

T 23842

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Biología Celular**



X-53-397405-3

**EL RECEPTOR AUDITIVO DE LA RATA  
ADULTA Y EN DESARROLLO.**

**ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE  
LESIONES NEUROTÓXICAS Y OTOTÓXICAS**

**TESIS DOCTORAL**

**FRANCISCO JAVIER CARRICONDO OREJANA**  
**Madrid, 2000**



BIBLIOTECA

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Biología Celular**

**EL RECEPTOR AUDITIVO DE LA RATA  
ADULTA Y EN DESARROLLO.**

**ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE  
LESIONES NEUROTÓXICAS Y OTOTÓXICAS**

Memoria realizada para la obtención del Grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas por

**D. Francisco Javier Carricondo Orejana**

Francisco Javier Carricondo Orejana



VºBº del Director

Prof. Dr. Pablo Gil-Loyzaga



Madrid, 2000



FACULTAD DE MEDICINA  
Pabellón 5 - Planta baja  
Teléfs.: (91) 394 13 75 - 394 13 83  
Telefax: (91) 394 13 83

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CENTRO DE CULTIVOS CELULARES (C.A.I.)

D. PABLO GIL-LOYZAGA, Catedrático del Departamento de Cirugía II (O.R.L.) de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Director del Centro de Cultivos Celulares (C.A.I.- U.C.M.),

**CERTIFICA:**

que la memoria de investigación titulada "El receptor auditivo de la rata adulta y en desarrollo. Estudio electrofisiológico de lesiones neurotóxicas y ototóxicas" ha sido realizada, bajo mi dirección, por D. FRANCISCO JAVIER CARRICONDO OREJANA, y que dicha memoria SI reúne las características necesarias para su presentación como Tesis Doctoral.

Fdo.: Prof. Dr. Pablo Gil-Loyzaga

*"Yo, he visto cosas que vosotros no creeríais.  
Atacar naves en llamas más allá de Orión.  
He visto rayos C brillar en la oscuridad  
cerca de la Puerta de Tanhausser...  
Todos estos momentos se perderán en el tiempo,  
como lágrimas en la lluvia.  
Es hora de morir."*

*Blade Runner (Ridley Scott, 1982)*

***A mi familia.***

***A Elena.***

## AGRADECIMIENTOS

*Ya que el apartado de agradecimientos de cualquier memoria de Tesis Doctoral es, seguramente, el más frecuentado por todos los lectores, ajenos o no a la investigación, intentaré hacer un esfuerzo mental para no olvidarme de ninguna de aquellas personas o instituciones a quienes tanto debo y sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible. Como es de bien nacido ser agradecido y no pretendo ser menos, valga a todos ellos mi más sincero agradecimiento (Llave Correas, 1999).*

*Durante todo este tiempo, muchas han sido las personas a las que debo gratitud por haberme ayudado y animado, de distintas maneras, para la realización de esta Memoria de Tesis Doctoral. A todos ellos está dedicado este trabajo. De todos modos, quisiera hacer un recuerdo especial para aquellas personas con las que he convivido en el laboratorio durante todos estos años y que han compartido conmigo este período.*

*Al Profesor D. Pablo Gil-Loyzaga, Catedrático de Neurobiología de la Audición de la Universidad Complutense de Madrid y Director del Centro de Cultivos Celulares (CAI-UCM), mi agradecimiento más profundo. Hace seis años que entré a formar parte de su grupo de investigación y gracias a él, principalmente, esta Tesis Doctoral es, hoy, una realidad. Con él he aprendido lo que realmente es la investigación científica, a llevarla a cabo con rigor y a entender los sacrificios que se deben hacer en su nombre. Tras este tiempo, espero no haber defraudado la confianza que depositó en mí y que éste sea el primer paso de un largo camino de trabajo juntos. Gracias Pablo.*

*Al Profesor D. Joaquín Poch-Broto, Catedrático de Otorrinolaringología de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Servicio de Cirugía II (ORL) del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid, todo el interés y la paciencia que ha demostrado para conmigo en las múltiples visitas que le he hecho. Sin su apoyo y confianza, buena parte de este trabajo no hubiera podido realizarse.*

*A todos aquellos que en algún momento pasaron por el laboratorio, porque de todos ellos recibí, de una u otra manera, ayuda y amistad. De todos modos, me gustaría agradecer especialmente su dedicación a aquellas personas que me han acompañado durante este último período. A Mariví Bartolomé la debo muchas cosas pero sobre todo su apoyo constante y su infinita paciencia para conmigo y el resto de los electrofisiólogos del laboratorio. A Angeles Ibáñez, mi géminis favorita, a la que nunca podré agradecer, en su justa medida, sus desvelos casi maternos a los que la he sometido con mis cosas. A M<sup>ª</sup> Angeles Vicente, la maga de la molécula, con la que he compartido muy buenos momentos y por su paciencia por perseguirme constantemente para que no haga ruido mientras trabaja. A los otorrinos Jesús San Román y Eduardo del Castillo, mis compañeros de electrofisiología y mis amigos, excepcionales desde*

*el punto de vista personal y profesional y de los que he recibido constantes muestras de amistad y respeto y que me han aguantado la mayor parte del tiempo. A las "peques" Sofía Martín-Serrano, Lorena Maestre y Victoria Moneo, que consiguieron introducir en el laboratorio, desde el primer día, la frescura de una sonrisa espontánea y a las que debo su amistad y confianza, sobre todo espero haber sido acertado en la mayoría de las preguntas de los interrogatorios a los que me han sometido. A las maestras del laboratorio, las técnicas del equipo Teresa Rodríguez, Encarna Muñoz, Mabel Alonso y Ana González, a las que agradezco todo el esfuerzo que ha supuesto el procesamiento de mis muestras morfológicas. En concreto nunca podré agradecer suficiente los agradables momentos de la comida que he compartido con Mabel Alonso y por su paciencia por hacer las funciones de mensajería con su "marío" Jaime. Y, por supuesto, a M<sup>a</sup> Cruz González, por ser tan buena y tan paciente conmigo.*

*Al Dr. Manuel Moro y D<sup>a</sup> Pilar Melero, del Servicio de Neonatología del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid, sin cuya colaboración y su apoyo no hubiera podido llevar a cabo los trabajos que realicé con ellos.*

*Capítulo aparte me merece el Dr. Julio Sanjuán Juaristi, ex-jefe del Servicio de Fono-Audiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, por la gentil cesión de sus equipos de registro de potenciales microfónicos cocleares y por la inestimable ayuda que siempre me ha ofrecido. Su ingenio y su capacidad para la creación y el diseño de nuevos equipos son admirables y dignos de mención.*

*Fuera del laboratorio mis amigos fueron los que me soportaron, me animaron y me ayudaron. A todos ellos mi más efusivo agradecimiento y sobre todo a César, Ana, César, Marga, Gema, Juan Carlos, Juan Carlos "pelitos", Raquel, Rafa, Rosi, Pedro, Belén, Patricia, Marian, Imanol y un largo etc. que espero que me perdonen por no poder personalizar desde aquí a cada uno de ellos mi gratitud. También quiero agradecer a Jesús y a Enrique, mis astrónomos preferidos, el haberme enseñado que a millones de años luz de aquí también existen cosas maravillosas que merece la pena observar.*

*A mi familia, mis padres y mi hermana, sin cuyo apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí, ya que siempre han respetado mis decisiones y las han aceptado con grandes dosis de cariño y comprensión.*

*A Elena Rodrigo, mi compañera, mi amiga, mi faro, mi norte y mi guía, para la que mi agradecimiento no tiene límite. Sólo ella sabe todo lo que esto significa para mi y a ella va dedicado este trabajo con todo mi cariño.*

*Y como no, un recuerdo especial para todos los animales de laboratorio. Su sacrificio permite los avances científicos. Vaya desde aquí un llamamiento a la ética en su uso en investigación y al respeto hacia estas criaturas, que no siempre se consideran como lo que son, seres vivos.*

## **Financiación del trabajo**

Los experimentos incluidos en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido financiados por el proyecto F.I.S. 98/0732.

## **Abreviaturas**

<b>AAD:</b>	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos.
<b>ACH:</b>	Acetil colina.
<b>AK:</b>	Acido kaínico.
<b>AMPA:</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato.
<b>ANOVA:</b>	Análisis de la varianza.
<b>ATP:</b>	Adenosin trifosfato.
<b>B:</b>	Bel.
<b>BDNF:</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro.
<b>CAE:</b>	Conducto auditivo externo.
<b>CCE:</b>	Célula ciliada externa.
<b>CCI:</b>	Célula ciliada interna.
<b>CGRP:</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.
<b>ChAT:</b>	Colín-acetil transferasa.
<b>CVN:</b>	Contingente de variación negativa.
<b>DA:</b>	Dopamina.
<b>D-AP-5:</b>	Acido D-2-amino-5-fosfonopentanoico.
<b>dB:</b>	decibelio.
<b>DBH:</b>	Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa.
<b>DIL:</b>	Diltiazem.
<b>DNQX:</b>	6-7-dinitroquinoxalin-2-3-diona.
<b>DOPAC:</b>	Acido 3,4-dihidroxifenilacético.
<b>GABA:</b>	Acido $\gamma$ amino butírico.
<b>GAD:</b>	Descarboxilasa de ácido glutámico.
<b>GLU:</b>	Glutamato.
<b>GMS:</b>	Glutamato monosódico.
<b>HL:</b>	Nivel humano.
<b>HPLC:</b>	Cromatografía líquida de alta resolución.
<b>5-HT:</b>	Serotonina.
<b>HVA:</b>	Acido homovanílico.
<b>Hz:</b>	Hertzio.
<b>IBO:</b>	Acido iboténico.
<b>IP<sub>3</sub>:</b>	inositol 1,4,5-trifosfato.
<b>KANA:</b>	Kanamicina.
<b>NCAV:</b>	Núcleo coclear anteroventral.
<b>NCD:</b>	Núcleo coclear dorsal.
<b>NCPV:</b>	Núcleo coclear posteroventral.
<b>NMDA:</b>	N-metil-D-aspartato.
<b>PAC:</b>	Potencial de acción compuesto.
<b>PMC:</b>	Potencial microfónico coclear.
<b>PND:</b>	Día postnatal.
<b>PNMT:</b>	Feniletanolamina N-metiltransferasa.
<b>SPL:</b>	Nivel de presión sonora.
<b>TH:</b>	Tirosina hidroxilasa.

