalin M., Renard N., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. y Pujol R. (1991). Ultrastructural immunolocalization of glutamate in the guinea pig organ of Corti (abstr.). In: *Proc. Ann Meet. Assoc. Res. Otolaryngol.* 14th. p.18.
- Eybalin M. (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 73: 309-373.
- Eybalin M., Charachon G. y Renard N. dopaminergic lateral efferent innervation of the guinea-pig cochlea: immunoelectron microscopy of catecholamine-synthesizing enzymes and effect of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 54: 133-142.

- Fagg G.E. y Foster A.C. (1983). Amino acid transmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9: 701-719.
- Felix D. y Ehrenberger K. (1990). A microintophoretic study of the role of excitatory amino acids at the afferent synapses of mammalian inner hair cells. *Eur. Arch. Oto-rhyno-laryngol.* 248: 1-3.
- Fernández C. e Hinojosa R. (1974). Postnatal development of endocochlear potential and stria vascularis in the cat. *Acta Otolaryngol.* 78: 173-186.
- Fex J. (1973). Neuropharmacology and potentials of the inner ear. En: *Basic Mechanisms of Hearing*, edited by Moller. N.Y.: Academic Press. p. 377-421.
- Fex J. y Wenthold R.J. (1976). Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in the cochlea and the cochlear nucleus of the guinea pig. *Brain Res.* 109: 575-585.
- Fex J., Kachar B., Rubio J.A., Parakkal M.N. y Altschuler R.A. (1985). Glutaminase-like immunoreactivity in the organ of Corti of guinea pig. *Hear. Res.* 17: 101-113.
- Flock A., Flock B. y Murray E. (1977). Studies on the sensory hairs of receptor cells in the inner ear. *Acta Otolaryngol.* 83: 85-91.
- Flock A., Bretscher A. y Weber K. (1982). Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells. *Hear. Res.* 7: 75-89.
- Flock A., Flock B. y Ulfendahl M. (1986). Mechanisms of movement in outer hair cells and a possible structural basis. *Arch. Otorhinolaryngol.* 243: 83-90.
- Fonnum F. (1985). Determination of transmitter aminoacid turnover. *Neuromethods. Aminoacid*, edited by A.A. Boulton, G.B. Baker and J.D. Wood. Clifton, NJ: Human Press. Inc, vol 3, p. 201-237.
- Fromm B., Nylem C.O. y Zotterman Y. (1936). Studies in the mechanism of the Weber and Bray effect. *Acta Otolaryngol.* 33: 477-486.
- Fujimoto S., Yamamoto K., Hayabuchi I y Yoshizuka M. (1981). Scanning and transmission electron microscope studies on the organ of Corti and stria vascularis in human fetal cochlear ducts. *Arch. Histol. Jap.* 44: 223-235.
- Furness D.N. y Hackney C.M. (1986). High-resolution scanning-electron microscopy of stereocilia using the osmium-thiocarbohydrazide coating technique. *Hear. Res.* 21: 243-249.
- Garthwaite G. y Garthwaite J. (1984). Differential sensitivity of rat cerebellar cells in vitro to the neurotoxic effects of excitatory amino acid analogs. *Neurosci. Lett.* 48:361-367.
- Garthwaite G. y Garthwaite J. (1986). In vitro neurotoxicity of excitatory amino acid analogs during cerebellar development. *Neurosci.* 17: 755-767.
- Gill R., Foster A.C. y Woodruff G.N. (1987). Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J. Neurosci.* 7: 3343-3349.
- Gil-Loyzaga P. y Merchán M.A. (1983) Histogénesis y desarrollo del receptor auditivo. En: *El oído interno. Ultraestructura, embriogénesis y algunos aspectos patológicos*, Cap III, P 85-133. Editor: M.Z. Merchán Cifuentes. Ediciones Universidad de Salamanca-Universidad de Alicante. Salamanca.
- Gil-Loyzaga P., Gabrion J. y Uziel A. (1985a). Lectins demonstrate the presence of carbohydrates in the tectorial membrane of the mammalian cochlea. *Hear Res.* 20: 1-8.

- Gil-Loyzaga P., Uziel A. y Merchán-Pérez A. (1985b). New aspects on the composition of the tectorial membrane. Abstracts of the XXII Workshop on Inner Ear Biology. Würzburg, Germany.
- Gil-Loyzaga P., Merchán M., Collía F. (1987). The ultrastructure of the spiral ligament of the rodent cochlea. *Acta Microscopica* 10/3: 399-409.
- Gil-Loyzaga P. y Brownell W.E. (1988). Wheat germ agglutinin and Helix pomatia lectin binding on cochlear hair cells. *Hear. Res.* 34: 149-156.
- Gil-Loyzaga P. y Pujol R. (1988). Synaptophysin in the developing cochlea. *Int. J. Devl. Neurosci.* 6: 155-160.
- Gil-Loyzaga P., Cupo A. y Eybalin M. (1988). Met-enkephalin and Met-enkephalin Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ immunofluorescence in the developing guinea pig organ of Corti. *Dev. Brain Res.* 42: 142-145.
- Gil-Loyzaga P. y Parés-Herbutte N. (1989). HPLC detection of dopamine and noradrenaline in the cochlea of adult and developing rats. *Dev. Brain Res.* 48: 157-160.
- Gil-Loyzaga P., y Pujol R. (1990a). Neurotoxicity of kainic acid in the rat cochlea during early developmental stages. *Eur. Arch. Oto-rhino-laryngol.* 248: 40-48.