# ***INDICE***

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Generalidades	3
Filogenia del receptor auditivo	6
Anatomía y fisiología del receptor auditivo de los mamíferos euterios	20
Oído externo	20
Oído medio	22
Oído interno	26
- Morfología de la cóclea	26
- El órgano de Corti	29
- Células neurosensoriales del órgano de Corti	30
a) Células ciliadas internas (CCIs)	31
b) Células ciliadas externas (CCEs)	32
- Inervación coclear	33
a) Inervación coclear aferente	33
b) Inervación coclear eferente	36
c) Inervación coclear simpática	38
- Neurotransmisores del receptor auditivo	41
a) Neurotransmisores del sistema aferente coclear	41
a.1) Sistema CCI - fibra aferente de tipo I	41
a.2) Sistema CCE - fibra aferente de tipo II	44
b) Neurotransmisores del sistema eferente coclear.	44
b.1) Acetilcolina (ACh)	45
b.2) Acido $\gamma$ -amino butírico (GABA)	45
b.3) Dopamina (DA)	46
b.4) Serotonina (5HT)	47
b.5) Péptidos opioides	48
b.6) Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)	49

- Fisiología coclear	49
a) Potencial endococlear	50
b) Mecánica coclear	51
c) La transducción del sonido a mensaje neural	55
d) Electrofisiología auditiva	59
e) Ontogenia funcional auditiva	64
Patologías cocleares	67
a) Neurotoxicidad en el receptor auditivo. Fisiopatología de las sinapsis glutamatérgicas	68
b) Ototoxicidad inducida por antibióticos aminoglicósidos	75
<b>JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	77
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	80
Protocolo de neurotoxicidad	82
a) Diseño experimental	82
b) Tratamientos	83
c) Estudio electrofisiológico	83
d) Estudio morfológico	85
Protocolo de ototoxicidad	86
a) <i>Neurotoxicidad en la rata adulta</i>	87
b) Ototoxicidad en la rata adulta	88
c) Ototoxicidad en la rata en desarrollo	88
d) Registro del potencial microfónico coclear	89
<b>RESULTADOS</b>	95
Neurotoxicidad en el receptor auditivo	96
a) Período del 2º al 5º día postnatal	96
b) Período del 6º al 9º día postnatal	103
c) Período del 9º al 12º día postnatal	108
d) Período del 15º al 18º día postnatal	113
e) Período del 30º al 33º día postnatal	118

Ototoxicidad en el desarrollo del receptor auditivo	123
a) Neurotoxicidad en la rata adulta	123
b) Ototoxicidad en la rata adulta	127
c) Ototoxicidad en la rata en desarrollo	130
<b>DISCUSION</b>	135
I. Neurotoxicidad en el receptor auditivo	136
a) Análisis de las alteraciones cocleares de etiología neurotóxica	136
b) Análisis comparado de los efectos de la neurotoxicidad inducida por la administración de GMS a lo largo del desarrollo coclear	143
c) Análisis de los efectos protectores del tratamiento con diltiazem frente a la neurotoxicidad inducida por GMS en el desarrollo coclear	150
II. Ototoxicidad en el receptor auditivo	156
a) Análisis de los efectos de la neurotoxicidad sobre el PMC y el PAC del nervio auditivo en ratas adultas	156
b) Análisis de los efectos sobre el PMC del tratamiento con kanamicina en el receptor auditivo de la rata adulta	158
c) Análisis de los efectos de la administración de KANA en el desarrollo del receptor auditivo	159
III: Neurotoxicidad y ototoxicidad	162
<b>CONCLUSIONES</b>	164
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	167

# ***INTRODUCCIÓN***

La supervivencia de cualquier forma de vida depende del análisis de información procedente del exterior. Esta capacidad posibilita al organismo para la detección de cambios ambientales en su hábitat y, a su vez, para establecer las relaciones intraespecíficas e interespecíficas necesarias para la supervivencia del individuo. Es por ello que los elementos encargados de recibir, analizar e interpretar esta gran cantidad de información, los órganos de los sentidos, son determinantes para la selección natural. Este proceso, a lo largo de la historia natural, ha hecho que se seleccionen aquellos organismos que más y mejor reciban e interpreten esas señales externas, induciendo el desarrollo y la evolución de órganos receptores más o menos especializados en la captación y análisis de determinadas señales, según los requerimientos específicos de cada especie.

La necesidad de recopilar la información derivada de una de estas señales, las vibraciones de las moléculas del medio externo, hace que, evolutivamente, aparezcan diferentes órganos que facilitan la captación de estos pequeños cambios de presión. Entre ellos está el receptor auditivo y otros órganos filogénicamente no homólogos pero si análogos en su funcionalidad receptora, como son el órgano de Johnston y los órganos timpánicos de los artrópodos y los órganos de la línea lateral de la mayoría de los vertebrados acuáticos.

El receptor auditivo como tal, filogénicamente, aparece en los vertebrados acuáticos a partir del órgano vestibular y alcanza su mayor expresión morfológica y funcional en los vertebrados terrestres, particularmente en los mamíferos euterios. En éstos, la audición juega un papel fundamental para la vida del individuo en la localización, defensa, orientación espacial y en la comunicación intra e interespecífica. En el hombre, esta capacidad de comunicación ha dado lugar al lenguaje y con él al desarrollo y evolución de las diversas culturas históricas.

## EL RECEPTOR AUDITIVO

### Generalidades

La audición es la propiedad de captar e interpretar las vibraciones moleculares del medio externo (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Estas vibraciones de las moléculas del medio constituyen las ondas de presión u ondas sonoras que se caracterizan mediante el uso de dos variables, la frecuencia (ciclos/sg o hertzios, Hz) y la intensidad (decibelios, dB), según las cuales los sonidos serán agudos o graves y débiles o fuertes.

Evolutivamente, cada especie ha adecuado su receptor auditivo para la captación del espectro frecuencial de sonidos que le son de utilidad para su supervivencia. Así, en el caso del hombre la cóclea puede percibir sonidos entre 20 Hz y 20000 Hz, mientras que, por ejemplo, el espectro auditivo del murciélago va desde 1000 Hz hasta 100.000 Hz, el de las ballenas y los delfines esta entre 20 Hz y 100.000 Hz y en los roedores desde 500 Hz hasta 50.000 Hz.

La intensidad del sonido se define como la presión ejercida por la onda sonora en un punto determinado. El nivel de presión sonora (*Sound Pressure Level*, SPL) está determinada por una expresión matemática en la que se relacionan la presión ejercida en un punto por la onda problema ( $P_x$ ) y la presión de referencia ( $P_r$ ) =  $2 \cdot 10^{-4}$  dinas / cm<sup>2</sup>.

$$\text{Nivel de presión sonora (SPL)} = 20 \log P_x / P_r$$

La unidad en que se expresa el nivel de presión sonora es el *bel* (B) y más corrientemente un submúltiplo de esta unidad, el *decibel* (dB). El decibel

es una unidad relativa y dependiente de la escala de medida utilizada, de manera que utilizando la relación anteriormente expuesta se obtendrá una medida que se debe expresar en *dB (SPL)*.

En base a los datos recopilados de mediciones de la audición en el hombre con esta escala, utilizando sonidos de distinta frecuencia e intensidad, se puede obtener una gráfica en la que se puede observar el campo auditivo del oído humano (Fig. 1) en la que se pueden observar los umbrales de dolor y de percepción del receptor auditivo.

Como se puede observar en la figura 1, el oído humano no percibe con la misma sensibilidad los sonidos de las distintas frecuencias del espectro audible humano. En el caso de las medidas de los niveles de audición humana se considera el nivel "0 dB" a un sonido de una intensidad apenas perceptible. Por ello, en este caso se utiliza, frecuentemente, una escala corregida para cada una de las frecuencias utilizadas en una exploración audiológica. Es la escala denominada *Human Level (HL)* y, por lo tanto, los resultados de intensidad de sonido deben expresarse en *dB (HL)* (Fig. 2).

Existen otras escalas como la de *dB (A)* con distintas aplicaciones en medidas de sonido, como las mediciones de contaminación acústica en nuestras ciudades.

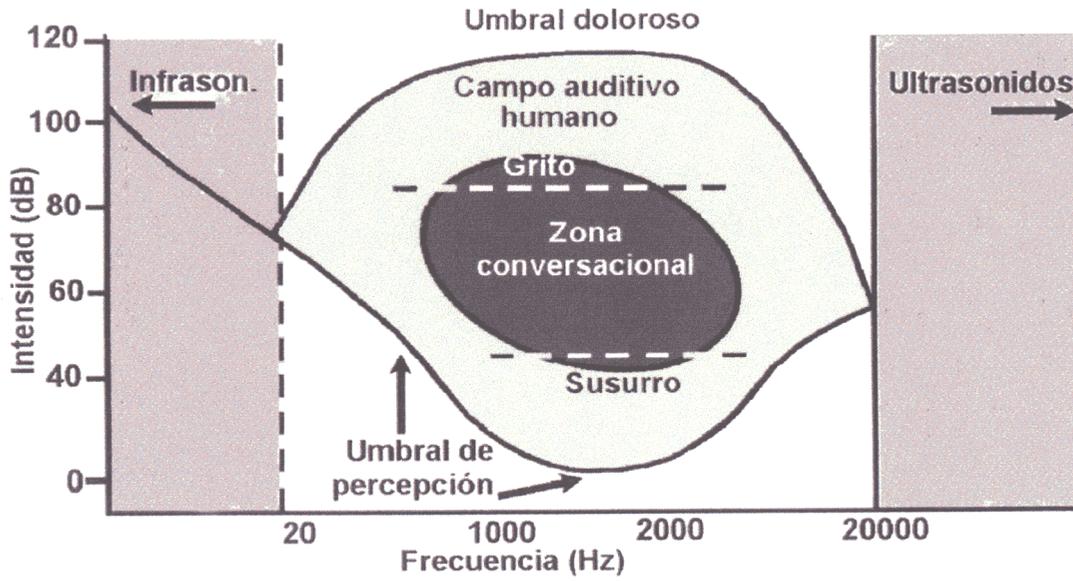


Figura 1: Campo auditivo humano (Tomado de Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b)

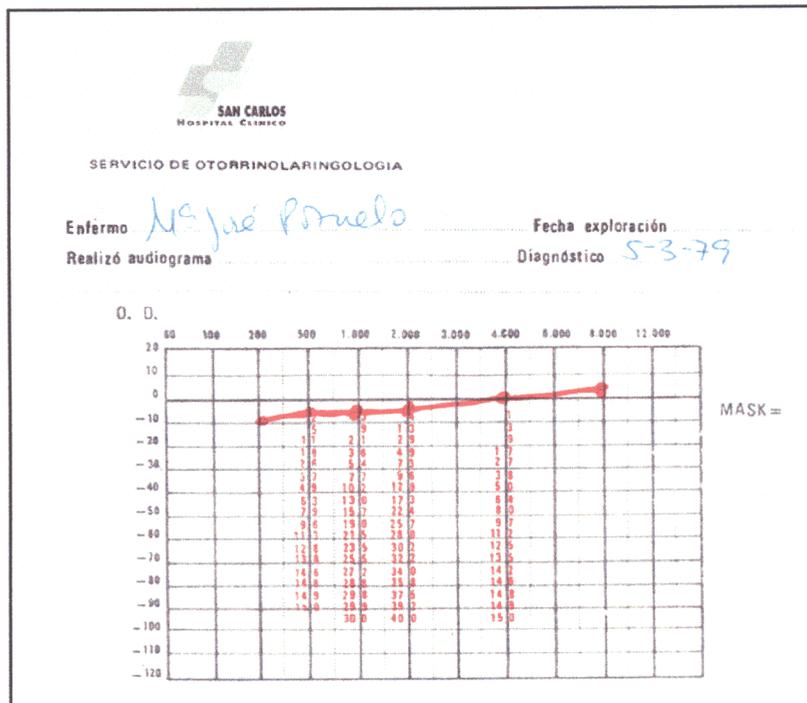


Figura 2: Gráfica audiométrica humana normal

### **Filogenia del receptor auditivo**

El receptor auditivo se forma, en el curso de la evolución, a partir del órgano vestibular, de manera que se podría decir que la función más antigua del receptor auditivo es la del mantenimiento del equilibrio (Baird, 1976; Gil-Carcedo, 1995). La función auditiva se especializa en las formas evolutivamente más elevadas de vertebrados mientras que la función del equilibrio básica permanece constante desde los peces hasta el hombre.

La audición, el sentido del oído, está limitado a los insectos y a los vertebrados (Shepherd, 1985). En ambos casos, se trata de órganos funcionalmente análogos pero no evolutivamente homólogos, ya que su origen ontogénico y filogénico no es el mismo.

La mayoría de los invertebrados son sensibles a vibraciones ambientales de baja frecuencia, como determinados tipos de sonidos, pisadas cercanas, etc., pero son los insectos los únicos invertebrados que han desarrollado, en el curso de la evolución, receptores sonoros específicos. Así, tenemos el órgano de Johnston y los órganos timpánicos.

El órgano de Johnston se sitúa en una pequeña depresión en la base de las antenas y está formado por un conjunto de células sensoriales alargadas denominadas sensilios cordotonaes cuya deformación, producida por la onda sonora, inicia la transmisión de la señal auditiva al sistema nervioso central. Son sensibles a sonidos de bajas frecuencias (hasta 2 kHz).

Los órganos timpánicos son los receptores auditivos más desarrollados de los insectos y sólo se dan en determinados grupos como los grillos (*Orthoptera, Gryllidae*) y las polillas (*Lepidoptera, Noctuoidea*). El órgano timpánico es realmente una modificación del sistema traqueal respiratorio de los insectos.

En el caso de las polillas (Pérez y Coro, 1984; 1985; 1986; Coro y Pérez, 1987), los órganos timpánicos (Fig. 3), situados a ambos lados del tórax,

constan de una delgada membrana de cutícula, denominada membrana timpánica, bajo la cual hay una cavidad aérea, la *bulla amplificatrix*, que hace las veces de caja de resonancia. A la membrana timpánica se anclan las células sensoriales o sensilios cordotonales, que en este caso están en número de dos, denominados  $A_1$  y  $A_2$ . Cada uno de ellos responde a los sonidos de la frecuencia de emisión característica de los sonidos de ecolocalización de los murciélagos, su principal depredador.

Los vertebrados acuáticos poseen un órgano específico, el órgano de la línea lateral, que si bien no está capacitado para la recepción sonora, es *análogo al receptor auditivo en su funcionalidad de recepción de ondas de presión del medio subacuático* (Dijkgraaf, 1963). Está constituido por unos sistemas de canales debajo de la piel, en los que se localizan las unidades receptoras o neuromastos constituidos por grupos de células ciliadas, cuyos cilios están anclados a una estructura denominada cúpula (van Netten y cols., 1994). Las ondas de presión en el medio acuático inciden sobre la cúpula del neuromasto (van Netten, 1991), cuyo movimiento se transmite a los cilios de las células receptoras induciendo la transducción mecano-eléctrica y el consiguiente potencial de acción que pasará al sistema nervioso central (Roberts y cols., 1988).

Algunos autores han descrito teorías sobre el origen filogénico del receptor auditivo situándolo en los órganos de la línea lateral de los vertebrados acuáticos, en base a las semejanzas en estructura y función básicas de ambos órganos (Berrill, 1955; van Bergeijk, 1967). Este origen, basado en estudios ontogénicos (Wilson y Mattocks, 1897), sería el resultado de la migración hacia el interior y la especialización de los elementos del sistema de la línea lateral. Sin embargo, aún no se dispone de una evidencia filogénica en el registro fósil para la demostración final de esta teoría (Baird, 1976).

**Filo Chordata****Subfilo Tunicata (Urochordata)**Clase *Ascidiacea*Clase *Thaliacea*Clase *Larvacea***Subfilo Cephalochordata****Subfilo Vertebrata****Superclase Agnatha**Clase *Myxini*Clase *Pteraspidomorphi* (♠)Clase *Cephalaspidomorphi***Superclase Gnathostomata**Clase *Placodermi* (♠)Clase *Chondrichthyes*Clase *Acanthodii* (♠)Clase *Osteichthyes*Clase *Amphibia*Clase *Reptilia*Clase *Aves*Clase *Mammalia***Tabla 1:** Clasificación de los Cordados (♠ : grupo fósil). Adaptado de Tellería (1991).

En la línea evolutiva del filo *Chordata*, al que pertenecen los vertebrados, las primeras evidencias de la existencia de un órgano laberíntico se encuentran en fósiles de los ostracodermos (Cl. *Pteraspidomorphi*), los primitivos agnatos o peces sin mandíbula, en los que ya se puede observar un laberinto con dos canales semicirculares bien definidos (Stensiö, 1927). En los cordados evolutivamente más antiguos, tunicados y cefalocordados, no se han encontrado signos de presencia del órgano vestibular (Baird, 1976).

Esta primitiva estructura vestibular de los ostracodermos se puede observar en los agnatos actuales, lampreas (Cl. *Cephalaspidomorphi*, O. *Petromyzontiformes*) y mixines (Cl. *Myxini*, O. *Myxiniformes*), incluidos

clásicamente en la Cl. *Cyclostomata*, actualmente abandonada (Tellería, 1991). La morfología del órgano laberíntico de estos grupos fue descrita por primera vez por Retzius (1881).

Así, las lampreas (*Petromyzon* sp., *Lampetra* sp., etc.) exhiben un órgano vestibular con dos canales semicirculares que parten de una cámara común hasta las crestas ampulares anterior y posterior en las que se encuentran las células sensoriales (Baird, 1974). En la cámara común se encuentra la mácula común cuyo neuroepitelio está dividido en tres partes, horizontal, anterior y posterior, con diferentes patrones de orientación de las células sensoriales y recubiertas por membranas otoconiales (Doménech y Vilas, 1992). Este hecho se ha descrito como un posible precursor de las máculas utricular, sacular y lagenar de los vertebrados superiores (Lowenstein y cols., 1968).

Por otro lado, los mixines (*Mixine* sp., *Bdellostoma* sp., etc.) presentan un laberinto vestibular extremadamente simple formado por un sólo canal semicircular, que se dilata en ambos extremos para dar lugar a las ampollas anterior y posterior donde se sitúan las crestas ampulares anulares con las células sensoriales orientadas. El canal semicircular se conecta a una cámara central donde se sitúa la mácula común (Baird, 1974). Esta conformación es desconocida en el registro fósil, por lo que se especula con la posibilidad de que no sea un órgano vestibular filogénicamente más antiguo, sino que realmente se haya producido por una simplificación, en el curso de la evolución del grupo, a partir del esquema general de organización de los ostracodermos. Este cambio podría estar relacionado con la forma de vida parásita de estos animales (Baird, 1976).

El siguiente paso evolutivo importante en los cordados fue la adquisición de la mandíbula por parte de los acantodios (Cl. *Acanthodii*) y el consiguiente surgimiento de los vertebrados gnatostomados (Superclase *Gnathostomata*).

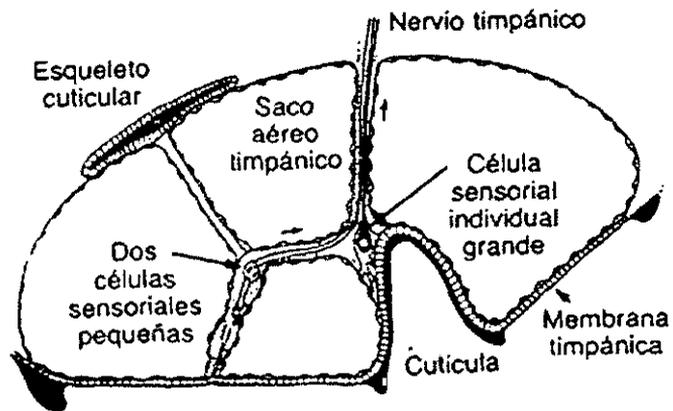
La mandíbula se originó a partir del primer arco del esqueleto branquial. De las partes dorsales del arco branquial se formó el cartílago palatoc cuadrado o mandíbula superior y la modificación de las partes ventrales del arco dió lugar al cartílago de Meckel o mandíbula inferior. Este evento evolutivo tuvo gran importancia en la historia filogénica del oído, ya que en el resto de vertebrados, el posterior desarrollo del esqueleto craneal hizo que estas primitivas mandíbulas fuesen substituídas por nuevas piezas, quedando los restos del primer arco branquial reducidos, bien a pequeños huesos situados en las articulaciones de las nuevas mandíbulas o bien al martillo y al yunque del oído medio de los mamíferos (Tellería, 1991).