- Gil-Loyzaga P., y Pujol R. (1990b). Kainic acid toxicity on cochlear type I neurons. En: *Proceedings of the Fourteenth World Congress of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery Madrid 1989*. Editores: Sacristan T., Alvarez-Vicent J.J., Antolí-Cancela y Rubio L. Amsterdam: Kluger p. 37-39.
- Gil-Loyzaga P., Gabrion J., Remezal M., Nguyen Than Dao B. y Uziel A. (1991). Incorporation of D-[3H]-glucosamine and L-[3H]-fucose into the developing rat cochlea. *Hear. Res.* 57: 38-44.
- Gil-Loyzaga P., Fernández-Mateos P., Vicente-Torres M.A., Remezal M., Cousillas H., Arce A. y Esquifino A. (1993a). Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism. *Brain Res.* 623: 177-180.
- Gil-Loyzaga P., Hernández-Ortiz M.J., Rodríguez-Benito T. y Lasso de la Vega M. (1993b). Diltiazem protects against neurotoxicity induced by excitotoxic amino acids on cochlear afferent fibers. *ORL* 55: 211-215.
- Gil-Loyzaga P. y Pujol R. (1993). Fisiología de la audición. En: *Fisiología Humana*, cap 18, p. 294-327. Tresguerres J.A.F. (Ed). Interamerican-McGraw-Hill, Madrid.
- Gil-Loyzaga P., Vicente-Torres M.A., Fernández-Mateos P., Arce A., Esquifino A. (1994). Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise. *Hear. Res.* 79: 178-182.
- Gil-Loyzaga P. (1995). Neurotransmitters of the olivo-cochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 115: 222-226.
- Ginzberg R.D. y Morest D.K. (1984). Fine structure of cochlear innervation in the cat. *Hear. Res.* 14: 109-127.
- Gulley R.L., Fex J. y Wenthold R.J. (1979). Uptake of putative transmitters in the organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* 88: 177-182.
- Hajós F., Garthwaite G. y Garthwaite J. (1986). Reversible and irreversible neuronal damage caused by excitatory amino acid analogs in rat cerebellar slices. *Neuroscience* 18: 417-436.
- Hawkins J.E. (1971). The role of vasoconstriction in noise-induced hearing-loss. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 80: 903-913.

- Helmholtz H. (1863). Die lehre von der tonempfindungen als physiologische grundlage für die theorie der musik, 1^a ed. Brunswick, Germany, Vieweg-Verlag.
- Henley C.M. y Rybak L.P. (1995). Ototoxicity in developing mammals. Brain Res. Rev. 20: 68-90.
- Hensen V. (1863). Zur Morphologie der Shnecke des Menschen un der Saugetiere. Z. Wiss. Zool. 13: 481-502.
- Hernández-Martínez E. (1993). Efecto protector de los antagonistas del calcio frente a las lesiones cocleares inducidas por ácido kainico. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas U.C.M.
- Hernández-Ortíz M.J. (1992). Estudio morfológico de las lesiones inducidas por aminoácidos excitotóxicos en la cóclea de la rata. Tesis doctoral. Facultad de Medicina U.A.M. (Madrid).
- Hollmann M. y Heinemann S. (1994). Cloned glutamate receptors. Annu. Rev. Neurosci. 17: 31-108.
- Holmes G.L y Thompson J.L. (1988). Effects of kainic acid on seizure susceptibility in the developing brain. Devl. Brain Res. 39: 51-59.
- Hoffman D.W. (1986). Opioid mechanisms in the inner ear. Neurobiology of Hearing: The Cochlea, edited by R.A. Altschuler, R.P. Bobbin and D.W. Hoffman. p. 371-382.
- Hoffman D.W., Jones-King K.L. y Altschuler R.A. (1988). Putative neurotransmitters in the rat cochlea at several ages. Brain Res. 460: 366-368.
- Housley G.D. y Ashmore J.F. (1991). Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. Proc. R. Soc. Lond. ser. B 244: 161-167.
- Howard J. y Hudspeth A.J. (1988). Compliance of hair bundle associated with gating of the mechanoelectric transducer channels in the bullfrog's saccular hair cell. Neuron 1: 189-199.
- Huangfu M.S. y Saunders J.C. (1983). Auditory development in the mouse: Structural maturation of the middle ear. J. Morphol. 176: 249-259.
- Hucho F. (1986). Neurochemistry. Academic Press, San Diego
- Hudspeth A.J. (1982). Extracellular current flow and the site of transduction by vertebrate hair cells. J. Neurosci. 2: 1-10.
- Hudspeth A.J. (1986). The ionic channels of a vertebrate hair cell. Hear. Res. 22: 21-27.
- Hudspeth A.J. (1989). How the ear's works work. Nature 341: 397-404.
- Hunter-Duvar I.M. (1978). The auditory brainstem. A review of the structure and function of auditory brainstem processing mechanisms. Progress in Sensory Physiology, vol. 7. Ottoson D. (Ed). Springer-Verlag, Berlin.
- Ikonomidou C., Mosinger J.L., Shahid Sales K., Labruyere J. y Olney J.W. (1989). Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. J. Neurosci. 9: 2809-2818.
- Iurato S. (1962). Efferent fibers to the sensory cells of Corti's organ. Exp. Cell. Res. 27: 162-164.

- Jannsen R., Schweitzer L. y Jannsen K.F. (1991). Glutamate neurotoxicity in the developing rat cochlea: Physiological and morphological approaches. *Brain Res.* 552: 255-264.
- Jannsen R. (1992). Glutamate neurotoxicity in the developing rat cochlea is antagonized by kinurenic acid and MK-801. *Brain Res.* 590: 201-206.
- Jenison G.L., Bobbin R.P. y Thalman R. (1985). Potassium-induced release of endogenous amino acids in the guinea pig cochlea. *J. Neurochem.* 44: 1845-1853.
- Jenison G.L., Winbery S. y Bobbin R.P. (1986). Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D- aspartate, excitatory amino acids agonists, on guinea pig cochlear potentials. *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol.* 84: 385-389.
- Jewett D.L. (1970). Volume conducted potentials in response to auditory stimuli as detected by averaging the cat EED. *Clin. and Neurophysiol.* 28: 609-618.
- Jewett D.L. y Romano H.N. (1972). Neonatal development of auditory system potentials average from the scalp of the rat and cat. *Brain Res.* 101-115.
- Johstone B.M., Robertson D. y Cody A.R. (1982). Basilar membrane motion and hearing loss. En: *Hearing and hearing prophylaxis. Scand. Audiol. Suppl.* 16: 89-93.
- Jones D.G. y Eslami H. (1983). An ultrastructural study of the development of afferent and efferent synapses on outer hair cells of the guinea pig organ of Corti. *Cell Tissue Res.* 231: 533-549.
- Juiz J.M., Rueda J. y Merchán J.A. (1988). Reversible damage to the nerve fibers in the organ of Corti after surgical opening of the cochlea in the rat. *Acta Otolaryngol (Stock)* 106: 29-33.
- Juiz J.M., Rueda J.A., Merchán J.A. y Sala M.L. (1989). The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear. Res.* 40: 65-74.
- Kachar B., Brownell W.E., Altschuler R. y Fex J. (1986). Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322: 365-367.
- Kaltenbach J.A. y Falzarano P.R. (1994). Postnatal development of the hamster cochlea. I. Growth of hair cells and the organ of Corti. *J. Comp. Neurol.* 340: 87-97.
- Keidel W.D. (1969). Neuere Ergebnisse der akustischen informationsverarbeitung. *Erg. Exp. Med.* 3: 167-193.
- Khanna S.M. y Leonard D.G.B. (1982). Basilar membrane tuning in the cat cochlea. *Science* 215: 305-306.
- Kimura R. (1965). Hairs of the cochlear sensory cells and their attachments to the tectorial membrane. *Acta Otolaryngol.* 61: 55-72.
- Kleinschmidt A., Bear M.F. y Singer W. (1987). Blockade of NMDA receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten striate cortex. *Science* 238: 355-358.
- Klinke R. y Oertel W. (1977a). Evidence that GABA is not the afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 28: 311-314.
- Klinke R. y Oertel W. (1977b). Amino acids. Putative afferent transmitter in the cochlea. *Exp. Brain Res.* 30: 145-148.

- Knowlton V.Y. (1967). Correlation of the development of membranous and bony labyrinths, acoustic ganglia, nerves and brain centers of the chick embryo. *J. Morphol.* 121: 179-208.
- Kochhar A., Zivin J.A., Lyden P.D. y Mazzarella V. (1988). Glutamate antagonist therapy reduces neurologic deficits produced by focal central nervous system ischemia. *Arch. Neurol.* 45: 148-154.
- Kolmer W. (1927). *Handbuch der Mikr. Ant. d. Menschen*, vol III. Von Möllendorf (Ed). Thieme, Stuttgart.
- Kubo T., Kohira R., Okano T. y Ishikawa K. (1993). Neonatal glutamate can destroy the hippocampal CA1 structure and impair discrimination learning in rats. *Brain Res.* 616: 311-314.
- Kuriyama H, Jenkins O.H., Wenthold R.J. y Altschuler (1992). Glutamate receptor subunits in the rat cochlea (Abstr). *Proc. Sump. Mol. Biol. Hearing and Deafness La Jolla CA* p. 69.
- Kusakari J., Arakawa E., Rokugo M, Ohyama K. y Inamura N. (1984). Effect of kainic acid upon N1 latency. *Laryngoscope* 94: 1365-1369.
- Kvale I., Fosse V.M. y Fonnum F. (1983). Development of neurotransmitter parameters in lateral geniculate body, superior colliculus and visual cortex of the albino rat. *Dev. Brain. Res.* 7: 137-145.
- Lavigne-Rebillard M., Dechesne C., Pujol R., Sans A. y Escudero P. (1985). Développement de l'oreille interne pendant le premier trimestre de grossesse. différenciation des cellules sensorielles et formation des premières synapses. *Ann. Oto-Laryngol (Paris)* 102: 493-498.
- Lavigne-Rebillard M. y Pujol R. (1986). Development of auditory hair cell surface in human fetuses. A scanning electron microscopy study. *Anat. Embryol.* 174:369-377.
- Lavigne-Rebillard M. y Pujol R. (1987). Surface aspects of the developing human organ of Corti. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 436: 43-50.
- Lavigne-Rebillard M. y Pujol R. (1988). Hair cell innervation in the fetal human cochlea. *Acta Otolaryngol.* 105: 398-402.
- Lavigne-Rebillard M. y Pujol R. (1990). Auditory hair cells in fetuses: synaptogenesis and ciliogenesis. *J. Electron. Microsc. Techn.* 15: 115-122.
- Lavsdowski M.D. (1874). The histology of the terminal apparatus of the cochlear nerve. St. Petesburg. Citado en : *The organ of Corti*. Vinnidow Y.A. y Titova L.K.. Cosultants Bureau, New York, 1964.
- Leake A.P., Russell L.S. y Hradek G.T. (1993). Spatial organization of inner hair cell synapses and cochlear spiral ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* 333: 257-270.
- Lefebvre P.P., Weber T., Leprince P., Rigo J.M., Delrée P., Rogister B. y 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., Shneron A. y Pujol R. (1980a). Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat. Embryol.* 160: 253-262.