A partir de aquí surgen los peces cartilaginosos (Cl. *Chondrychthyes*) y los peces óseos (Cl. *Osteichthyes*), los dos grupos de vertebrados acuáticos dominantes en nuestros días. De origen incierto, evolucionaron de forma independiente, y actualmente presentan distintos grados de evolución del receptor vestibular y auditivo.

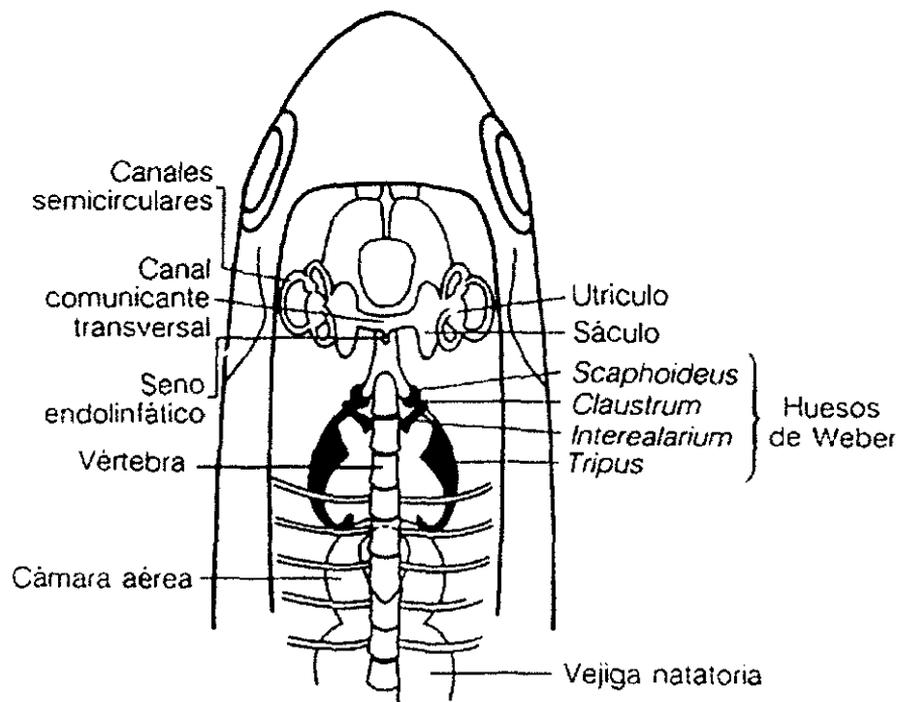
En cuanto a los condríctios, quimeras (Subclase *Holocephali*), tiburones (Subclase *Elasmobranchii*, Superorden *Selachimorpha*) y rayas (Subclase *Elasmobranchii*, Superorden *Batidoidimorpha*), ya presentan un órgano vestibular con tres canales semicirculares totalmente desarrollados con disposiciones diferentes en los grupos, de manera que es el de las quimeras el que más se asemeja al vestíbulo de las formas evolutivamente superiores, además de un sáculo con diferentes grados de diferenciación utricular y lagenar (Baird, 1974). También es común en los grupos de condríctios la existencia de un conducto ótico que pone en comunicación el sáculo, que se constituye como centro organizador del laberinto, con el exterior. Esta zona, originalmente descrita por Scarpa (1789) y denominada por ello *fenestra de Scarpa*, podría tener funciones de conducción del sonido (Lowenstein y Roberts, 1951). El epitelio neurosensorial tiene diferentes disposiciones en los

distintos grupos. De manera que, en los tiburones y las rayas, la superficie posterior del sáculo está evaginado formando una pequeña lagena y las máculas sacular y lagenar se encuentran separadas, mientras que en las quimeras el proceso lagenar no es evidente y, por lo tanto, la mácula lagenar y sacular forman un epitelio continuo. La mácula utricular, que está aislada en un pequeño utrículo que aparece como una evaginación de la pared anterolateral del sáculo, está recubierta por una membrana estatolítica. Asimismo, un largo estatolito sacular recubre las máculas sacular y lagenar. Los cilios de las células neurosensoriales quedan anclados en las membranas estatolíticas (Baird, 1976).

Los peces óseos (Cl. *Osteichthyes*) ya cuentan con una cápsula ótica osificada con el utrículo, sáculo y lagena más diferenciados (Domènech y Vilas, 1992). La distribución del laberinto vestibular es parecida en todos los grupos de osteictios, mientras que la organización del utrículo, sáculo y lagena es más variable. El utrículo es básicamente tubular con una pequeña depresión anteroventral donde se aloja la mácula utricular recubierta por una membrana otolítica, en la que se insertan los cilios de las células sensoriales, y un otolito. Las máculas sacular y lagenar quedan totalmente independizadas al igual que sus otolitos (Baird, 1976). El epitelio sensorial en estas máculas está formado por células ciliadas rodeadas de células de soporte. Los cilios de las células ciliadas varían en longitud en función de la localización de la célula (Popper, 1987; Popper y Hoxter, 1981). Sobre esta organización general, varios grupos de osteictios del Superorden *Teleostomi*, como las carpas (*O. Cypriniformes*), han desarrollado un sistema de huesecillos, la cadena osicular de Weber (Weber, 1820), *scaphoideus*, *claustrum*, *interealarium* y *tripus*, que conectan el laberinto ótico, por el canal comunicante transversal que une ambos sáculos, y la vejiga natatoria (Domènech y Vilas, 1992), que haría las veces de caja de resonancia en la recepción de sonidos (Baird, 1974).



**Figura 3:** Sección transversal del órgano timpánico de una polilla de la familia Noctuidos. (Adaptado de Sheperd, 1985)

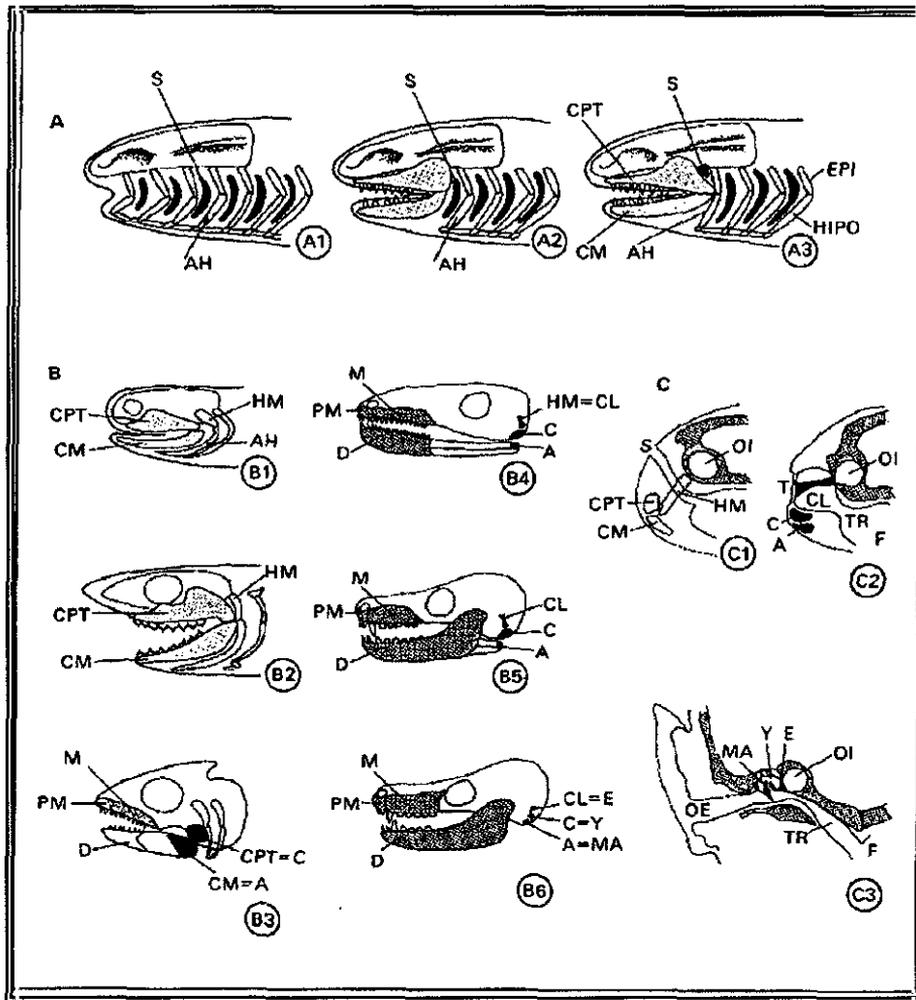


**Figura 4:** Esquema de la parte anterior de un pez teleosteo (*Carpa*, *Ciprinidae*) que muestra los elementos implicados en la recepción de vibraciones desde el medio externo. (Adaptado de Domenech y Melero, 1992)

La conquista del medio aéreo terrestre se inició a partir de un grupo fósil de osteictios, los crossopterigios ripidistios (*O. Osteolepimorpha*). Todas las evidencias fósiles apuntan a este grupo como punto de origen del que evolucionaron los primeros tetrápodos terrestres, los anfibios (Cl. *Amphibia*), ya que poseían pulmones que les permitían respirar fuera del agua, su esqueleto estaba bien osificado y sus aletas monobasales dicotómicas presentaban una disposición de huesos similar al quiridio de los tetrápodos (Tellería, 1991). La Clase *Amphibia* ha llegado a la actualidad representada únicamente por tres órdenes, urodelos (*O. Caudata*), gimnofiones (*O. Gymnophiona*) y anuros (*O. Anura*).