- Lenoir M., Shneron A. y Pujol R. (1980b). Cochlear receptor development in the rat. *Hear. Res.* 29: 265-271.
- Lieberman M.C. (1980). Efferent synapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: an electron microscopic study of serial sections. *Hear. Res.* 3: 45-63.

- Lieberman M.C. (1982a). Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216: 1239-1241.
- Lieberman M.C. (1982b). The cochlear frequency map for the cat: Labeling auditory-nerve fibers of known characteristic frequency. *J. Acoust. Soc. Am.* 72: 1441-1449.
- Lieberman M.C. y Oliver M.E. (1984). Morphology of intracellularly labeled neurons of the auditory nerve: correlation with functional properties. *J. Comp. Neurol.* 223: 163-176.
- Littman T, Bobbin R.P., Fallon M. y Puel J.L. (1989). The quinoxalinediones DNQX, CNQX and two related congeners suppress hair cell-to-auditory nerve transmission. *Hear. Res.* 40: 45-54.
- López-Moya J.J. (1986). Utilización de los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral en el seguimiento y valoración de tres poblaciones de alto riesgo de déficit auditivo (sufrimiento fetal, prenaturidad y meningitis). Tesis doctoral, Facultad de Medicina, U.C.M. (Madrid).
- López-Moya J.J. (1992). Potenciales evocados auditivos. Introducción a su conocimiento y valoración clínica. Ed Ciencia 3, S.A.
- Lucas D.R. y Newhouse J.R. (1957). The toxic effects of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *A.M.A. Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.
- Ludeña M.C., Merchán J.A., Merchán M.A., Colom J. y Gil-Loyzaga P. (1980). *Morf. Norm. Patol.* 4: 447.
- Marcus D.C. (1986). Nonsensory electrophysiology of the cochlea: Stria vascularis. En: *Neurobiology of Hearing: The Cochlea*. Altschuler R.A., Bobbin R.P. y Hoffman D.W. (Eds). Raven Press p. 123-137.
- Mattson M.P., Lee R.E., Adams M.E., Guthrie P.B. y Kater S.B. (1988). Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: a role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron* 1: 865-876.
- Mayer M.L. y Westbrook G.L. (1987). Cellular mechanisms underlying excitotoxicity. *Trends Neurosci.* 10: 59-61.
- McBain C.J. y Mayer M.L. (1994). N-Methyl-D-Aspartic acid receptor structure and function. *Physiol. Rev.* 74: 723-760.
- McDonald J.W., Silverstein F.S. y Johnston M.V. (1987). MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage. *Eur. J. Pharmacol.* 140: 359-361.
- McDonald J.W., Silverstein F.S. y Johnston M.V. (1988). Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 482: 155-158.
- McDonald J.W. y Johnston M.V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino-acid during central nervous system development. *Brain Res. Rev.* 15: 41-70.
- Medina J.E. y Drescher D.G. (1981). The amino-acid content of perilymph and cerebrospinal fluid from guinea-pigs and the effect of noise on the amino-acid composition of perilymph. *Neuroscience* 6: 505-509.
- Melamed B., Norris C., Bryant G. y Guth P.S. (1982). Amino acid content of guinea pig perilymph collected under conditions of quiet or sound stimulation. *Hear. Res.* 7: 13-18.
- Meldrum B. y Garthwaite J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS* 11: 379-387.

- Meldrum B. (1993). Amino acids as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 18: 293-314.
- Menoyo-Bueno A, Poch-Broto J., Merchán-Pérez A. y Gil-Loyzaga P. (1990). Effects of perinatal hypothyroidism in the carbohydrate composition of cochlear tectorial membrane. *Hear. Res.* 45: 151-156.
- Merchán M.A., Merchán J.A. y Ludeña M.D. (1980). Morphology of Hensen's cells. *J. Ant.* 131: 519-523.
- Merchán J.A., Gil-Loyzaga P., Merchán M.A. y Ludeña M.D. (1982). Maduración ultraestructural del órgano de Kölliker. En: *Trabajos de Anatomía Patológica e Histología*. Spax. Barcelona.
- Merchán M.A. y Ludeña M.D. (1983). Ultraestructura del oído interno. En: *El oído interno. Ultraestructura, embriogénesis y algunos aspectos patológicos*. Editor: M.A. Merchán Cifuentes. Ediciones Universidad de Salamanca-Universidad de Alicante. Salamanca.
- Merchán-Pérez A., Gil-Loyzaga P. y Eybalin M. (1990a). Immunocytochemical detection of calcitonin gene-related peptide in the postnatal developing rat cochlea. *Int. J. Dev. Neuroscience* 8: 603-612.
- Merchán-Pérez A., Gil-Loyzaga P. y Eybalin M. (1990b). Postnatal development of CGRP-immunoreactive fibers in the rat cochlea. En: *Proc. World Congress Otorhinolaryngol. Head Neck surg. XIV*. (Madrid, España) 1989, p. 81-83. Dir: Sacristán T., Alvarez-Vicent J.J., Antolí-Candela F. y Rubio L. Kluger and Gheini Publ. (eds), Amsterdam.
- Merchán-Pérez A., Gil-Loyzaga P., Eybalin M. (1990c). Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal development rat cochlea. *Int. J. Dev. Neuroscience* 8: 613-620.
- Merchán-Pérez A., Gil-Loyzaga P. y Eybalin M. (1990d). Ontogeny of GAD- and GABA immunoreactivities in the rat cochlea. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 248: 4-7.
- Merchán-Pérez A., López-Sánchez J.G., Valderrama F., Ibáñez M.A., Bartolomé M.V. y Gil-Loyzaga P. (1992). Effects of perinatal deafness on synaptophysin expression in the cochlear nuclei of the rat. *5th Int. Congr. on Cell Biol.*, Madrid, 1992, p.339.
- Merchán-Pérez A., Gil-Loyzaga P., López-Sánchez J.G., Eybalin M., Valderrama F.J. (1993). Ontogeny of γ -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. y Bartolomé M.V. (1994). Choline-acyltransferase-like immunoreactivity in the organ of Corti of the rat during postnatal development. *Dev. Brain Res.* 82: 29-34.
- Misrahy F.A., Shinabarger E.V. y Arnold J.E. (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.
- Moller A.R. (1974). The acoustic middle ear muscle reflex. En: *Handbook of Sensory Physiology*, p. 491- 517. Keidel W.C y Neff W.D. (eds). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Monaghan D.T., Bridges R.J. y Cotman C.W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365-402.
- Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B. y Seeburg P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-1221.

- Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N. y Nakanishi S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37.
- Müller M. (1991). Frequency representation in the rat cochlear. *Hear. Res.* 51: 247-254.
- Nadler J.V., Evenson D.A. y Cuthbertson G.J. (1981). Evidence from lesion studies for epileptogenic and non-epileptogenic neurotoxic interactions between kainic acid and excitatory innervation. *Brain Res.* 205: 405-410.
- Nadol J.B. y Burgess B. (1985). A study of postmortem autolysis in the human organ of Corti. *J. Comp. Neurol.* 237: 333-342.
- Nicholls D.G. (1993). The glutamatergic nerve terminal. *Eur. J. Biochem.* 212: 613-631.
- Nielsen D.W. y Slepecky N. (1986). Sterocilia. En: *Neurobiology of hearing: The Cochlea*. Altschuler R.A., Bobbin R.P. y Hoffman D.W. (Eds). Raven Press P. 23-44.
- Norris C.H. y Guth P.S. (1974). The release of acetylcholine (ACh) by the cross olivo-cochlear bundle (COCB). *Acta Otolaryngol.* 77: 318-326.
- Nuttall A.L. (1986). Physiology of hair cells. En: *Neurobiology of Hearing: The Cochlea*, p 47-75. Altschuler R.A., Bobbin R.P. y Hoffman D.W. (eds). Raven Press, New York.
- Okamoto A., Tamura T., Yohoyama K., Kobayashi N. y Hasegawa M. (1990). Effect of loud sound exposure on the cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol.* 109: 378-382.
- Olney J.W. (1969). Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- Olney J.W. y Price M.T. (1980). Neuroendocrine interactions of excitatory and inhibitory amino acids. *Brain Res. Bull.* 5: 361-380.
- Olney J.W. (1983). Excitotoxins: and overview. In K. Fuxe P. Roberts y R. Schwarcz (eds). *Excitotoxins*, Macmillan, London p 82-96.
- Olney J.W., Price M.T., Samson L. y Labruyere (1986). The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 65: 65-71.
- Olney J.W., Ikonomidou C., Mosinger J.L y Frierdrich G. (1989). MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain. *J. Neurosci.* 9: 1701-1704.
- Osborne M.P., Comis S.D. y Pickles J.O. (1984). Morphology and cross-linkage of stereocilia in the guinea pig labyrinth examined without the use of osmium as a fixative. *Cell Tissue Res.* 237: 43-48.
- Ozawa S., Iino M. y Tsuzuki K. (1991). Two types of kainate response in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 66: 2-11.
- Pellegrini-Giampietro D.E., Cherici G., Alesiani M., Carla V. y 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.
- Pellegrini-Giampietro D.E., Bennett M.V. y Zukin R.S. (1992). Are Ca²⁺-permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain?. *Neurosci. Lett.* 144: 65-69.
- Perkins R.E. y Morest D.K. (1975). A study of innervation patterns of cats and rats with Golgi method and Nomarski optics. *J. Comp. Neurol.* 163: 129-158.

- Petralia R.S. y Wenthold R.J. (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318: 329-354.
- Phelix C.F. y Hartle D.K. (1990). Systemic glutamate induces degeneration of a subpopulation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat area postrema. *Brain Res.* 516: 335-340.
- Pickles J.O. (1982). An introduction to the physiology of hearing. Academic Press, London.
- Pickles J.O., Comis S.D. y Osborne M.P. (1984). Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear. Res.* 15: 103-112.
- Picton T.W., Hillyard S.A., Krausz H.I. y Galmbos R. (1974). Human auditory evoked potentials I Evaluation of components. *Electroencephal. Clinic. Neurophysiol* 36: 415-424.
- Pin J.P., Van-Vliet B.J. y Bockaert J. (1989). Complex interaction between quisqualate and kainate receptors as revealed by GABA release from striatal neurons in primary culture. *Eur. J. Pharmacol.* 172: 81-91.
- Plinkert P.K., Zenner H.P. y Heilbronn E. (1991). A nicotinic acetylcholin receptor-like α -bungarotoxin-binding site on outer hair cells. *Hear. Res.* 53:123-130.
- Poch-Broto J. (1983). Intoxicaciones laberínticas por fármacos. En: El oído interno. Ultraestructura, embriogénesis y algunos aspectos patológicos, Cap IV, p. 134-148. Editor: M.Z. Merchán Cifuentes. Ediciones Universidad de Salamanca-Universidad de Alicante. Salamanca.
- Poch-Broto J. y Rodríguez-Gómez F. (1990). Spontaneous acoustic emissions. Its behavior after contralateral stimulation. En: Inner Ear Pathobiology. Eds Ciges M. y Campos A. *Adv. ORL Bases Karger* 45: 206-213.