El comienzo de la vida aérea hace necesario un sistema de adaptación de impedancias entre el aire, en el que se transmiten los sonidos y los líquidos laberínticos. Este sistema constituirá el oído medio y la conducción de la onda sonora se realizará mediante un sistema de huesecillos que unirá el laberinto ótico con el exterior directamente o con una membrana externa que será la que reciba el sonido. Estos huesecillos del oído medio, evolutivamente, se forman a partir del primer y segundo arco branquial, de manera que el yunque y el martillo derivan del primer arco branquial (cartílago palatoc cuadrado y cartílago de Meckel) y el estribo de los mamíferos, que procede de la columela de anfibios, reptiles y aves, deriva del segundo arco branquial (cartílago hiomandibular) (Tellería, 1991).

La configuración del oído medio es variable en todos los grupos de tetrápodos terrestres y también en el caso de los anfibios. Así, los urodelos (salamandras), que carecen de caja y membrana timpánica, sólo tienen el opérculo, equivalente a la platina del estribo. En los gimnofiones (ápodos) ya existe una columela que conecta la ventana oval con el hueso cuadrado (que dará lugar al yunque en formas más evolucionadas).



**Figura 5:** Evolución de la mandíbula y del oído medio

**A:** Origen de la mandíbula a partir de los arcos branquiales. A1: estado agnato, A2: estado hipotético de los primeros gnatóstomos, A3: estado gnatóstomo o mandibulado de los primeros peces.

**B:** Evolución de la mandíbula. El arco mandibular de los acantodios (B1) y condricios (B2) pasa a formar la articulación mandibular al ser sustituido en las funciones alimenticias por huesos dérmicos en peces óseos (B3), tetrápodos no mamalianos (B4: anfibios y reptiles), reptiles mamalianos (B5) y mamíferos (B6). En estos últimos pasa a formar parte del oído medio.

**C:** Evolución del oído medio. C1: peces, C2: tetrápodos no mamalianos, C3: mamíferos.

A: articular, AH: arco hioideo, C: cuadrado, CL: columnilla, CM: cartílago de Meckel, CPT: cartílago pterigocuadrado, D: dentario, E: estribo, EPI: epibranquial, F: faringe, HIPO: hipobranquial, HM: hiomandibular, M: maxilar, MA: martillo, OE: oído externo, OI: oído interno, S: espiráculo, T: membrana timpánica, TR: trompa de Eustaquio, Y: yunque.

(Adaptado de Tellería, 1991)

Los anuros (ranas) ya tienen caja y membrana timpánica con la que contacta la columela (Gil-Carcedo, 1995).

El laberinto ótico, que consta de tres canales semicirculares, utrículo, sáculo y lagena, está osificado aunque conserva restos de cartílago en las paredes de la cápsula ótica y en los canales semicirculares. La pared lateral de la cápsula está perforada formando la ventana oval, *fenestra vestibuli*, con la que el opérculo y/o la columela se articulan (Baird, 1976). Dos nuevos epitelios receptores especializados, la papila anfibia y la papila basilar, están presentes al menos en algún grupo de cada uno de los tres órdenes de anfibios actuales. La papila anfibia, específica de la clase, se sitúa en una evaginación de la pared dorso-medial del sáculo denominada divertículo anfibio. La recepción auditiva de este grupo ha sido atribuida en parte a este receptor (Feng y cols., 1975). El neuroepitelio está formado por células cuyos cilios están anclados en una membrana extracelular y tienen orientaciones específicas (Baird, 1974). Estas células están divididas en dos poblaciones que están inervadas por dos ramas diferentes del VIII par (Lewis, 1981). La papila basilar es una estructura pequeña y que falta en muchos grupos de anfibios. Cuando está presente se localiza en el divertículo basilar, una evaginación de la lagena en su pared proximal al sáculo (Baird, 1974). En *Rana* sp. y *Xenopus* sp. la papila basilar se sitúa transversalmente al eje longitudinal del divertículo basilar y consta de 50-70 células ciliadas cuyos cilios se orientan hacia una fina membrana situada en la parte libre del divertículo (Baird, 1974).

La expansión de los vertebrados terrestres la llevaron a cabo los primeros amniotas, los reptiles (Cl. *Reptilia*), cuyo origen evolutivo, a partir de los anfibios, todavía es incierto (Tellería, 1991). Presentan muchas mejoras, respecto a sus antecesores anfibios, que permiten una eficiente explotación del medio terrestre, lo que les llevó a una rápida radiación adaptativa. Entre

esas mejoras para una mejor adaptación al medio terrestre se encuentran variaciones en el receptor auditivo. En ellos ya se observa un primordio de *pabellón auricular*, dos *relieves cutáneos con funciones de protección del oído*, además de una membrana timpánica que se conecta con la ventana oval coclear mediante la columela que consta de dos partes, una ósea denominada estapedial y una distal y cartilaginosa llamada extracolumela (Gil-Carcedo, 1995).

El avance filogénico más evidente en este grupo, relacionado con el laberinto ótico, es la definición del conducto coclear (Baird, 1974). Situado en la parte posterior del sáculo, la parte proximal del conducto coclear alberga la papila basilar y la parte distal la mácula lagenar. Esta disposición se mantendrá en aves y mamíferos monotremas. El grupo con mayor número de modificaciones en el oído es el de los cocodrilos (*O. Cocodrilia*). Presentan un canal coclear muy elongado con la papila basilar íntimamente asociada a los tejidos conectivos perióticos formando la membrana basilar y el limbo interno de soporte de la estructura (Baird, 1976). La papila basilar cuenta con dos tipos de células sensoriales, unas alargadas en la zona interna o neural del receptor y otras pequeñas y con forma lenticular en la zona distal del receptor. Todas estas células ciliadas están recubiertas por una membrana tectoria. El neuroepitelio se encuentra dividido por una células de los pilares, que dejan entre ellos un espacio vacío de células que ofrece un punto de comparación con el túnel de Corti del receptor auditivo de los mamíferos euterios. El desarrollo de una membrana basilar, frente a la primitiva papila basilar fue significativa para la subsecuente diferenciación del receptor auditivo (Baird, 1974).

Las aves (Cl. *Aves*) y los mamíferos (Cl. *Mammalia*) evolucionaron a partir de dos grupos diferentes de reptiles, la Subcl. *Anapsida*, *O. Ornithischia*, y la Subcl. *Synapsida*, *O. Therapsida*, respectivamente. A pesar de esta

radiación evolutiva independiente, se pueden observar diferentes grados de complejidad en la estructura del receptor auditivo, relacionables con su historia filogénica.

En el oído medio de las aves se encuentra la columela, como eficaz elemento transmisor de las ondas de presión al oído interno, desde el tímpano hasta la membrana redonda. Esta columela está dividida en dos partes, una cartilaginosa o extracolumela, que contacta con el tímpano, y una pared interna ósea que contacta con la ventana redonda (Counter y Tsao, 1986).

Los principales rasgos del laberinto ótico de las aves son comparables a los encontrados en los cocodrilos. Esta comparación puede ser extendida hasta los componentes del conducto coclear en el que se encuentra la papila basilar. El receptor auditivo consta de tres tipos de células sensoriales, denominadas por su tamaño largas, cortas e intermedias, de manera que las células largas ocupan el margen neural de la papila basilar, mientras que las cortas se sitúa en el margen distal del receptor. Las células intermedias ocupan posiciones entre los otros dos tipos celulares (Baird, 1974). Esta distribución parece ser la base de la tonotopía del receptor (Rubel y Ryals, 1983; Lippe y Rubel, 1983; Manley y cols., 1987). La morfología y las capacidades fisiológicas del receptor varían según el grupo estudiado. Así, en los búhos esta papila basilar es más larga que en otras aves y posee capacidad de recepción a altas frecuencias (Fischer y cols., 1988).

El último paso en la evolución del receptor auditivo se encuentra en los mamíferos. Procedentes de los reptiles de la Subclase *Synapsida*, uno de los grupos de reptiles más arcaicos y diferenciados, evolucionaron independientemente hasta el Jurásico. En este intervalo estuvieron representados por el O. *Pelycosauria* primero y, después, por el O. *Therapsida*, del que evolucionaron directamente los mamíferos. Los terápsidos tenían rasgos típicamente reptilianos, pero también poseían determinados caracteres

mamalianos. Así, tenían dentición heterodonta y un paladar secundario desarrollado. Incluso es posible que poseyeran pelo y fueran endotermos. Por otro lado, carecían de zona lumbar en la columna vertebral, por lo que eran incapaces de correr flexionando su columna vertebral en el plano sagital, como los mamíferos actuales, tenían una mandíbula inferior formada por varias piezas y, en cuanto al aparato auditivo, su oído medio constaba de una sola pieza, la columnilla, al participar los huesos articular y cuadrado, futuros martillo y yunque mamalianos, en la articulación mandibular. El desarrollo de un eficiente aparato masticador, un paladar secundario, el viviparismo y el consiguiente desarrollo de las glándulas mamarias, son algunos de los rasgos que permitieron al grupo extenderse y diversificarse en el Terciario tan pronto como desaparecieron una buena parte de los reptiles del Secundario (Tellería, 1991).

Los mamíferos constituyen un grupo no excesivamente diversificado, pese a sus indudables logros evolutivos. Esto es tal vez debido a los importantes requerimientos energéticos de la endotermia, lo que deja sitio, en los ecosistemas más pobres, para otros vertebrados metabólicamente menos exigentes. Así, la Cl. *Mammalia* se subdivide en dos grandes grupos: la Subcl. *Prototheria* representada por el O. *Monotremata* (equidnas y ornitorrincos), grupo que conserva rasgos reptilianos como la reproducción ovípara, y la Subcl. *Theria*, de reproducción vivípara, que a su vez se subdivide en la Infracl. *Metatheria* o marsupiales y la Infracl. *Eutheria* o placentados en la que se incluye el *Homo sapiens*.