- Puel J.L., Bobbin R.P. y Fallon M. (1988) The active process is affected first by intense sound exposure. *Hear. Res.* 37: 53-64.
- Puel J.L., Bledsoe S.C., Bobbin R.P., Ceasar G. y Fallon M. (1989a). Comparative actions of salicylate on the amphibian lateral line and guinea pig cochlea. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol.* 93: 73-80.
- Puel J.L., Bobbin R.P. y Fallon M. (1989b). Suppression of auditory nerve activity in the guinea pig cochlea by 1-(p-bromo-benzoyl)-piperazine-2,3-dicarboxylic acid. *Brain Res.* 487: 9-15.
- Puel J.L., Ladrech S., Chabert R., Pujol R. y Eybalin M. (1991a). Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 51: 255-264.
- Puel J.L., Pujol R., Ladrech S. y Eybalin M. (1991b). α -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. y Pujol R. (1992). Selective glutamate antagonists block the excitotoxicity caused by either glutamate agonists or by ischemia. En: *Advances in Biosciences: Auditory Physiology and Perception*. Edited by LY. Cazals, L. Demany and K. Horner. Oxford UK: Pergamon vol 83, p. 589-598.
- Puel J.L., Pujol R., Tribillac F., Ladrech S. y Eybalin M. (1994). Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity. *J. Comp. Neurol.* 341: 241-256.

- Pujol R. y Marty R. (1970). Postnatal maturation in the cochlea of the cat. *J. Comp. Neurol.* 139: 115-126.
- Pujol R., Carrier E. y Devigne C. (1978). Different patterns of cochlear innervation during the development of the kitten. *J. Comp. Neurol.* 177: 529-536.
- Pujol R., Carrier E. y Devigne C. (1979). Significance of presynaptic formations in early stages of cochlear synaptogenesis. *Neurosci. Lett.* 15: 97-102.
- Pujol R. y Lavigne-Rebillard M. (1985). Early stages of innervation and sensory cell differentiation in the human organ of Corti. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 423: 43-50.
- Pujol R., Lenoir M., Robertson D., Eybalin M. y Johnstone B.M (1985). Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. *Hear. Res.* 18: 145-151.
- Pujol R. y Lenoir M. (1986). The four types of synapses in the organ of Corti. En: *Neurobiology of hearing: The cochlea.* Cap 10, p 161-172. Altschuler R.A., Hoffman D.W. y Bobbin R.P. (eds). Raven Press, New York.
- Pujol R. y Sans A. (1986). Synaptogenesis in the mammalian inner ear. En: *Advances in neural and behavioral development*, vol 2, Cap 1, p 1-18. Aslin R.N. (Ed.). Ablex Publishing Corporation. Norwood, New Jersey.
- Pujol R. y Uziel A. (1986). Auditory development: peripheral aspects. En: *Handbook of human biologic development.* Timiras T. y Meisami C.R.C. (Eds). Boca Raton, Florida.
- Pujol R. (1989). Anatomie et physiologie de la cochlée. *Archiv. Internat. Physiol. Bioch.* 97-4, A51-178
- Pujol R. (1991). Sensitive developmental period and acoustic trauma: Facts and hypotheses. En A.L. Dancer, D. Henderson, R.J. Salvi y R.P. Hamernik (eds): *Noise-Induced hearing loss.* St. Louis, MO: Mosby Year Book, pp. 196-203.
- Pujol R., Rebillard G., Puel J.L., Lenoir M., Eybalin M. y Recasens M. (1991). Glutamate neurotoxicity in the cochlea: a possible consequence of ischemic or anoxic conditions occurring in aging. *Acta. Otolaryngol (Stockh) Suppl* 476:32-36.
- Pujol R., Lenoir M., Ladrech S., Tribillac R. y Rebillard G. (1992). Correlation Between the length of outer hair cells and the frequency coding of the cochlea. En *Auditory Physiology and Perception.* Cazals Y., Demany L. y Horner K.C.(eds). Pergamon Press, p 45-52.
- Pujol R., Puel J.L, Gervais d'Aldin G. y Eybalin M. (1993). Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 113: 330-334.
- Raymond J. y Desmadryl G. (1989). Neurotoxic effects of excitatory amino acid agonists and attenuation by NMDA antagonists in the vestibular receptors (Abstr.). *Proc. Workshop Inner Ear Biol.* 26th Paris 1989, p 52.
- Rebillard G. y Pujol R. (1983). Innervation of the chicken basilar papilla during its development. *Acta Otolaryngol.* 96: 379-388.
- Rebillard G. y Bryant G.M. (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.
- Reissner E. (1851). De auris internae formations. *Inautur. Dissert*, Dorpat. Citado en : *The organ of Corti.* Vinnikow Y.A. y Titova. L.K.. Consultants Bureau, New York. 1964.

- Remezal M. y Gil-Loyzaga P. (1993). Incorporation of D-³H-glucosamine to the adult and developing cochlear tectorial membrane of normal and hypothyroid rats. *Hear Res.* 66:26-30.
- Reynolds W.A., Lemkey-Johnston N., Filer L.J. y Pitkin R.M. (1971). Monosodium glutamate: absence of hypothalamic lesions after ingestion by newborn primates. *Science* 172: 1342-1344.
- Richany S.F., Anson B.J y Bast T.H. (1949). The ear and the temporal bone. Development and adult structure. En: *The temporal bone and the ear.* Bast T.N., Anson B.J. y Thomas C. (Eds). Springfield, New York, p. 1-140.
- Robertson D. y Johnstone B.M. (1978). Efferent transmitter substance in the mammalian cochlea: Single neuron support for acetylcholine. *Hear. Res.* 1: 31-34.
- Robertson D. (1983). Functional significance of dendrites swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 9: 263-278.
- Robertson D. (1984). Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurons in the guinea pig spiral ganglion. *Hear Res.* 15: 113-121.
- Rodríguez-Gómez F., Poch-Broto J. y Bathal Guede B. (1990). Spontaneous otoemissions in profound sensorineural deafness. Kugler and Ghedini Publications Amsterdam p. 1437-1440.
- Romand R., Sans A., Romand M.R. y Marty R. (1976). The structural maturation of the statoacoustic nerve in the cat. *J. Comp. Neurol.* 170: 1-16.
- Romand R., Romand M.R., Mulle C. y Marty R. (1980). Early stages of myelination in the spiral ganglion cells of the kittens during development. *Acta Otolaryngol.* 90: 391-397.
- Romand R. y Romand M.R. (1984). The ontogenesis of pseudomonopolar cells in spiral ganglion of cat and rat. *Acta Otolaryngol.* 97: 239-249.
- Romijn H.J., Hofman M.A. y Gramsbergen A. (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby?. *Early Hum. Devel.* 26: 61-67.
- Rothman S.M. (1985). The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J. Neurosci.* 5: 1483-1489.
- Rothman S.M. y Olney J.W. (1987). Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci.* 10: 299-302.
- Rubel E.W. y Ryals B.M. (1983). Development of the place principle: acoustic trauma. *Science* 219:512-513.
- Ruben R., Sekula J., Burdley J.E., Kcnickebucker G.C. y Nager G.T. (1960). Human cochlea responses to sound stimuli. *Ann. Oto. Laryn.* 69: 459-479.
- Rueda J., de la Sen C., Juiz J.M. y Merchán J.A. (1987). Neuronal loss in the spiral ganglion of young rats. *Acta Otolaryngol.* 104: 417-421.
- Russell I.J. y Sellick P.M. (1977). Tuning properties of cochlear hair cells. *Nature* 267: 858-860.
- Russell I.J. y Sellick P.M. (1978). Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J. Physiol. (London)* 384: 261-290.
- Ryan A.F. y Schwartz I.R. (1984). Preferential glutamine uptake by cochlear hair cells: Implications for the afferent cochlear transmitter. *Brain Res.* 290: 376-379.

- Ryan A.F., Brumm D. y Kraft M. (1991). Occurrence and distribution of non-NMDA glutamate receptor mRNAs in the cochlea. *NeuroReport* 2: 643-646.
- Safieddine S. y Eybalin M. (1992). Co-expression of NMDA and AMPA/kainate receptors in cochlear neurons. *NeuroReport* 3: 1145-1148.
- Salt A.N. y Konishi T. (1986). The cochlear fluids: Perilymph and endolymph. En *Neurobiology of Hearing: The Cochlea*. Altschuler R.A. y Hoffman D.W. (Eds). Raven Press, p. 109-123.
- Santos-Sacchi J. (1988). Cochlear physiology. En: *Physiology of the ear*, p. 271-293. Jahn A.R. y Santos-Sacchi J. (eds). Raven Press, New York.
- Scheetz A.J. y Constantine-Paton M. (1994). Modulation of NMDA receptor function: implications for vertebrate neural development. *FASEB J.* 8: 745-752.
- Scheibe F., Haupt H., Nuttall A.L. y Ludwing C. (1990). Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound presentation. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 247: 84-88.
- Schwartz A.M., Parakkal M. y Gulley R.L. (1983). Postnatal development of spiral ganglion cells in the rat. *Am. J. Anat.* 167: 33-41.
- Schwartz D.W.F., Schwarz I.E., Hu K. y Vincent S.R. (1988). Retrograde transport of [³H]-GABA by lateral olivocochlear neurons. *Hear. Res.* 32: 97-102.
- Schwartz I.R. y Ryan A.F. (1983). Differential labeling of sensory cell and neural populations in the guinea pig organ of Corti following amino acid incubations. *Hear Res.* 9: 185-200.
- Schwartz I.R. y Ryan A.F. (1986). Amino acid labeling patterns in the efferent innervation of the cochlea: An electron microscopic autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* 246: 500-512.
- Sellick P. M., Patuzzi R. y Johnstone B.M. (1982). Measurement of basilar membrane motion in guinea pig using the Mössbauer technique. *J. Acoust. Soc. Am.* 72: 131-141.
- Seweell W.F., Norris C.H., Tachibana M. y Guth F.S. (1980). Detection of an auditory nerve-activating substance. *Science Wash. DC* 202: 910-912.
- Sewell W.F. (1984). The effects of furosemide on the endocochlear potential and auditory-nerve fiber tuning curves in cats. *Hear. Res.* 14: 305-314.
- Shaw N.A. (1987). The auditory evoked potential en the rat. A review. *Progress in Neurobiology.* 31: 19-45.
- Shinozaki N. y Kimura R.S. (1980). Scanning electron microscopic observations on the distended Reissner's and saccular membranes in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 90: 360-384.
- Shnerson A., Davigne C. y Pujol R. (1982). Age-related changes in the C57Bl/6J mouse cochlea. II. Ultrastructural findings. *Dev. Brain Res.* 2: 77-78.
- Silverstein F.S., Chen R.C. y Johnston M.V. (1986). The glutamate agonist quisqualic acid is neurotoxic in striatum and hippocampus of immature rat brain. *Neurosci. Lett.* 71: 13-18.
- Silverstein F.S., Torke L., Barks J. y Johnstone M.V. (1987). Hypoxia-ischemia produces focal disruption of glutamate receptors in developing brain. *Dev. Brain Res.* 34: 33-39.