En los mamíferos el receptor auditivo ya adquiere las formas filogénicamente más evolucionadas del Reino animal. En ellos, el oído externo alcanza toda su funcionalidad de antena captadora del sonido por medio del desarrollo de un pabellón auricular variable en forma, tamaño y movilidad. En el oído medio, la columnilla reptiliana se transforma en el estribo, *stapes*,

mientras que los huesos mandibulares articular y cuadrado, retazos filogénicos del primer arco branquial, pasan a formar parte de la cadena de huesecillos del oído medio como yunque, *uncus*, y martillo, *malleus*. En el oído interno, el conducto coclear, que sigue en comunicación con el sáculo por medio del *ductus reuniens*, aumenta de tamaño por lo que comienza a espiralizarse para ocupar menos sitio en el temporal, constituyendo la típica cóclea mamaliana. Una excepción la encontramos en los monotremas en los que todavía se conserva un conducto coclear típicamente reptiliano, alargado y algo curvado. El número de vueltas o espiras de la cóclea varía según el grupo animal. Así, son 2.5 espiras en la rata, 3 en el gato, etc. (Gil-Carcedo, 1995). En el interior del conducto coclear se establece, en toda su longitud, el receptor auditivo u órgano de Corti. En él se estructuran dos poblaciones de células ciliadas, internas y externas, que son las células sensoriales del receptor.

### **Anatomía y fisiología del receptor auditivo de los mamíferos euterios**

El receptor auditivo se divide clásicamente, atendiendo a la localización de sus elementos constituyentes, en tres partes:

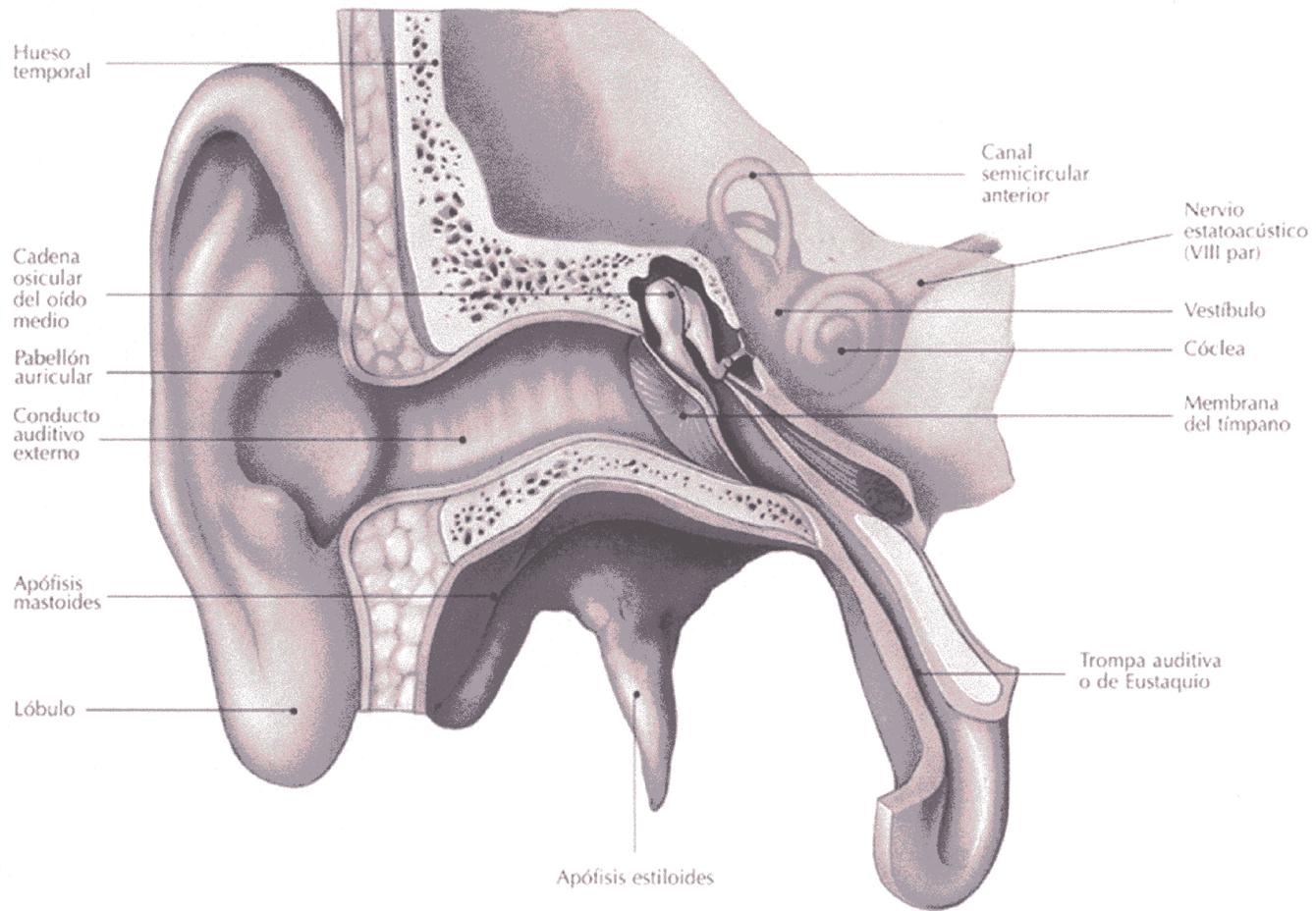
- Oído externo.
- Oído medio.
- Oído interno.

El oído externo y medio, se encargan de la transmisión mecánica del sonido al oído interno, que constituye el sistema de percepción de las vibraciones sonoras (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

#### **Oído externo.**

El oído externo se encarga de captar las ondas sonoras y dirigirlas hacia la membrana timpánica. Consta del pabellón auricular u oreja, que participa en la recepción de la onda sonora comportándose como una antena acústica, y del conducto auditivo externo (CAE), que conduce las ondas recibidas hasta la membrana timpánica que lo ocluye en su parte interna. Por lo tanto, ambas partes tienen un papel funcional distinto y complementario (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

El pabellón auricular es una adquisición evolutiva de los mamíferos, especialmente en aquellos de vida terrestre. Posee un armazón cartilaginoso, de morfología variable según el grupo estudiado, bajo la piel y una musculatura específica que le permite orientarse hacia la fuente sonora para mejorar la captación del sonido. En el caso del hombre, el pabellón auditivo, cuya musculatura es rudimentaria y de acción prácticamente nula (Sabater-Mata, 1992), adquiere una forma ovalada con una serie de repliegues denominados clásicamente hélix, antihélix, trago, antitrago y lóbulo, entre los cuales se sitúa una depresión, la concha, donde se encuentra la entrada del CAE.



**Figura 6:** Esquema general del receptor auditivo. (Adaptado de Pérez Carretero y cols., 1996)

La contribución del pabellón auditivo del ser humano en la recepción sonora es menor que en los animales, dado que en estos posee una movilidad suficiente que permite la orientación del pabellón hacia la fuente de sonido (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). El pabellón auditivo participa sobre todo en un incremento de la percepción de frecuencias medias-altas, menos importantes en el hombre que en los animales. No obstante, en el hombre, el oído externo y el propio cráneo incrementan la percepción en los rangos frecuenciales correspondientes al área conversacional (Durrant y Lovrinic, 1995).

El CAE es un canal osteo-cartilaginoso que se inicia en la concha del pabellón y termina en la membrana timpánica y que tiene funciones de conducción del sonido. La forma en "S" del CAE es determinante para producir incrementos o pérdidas de energía de la onda sonora, dependiendo de la localización de la fuente sonora. La morfología del CAE también está implicada en una cierta protección del receptor auditivo, de manera que los sonidos con mayor amplitud lo atraviesan modificándose mucho, con la consiguiente pérdida de energía (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

El CAE termina, en su porción interna, en la membrana timpánica, doble membrana ecto-endodérmica derivada de la primera bolsa faríngea y de la primera hendidura branquial (Gil-Loyzaga y Pujol, 1992; 1999), la cual sirve de comunicación entre el oído externo y el oído medio.

### **Oído medio**

El oído medio es un sistema cavitario contenido en su totalidad en el espesor del hueso temporal a excepción del segmento faríngeo de la trompa de Eustaquio. Hasta el oído medio se llega desde el exterior por el CAE. Por dentro, en profundidad a esta porción media del oído, se encuentra el oído interno excavado en el peñasco del temporal (Gil-Carcedo, 1995).

El oído medio está compuesto por:

- La caja timpánica.
- El sistema neumático del temporal.
- La trompa de Eustaquio.

En la pared externa de la caja timpánica se encuentra la membrana timpánica que está formada por un estroma fibroso recubierto en su cara externa por epitelio ectodérmico, continuación del epitelio del CAE, y en su cara interna por epitelio mucoso endodérmico (Gil-Carcedo, 1995). El tímpano tiene forma prácticamente circular y en él se pueden distinguir dos partes fundamentales, la *pars tensa*, que ocupa el 90 % de la superficie timpánica y cuyas fibras se condensan en la periferia dando lugar al anillo fibroso de Gerlach que se inserta en el surco timpánico óseo, y la *pars flácida*, en la que prácticamente desaparece la capa media fibrosa, careciendo por ello de una verdadera inserción ósea del tímpano en esta zona (Andrea, 1992).

La membrana timpánica se une al primer huesecillo de la cadena osicular del oído medio, que constituirá el sistema fundamental de transmisión del sonido desde el oído externo al oído interno. El sistema de huesecillos está constituido por tres huesos, martillo, yunque y estribo. El martillo, *malleus*, une su mango y su apófisis externa a la membrana timpánica y contacta con el yunque, *incus*, mediante una articulación de tipo de encaje recíproco de escasa movilidad por la fijación del martillo a la membrana del tímpano, lo que hace que ambos huesecillos se desplacen en bloque. Por otro lado, el yunque se articula con el estribo, *stapes*, mediante una enartrosis, articulación ésta de gran movilidad limitada únicamente por el músculo del estribo. Por último, la platina del estribo se une, mediante el ligamento anular de Rudinger, a la ventana oval coclear (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999; Gil-Carcedo, 1995).

Toda esta estructura se mantiene en su posición gracias a una serie de ligamentos y músculos que por un lado participan en los movimientos de los

huesecillos y por otro los limitan (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). De relevante importancia son los músculos del martillo, o tensor del tímpano, y del estribo, responsables de los reflejos acústico y estapedial, de funcionalidad protectora frente a la llegada de sonidos de alta intensidad. La acción derivada de la contracción de ambos músculos es opuesta. Así, la contracción del músculo del martillo tensa el tímpano al desplazarlo hacia el interior de la caja timpánica y provoca la proyección de la platina del estribo hacia la ventana oval. Por otro lado, la contracción del músculo del estribo desplaza la platina del estribo hacia afuera de la ventana oval induciendo un movimiento lateral del conjunto de huesecillos, destensando la membrana timpánica. La activación conjunta de ambos músculos resulta en una restricción de movimientos de la cadena osicular y, por lo tanto, una pérdida de sensibilidad auditiva para algunas frecuencias (Palomar, 1992 b).

El sistema neumático del temporal es un sistema cavitario constituido por una serie de celdas, el antro mastoideo y las celdillas mastoideas (Avellaneda, 1992; Gil-Carcedo, 1995).

La trompa de Eustaquio es un conducto alargado, que se extiende desde la pared anterior de la caja timpánica hasta la pared lateral de la nasofaringe. Se compone de dos porciones, una porción externa ósea y labrada en la parte inferior del temporal y otra porción interna que es fibrocartilaginosa (Palomar, 1992 a).

Funcionalmente, el oído medio se encarga de:

- La transformación de las vibraciones de las moléculas del aire que forman las ondas acústicas en vibraciones mecánicas que serán transmitidas a través de la cadena de huesecillos a la ventana oval coclear.

- La adaptación de las impedancias del medio externo en el que se transmiten los sonidos al medio líquido coclear en el que se encuentran inmersas las células sensoriales del receptor auditivo. Esta función de

adaptación entre ambos medios es vital en aquellos animales de vida terrestre ya que la diferencia de impedancias entre el medio aéreo externo y el medio líquido del oído interno es muy alta, de hecho el medio líquido presenta una impedancia 40 - 50 veces superior a la del medio aéreo. Este dato sería suficiente para que si las ondas sonoras llegasen directamente a la ventana oval fuesen repelidas sin pasar al interior del receptor auditivo (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). Este complejo mecanismo de adaptación de impedancias se inicia en la membrana timpánica, ya que la diferencia de tamaño entre ésta y la ventana oval coclear, que en el hombre es de 20 / 1, hace que se incremente la presión de entrada de la onda sonora en la membrana oval (Uziel, 1985 b).

- Protección del oído interno frente a sonidos de elevada intensidad que puedan resultar lesivos para el receptor acústico, mediante los reflejos motiles de los músculos del martillo y del estribo, el reflejo acústico y el reflejo estapedial respectivamente. Estos músculos se activan mediante un sistema reflejo bilateral de protección frente a sonidos de alta intensidad, reflejo estapedial, o de intensidad extrema, reflejo acústico (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

- La comunicación del oído medio a la faringe mediante la trompa de Eustaquio, y a las celdillas mastoideas, que permite el mantenimiento de un equilibrio de igualdad de presiones entre el medio externo y el medio aéreo del oído medio. Esto es importante para el mantenimiento de la tensión correcta de la membrana timpánica y, por lo tanto, para la conservación de la funcionalidad del receptor auditivo. Este equilibrio de presiones se mantiene gracias a un proceso rítmico de apertura y cierre de la trompa de Eustaquio mediado por la contracción de los músculos periestafilinos durante la deglución. No obstante, otros procesos esporádicos como el bostezo, el estornudo, la fonación o las

maniobras de Valsalva permiten la apertura de la trompa de Eustaquio y, por lo tanto, el equilibrado de presiones (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

### **Oído interno**

El oído interno se encuentra situado en el interior del peñasco del temporal. Por su complejidad estructural y morfológica se le denomina laberinto, distinguiéndose un laberinto óseo, constituido por una serie de cavidades excavadas en el hueso, y un laberinto membranoso formado por las estructuras alojadas en el laberinto óseo. Se diferencian por su situación un laberinto posterior, que alberga el órgano vestibular o del equilibrio, y un laberinto anterior o cóclea en el que se localiza el receptor auditivo (Gil-Carcedo, 1995).

#### **- Morfología de la cóclea**

La cóclea es un tubo arrollado en espiral alrededor de un eje óseo denominado modiolos, que está perforado interiormente por el canal de Rosenthal, lugar que ocupa el conjunto de fibras nerviosas que inervan el receptor auditivo o ganglio espiral. El número de espiras que describe la cóclea es variable en las distintas especies de mamíferos, siendo en el ser humano de 2.5 espiras (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a). La cara exterior de este tubo está formada por una porción ósea periférica denominada lámina de los contornos. La luz del canal coclear está parcialmente dividida longitudinalmente en dos por una lámina ósea o lámina espiral que se origina en el modiolos y se dirige a la lámina de los contornos sin llegar a contactar con ella. Esta división se completa con la membrana basilar que se origina a nivel del borde libre de la lamina espiral y se inserta en la lámina de los contornos. Así, el tubo coclear queda dividido en dos compartimentos, la rampa vestibular, que contacta con la ventana oval, y la rampa timpánica, que termina en la

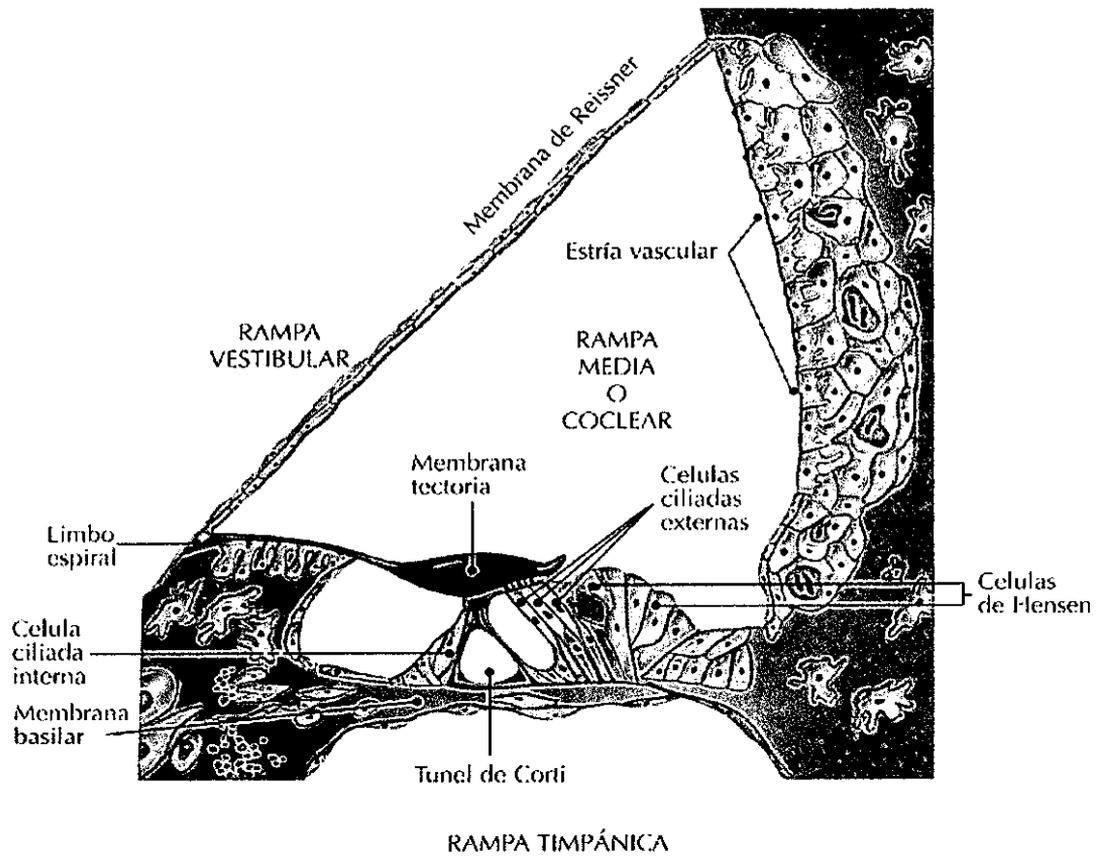
ventana redonda. Estas rampas no están totalmente aisladas sino que se comunican en la zona apical de la espiral coclear, denominada genéricamente ápex, a través del helicotrema. Una fina membrana extendida oblicuamente entre la lámina espiral y la lámina de los contornos, la membrana de Reissner, aísla un tercer compartimento entre la rampa vestibular y la timpánica, la rampa coclear (Uziel, 1985 a).

Las tres rampas cocleares están rellenas por dos tipos de líquidos denominados linfas cocleares. Las rampas vestibular y timpánica poseen perilinfa que es de composición similar a los líquidos extracelulares, con alta concentración de  $\text{Na}^+$  (140-150 mEq/L) y baja de  $\text{K}^+$  (3.5-7 mEq/L), proteínas (1-1.5 g/L) y  $\text{Cl}^-$  (110 mEq/L). La rampa coclear, por otro lado, está bañada en endolinfa que es de características similares a los líquidos intracelulares poseyendo una baja concentración de  $\text{Na}^+$  (1-5 mEq/L), alta de  $\text{K}^+$  (110-145 mEq/L) y de  $\text{Cl}^-$  (130 mEq/L) y muy baja en proteínas (0.3-0.6 g/L). La endolinfa es hiperosmótica (330 mOsm/kg) respecto a la perilinfa (290 mOsm/kg). Esta diferencia de composición iónica entre las dos linfas cocleares induce la presencia de una diferencia de potencial, 100-120 mV, entre ellas que se denomina potencial endococlear (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

La región histológica más importante de la cóclea es la rampa media ya que en ella se encuentra el receptor auditivo propiamente dicho, denominado órgano de Corti (Fig. 7).

Así, la rampa media, de sección triangular, está delimitada por tres caras:

- Por arriba por la membrana de Reissner, fina estructura epitelial de dos capas de células separadas por una membrana basal, que aísla el compartimento perilinfático del endolinfático y con funciones de transporte electrolítico entre las dos linfas cocleares (Uziel, 1985 a).



**Figura 7:** Esquema de la rama media coclear y detalle del órgano de Corti  
(Adaptado de Pérez-Carretero y cols., 1996).

- En la base por el limbo espiral (estructura conectivo-epitelial situada sobre la lámina espiral ósea y que sirve de anclaje interno a la membrana tectoria) y por la membrana basilar. La membrana basilar va aumentando en anchura a medida que se va acercando al ápex, lo que le confiere unas características mecánicas especiales para la discriminación frecuencial del sonido (Uziel, 1985 a). En su seno se encuentra un capilar sanguíneo, el vaso espiral, situado bajo el túnel de Corti, que en los mamíferos adultos suele estar muy estenosado (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a), y sobre ella se asientan, desde el modiolo hacia el exterior, el surco espiral interno, el órgano de Corti y el surco espiral externo.