- Simmons D.D. y Liberman M.C. (1988a). Afferent innervation of outer hair cells in adult cats. I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270:132-144.
- Simmons D.D. and Liberman M.C. (1988b). Afferent innervation of outer hair cells in adult cats. II. Electron microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 270:145-154.
- Simmons D.D., Manson-Gieseke L. y Ham D. (1990). Differential effects of kainic acid on the developing postnatal cochlea (Abstr.). *Proc. Annu. Meet. Assoc. Res. Otolaryngol.* 13th St. Petersburg Beach FL p 51.
- Slepecky N. y Chamberlain (1983). Distribution and polarity of actin filaments in inner ear supporting cells. *Hear. Res.* 10: 359-370.
- Sobkowicz H.M. y Emmerling M. (1989). Development of acetylcholinesterase-positive neuronal pathways in the cochlea of the mouse. *J. Neurocytol.* 18: 209-224.
- Spoendlin H. y Lichtensteiger W. (1966). The adrenergic innervation of the labyrinth. *Acta Oto-laryngol.* 61: 423-434.
- Spoendlin H. (1969). Innervation patterns in the organ of Corti of the cat. *Acta Otolaryngol.* 67: 239-254.
- Spoendlin H. (1974). Optic and cochleovestibular degeneration in hereditary ataxias. II. Temporal bone pathology in two cases of Freidreich's ataxia with vestibulo-cochlear disorders. *Brain* 97: 41-48.
- Spoendlin H. (1981). Autonomic innervation of the inner ear. In: *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, edited by L. Ruedi. Basel: Karger, vol.27, p. 1-13.
- Spoendlin H. y Schorrt A. (1988). The spiral ganglion and the innervation of the human organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* 105: 403-410.
- Steel K. (1983). The tectorial membrane of mammals. *Hear. Res.* 9: 327-359.
- Thorne P.R. y Nuttall A.L. (1987). Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear. Res.* 27: 1-10.
- Thorne P.R. y Nuttall A.L. (1989). Alterations in oxygenation of cochlear endolymph during loud sound exposure. *Acta Otolaryngol* 107: 71-79.
- Uziel A., Romand R. y Marot M. (1981). Development of cochlear potentials in rats. *Audiology* 20: 89-100.
- Uziel A. (1985). Estructura del oído interno. En: *Fisiología neurosensorial en ORL*. Guerrier Y. y Uziel A. (Eds). Toray-Masson, Barcelona.
- Vicente-Torres M.A., Gil-Loyzaga P., Fernández P., Arce A. y Esquifino A. (1993). Piribedil could modify dopamine turnover in cochlea under noise stimulation. *ORL* 55: 322-324.
- Vornov J.J. y Coyle J.T. (1991). Enhancement of NMDA receptor-mediated neurotoxicity in the hippocampal slice by depolarization and ischemia. *Brain Res.* 555: 99-106.
- Vornov J.J., Tasker R.C. y Coyle J.T. (1991). Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA and kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures. *Exp. Neurol.* 114: 11-22.
- Wada R. (1923). Anatomical and physiological studies on the rowdy of the inner ear of the albino rat. En: *The American Anatomical Memoirs*. Huntington G.S., Stockard C.R. y Evans J.M. (Eds). The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA.

- Walsh E.J. y McGee J.A. (1986). Development of function in the auditory periphery. En: *Neurobiology of hearing: The cochlea*. cap 14, p. 247-269. Altschuler R. A., Hoffman D.W. y Bobbin R.P. (eds). Raven Press, New York.
- Warr W.B. (1975). Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: Their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J. Comp. Neurol.* 161: 159-182.
- Warr W.B., Guinan J.J. y White J.S. (1986). Organization of the efferent fibers: the lateral and medial olivocochlear systems. En: *Neurobiology of hearing: The Cochlea* p.333-348. Altschuler R.A. Hoffman D.W. y Bobbin R.P. (eds).Raven Press, New York.
- Weiss T.F. y Leong R. (1983). A model for signal transmission in an ear having hair cells with free-standing stereocilia. III Mechanoelectric transduction stage. *Hear. Res.* 20: 157-74.
- Wenthold R.J, Niedzielski A.S., Hunter C., Petralia R.S., Wang Y.X. y Mathura J. (1994). Expression of glutamate receptors in spiral ganglion neurons. *Inner Ear Neuropharmacology* p. 2.
- Wever E.G. y Bray C.W. (1930). Action current in the auditory nerve in response to acoustical stimulation. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 16: 344-350.
- Whitehead M.C. y Morest D.K. (1985). The development of innervation patterns in the avian cochlea. *Neuroscience* 14: 255-276.
- Wiederhold M.L. (1986). Physiology of the olivocochlear system. In *neurobiology of hearing: The Cochlea*. Edited by R.A. Altschuler, R.P. Bobbin y D.W. Hoffman. New York: Raven Press, p. 349-370.
- Windmueller J.G. y Spaeth A.E. (1980). Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. *J. Biol Chem.* 255: 107-112.
- Winn P., Stone T.W., Latimer M., Hatings M.H. y Clark A.J.M. (1991). A comparison of excitotoxic lesions of the basal forebrain by kainate, quinolinate, ibotenate, N-Methyl-D-aspartate or quisqualate, and the effects on toxicity of 2-amino-5-phosphonovaleric acid and kynurenic acid in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 102: 904-908.
- Zwislocki J. (1975). The role of the external and middle ear in sound transmission. En: *The Nervous System*, vol 3, p. 45-55. Tower D.B.(Ed). Raven Press, New York.