- La cara opuesta al vértice modiolar está constituida por la estría vascular, que se ancla a la lámina de los contornos por el ligamento espiral. Se trata de un epitelio vascularizado por una compleja red de capilares. Esta rica vascularización le permite una alta tasa metabólica relacionada con la producción, en la rampa media coclear, de la endolinfa contenida en ella (Uziel, 1985 a; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a).

### **- El órgano de Corti**

El órgano de Corti (Corti, 1851) constituye el receptor auditivo de los mamíferos. Se trata de un neuroepitelio especializado que descansa sobre la membrana basilar (Uziel, 1985 a) y que se enrolla en espiral en torno al modiolo en la rampa media coclear. Está constituido por (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a):

- Dos tipos de células neurosensoriales, las células ciliadas internas y las células ciliadas externas.

- Células de soporte entre las que destacan células muy especializadas como las células falángicas o de Deiters, que sustentan a las células ciliadas externas y las células de los pilares, que delimitan el denominado túnel de

Corti, responsables del mantenimiento de la estructura del órgano de Corti, y otras células menos especializadas, pero no por ello menos importantes funcionalmente, como las células de Hensen y las células del epitelio de revestimiento.

Toda esta estructura se encuentra cubierta por una membrana acelular, la membrana tectoria, que participa en la activación de las células neurosensoriales (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Se trata de una estructura compuesta de colágeno, glicoproteínas y glicosaminoglicanos (Gil-Loyzaga y cols., 1985 a y b; 1990; 1991; 1997 a; Khalkhali-Ellis y cols., 1987), que va variando en anchura a lo largo de la espiral coclear aumentando progresivamente desde la base hasta el ápex coclear. Presenta una estructura fibrilar con regiones delimitadas y en su cara basal se anclan los estereocilios de las células ciliadas. Su papel funcional se relaciona con la producción de desplazamientos en los cilios de las células sensoriales y, por lo tanto, con la iniciación de la transducción mecanoeléctrica de la señal sonora, además de constituir un reservorio iónico, sobre todo de  $K^+$ , en equilibrio con la endolinfa (Gil-Loyzaga, 1997 a).

#### **- Células neurosensoriales del órgano de Corti**

El sistema neurosensorial del receptor auditivo está constituido por las células ciliadas del órgano de Corti. Por su situación en él, se distinguen dos tipos, las células ciliadas internas que, formando una hilera a lo largo del receptor, se sitúan en posición modiolar, y las células ciliadas externas que, situadas en posición distal al modíolo, se presentan en tres hileras en toda la longitud del órgano de Corti (Pujol, 1990).

Estos dos tipos celulares presentan, como su propio nombre indica, un penacho de estereocilios en su zona apical que, funcionalmente, serán los responsables de la activación de las células tras la llegada de la onda sonora.

Este hecho supone el comienzo de la transformación de la energía mecánica del estímulo sonoro en energía bioeléctrica, proceso denominado transducción mecanoeléctrica, que será recogido por los elementos neurales del órgano de Corti para pasar el mensaje auditivo al sistema nervioso central (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a).

#### **a) Células ciliadas internas (CCIs)**

Aunque ambos tipos de células ciliadas tienen características neurosensoriales, son las células ciliadas internas (CCIs) las verdaderas células sensoriales implicadas en la audición. Por ello son las únicas responsables de la transmisión al sistema nervioso del mensaje auditivo (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

Situadas en la región interna del órgano de Corti, sustentadas por células de soporte y flanqueadas por las células marginales del surco espiral interno y por los pilares internos de Corti, presentan en su polo apical una zona de mayor densidad al microscopio electrónico, denominada placa cuticular, donde se implantan los estereocilios dispuestos en varias hileras paralelas que dan sensación de una empalizada a lo largo de todo el receptor (Furness y Hackney, 1986). Los cilios más externos son los de mayor longitud, mientras que, hacia el lado interno, los cilios van decreciendo progresivamente (Lim, 1986; Corwin y Warchol, 1991). Los estereocilios se unen por sus caras laterales y por sus polos apicales, mediante puentes fibrilares. Esta unión tiene como consecuencia el desplazamiento en bloque de todos los estereocilios cuando el más largo de ellos es movido por la membrana tectoria (Flöck y cols., 1977). Las CCIs tienen un cuerpo piriforme con un citoplasma más denso que el de las células vecinas y que presenta abundantes organelas. Su núcleo se localiza en la zona central de la célula. En su polo basal presentan los

contactos sinápticos, de tipo Gray I, con las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a).

#### **b) Células ciliadas externas (CCEs)**

Las células ciliadas externas (CCEs) son también células neurosensoriales pero difieren en su cometido funcional de las CCIs, relacionándose con la modulación en la micromecánica coclear.

Se disponen en tres hileras a lo largo de toda la espiral coclear variando su tamaño e incrementándolo progresivamente, desde la base, donde son células pequeñas de tamaño similar a las CCIs, hasta el ápex coclear, donde pueden llegar a medir el doble que las CCIs (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Los estereocilios de estas células se disponen formando ángulos, en forma de "V", con el vértice orientado hacia la estría vascular (Furness y Hackney, 1986). Al igual que en las CCIs, los cilios se disponen en varias hileras, siendo los más cortos los interiores, y están unidos mediante puentes fibrilares de naturaleza glicoprotéica de gran importancia funcional ya que están implicados en la transducción mecanoeléctrica (Remezal y cols., 1993; Gil-Loyzaga, 1997 a; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Tienen un cuerpo cilíndrico con un núcleo situado en posición basal. Poseen, bajo la membrana plasmática, cisternas de retículo endoplásmico liso, denominadas cisternas laminares sublemmales (Brownell y cols., 1985; Prieto y cols., 1986; Gil-Loyzaga y Brownell, 1988), conectadas por puentes protéicos a la membrana celular donde se relacionan con filamentos de actina, espectrina y miosina (Slepecky, 1997). En el polo basal de estas células se encuentran los contactos sinápticos con las fibras aferentes de tipo II del ganglio espiral, de tipo Gray II, y con las fibras eferentes del fascículo medial procedentes del complejo olivar superior.

### **- Inervación coclear**

La cóclea está inervada por tres tipos de fibras nerviosas:

- a) Fibras aferentes que se dirigen hacia los núcleos cocleares del tronco cerebral.
- b) Fibras eferentes procedentes de los núcleos del complejo olivar.
- c) Fibras simpáticas procedentes de la cadena de ganglios cervicales.

En los dos primeros casos, inervarían las células sensoriales del órgano de Corti, y en el caso de las fibras nerviosas simpáticas tendrían una distribución eminentemente perivascular.

#### **a) Inervación coclear aferente**

Las células ciliadas del receptor auditivo están inervadas por fibras aferentes procedentes de neuronas del ganglio espiral o de Corti que se localiza en el canal de Rosenthal del modíolo coclear (Dannhof y Bruns, 1993; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

En el ganglio espiral se han localizado dos tipos de células nerviosas:

- neuronas aferentes de tipo I
- neuronas aferentes de tipo II.

Las neuronas aferentes de tipo I, caracterizadas por ser grandes, bipolares y por poseer una vaina de mielina que envuelve no sólo las proyecciones sino también el soma ganglionar (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a), constituyen el 90-95 % de toda la población neural del ganglio espiral (Spoendlin, 1973; Eybalin, 1993) aunque este porcentaje varía según las especies. La prolongación periférica de estas neuronas, o dendrita, se dirige hacia el órgano de Corti para inervar a las CCIs, atravesando la *habenula perforata*. Estas dendritas se distribuyen ya en el órgano de Corti, bajo las CCIs, de forma radial, formando el plexo espiral interno, contactando con el polo basal de las CCIs, de manera que una sólo neurona de tipo I inerva una

sóla CCI, mientras que cada CCI recibe prolongaciones de unas 10-20 neuronas de tipo I (Eybalin, 1993). Cada uno de estos contactos sinápticos se realiza mediante una sinapsis excitadora Gray tipo I, en las que se observan cuerpos presinápticos rodeados de vesículas sinápticas (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a). El neurotransmisor nominal en este tipo de sinapsis es el glutamato (Puel, 1995).

Funcionalmente, el hecho de que cada CCI reciba contactos de múltiples neuronas de tipo I supone un claro sistema de amplificación neural de la información auditiva, ya que cada pequeño sector coclear se haya ampliamente representado en el ganglio espiral (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

Las neuronas aferentes de tipo I han sido clasificadas en dos o tres subpoblaciones según su tasa de descarga espontánea (Lieberman, 1978; 1980 a; 1982 a y b; Liberman y Oliver, 1984):

- Neuronas de alta frecuencia de descarga espontánea, con mas de 18 descargas / sg.
- Neuronas de media-baja frecuencia de descarga espontánea, con una actividad espontánea entre 0 y 18 descargas / sg.

Por otro lado, las fibras aferentes de tipo II del ganglio espiral, que representan aproximadamente el 5-10 % de la población neural del ganglio, son pequeñas, pseudomonopolares y amielínicas. Sus dendritas, después de alcanzar el órgano de Corti a través de la *habenula perforata*, se distribuyen por el plexo espiral interno y atraviesan el túnel de Corti para alcanzar la base de las CCEs, que constituyen su diana de inervación, donde se ramifican abundantemente. Cada una de estas ramificaciones contacta con una CCE, estableciendo contactos sinápticos Gray tipo II, de manera que una sóla dendrita de tipo II inerva a 15-20 CCEs, mientras que cada CCE recibe un sólo contacto de una fibra aferente de tipo II (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). El

neurotransmisor implicado en estas sinapsis todavía no ha sido identificado definitivamente (Eybalin, 1993), por lo que se desconoce su papel funcional en la fisiología auditiva, aunque se ha sugerido su posible participación en el envío de información al sistema nervioso central sobre la actividad mecánica de las CCEs e incluso podrían constituir un sistema de alarma para situaciones de trauma sonoro.

Las prolongaciones axónicas de los dos tipos de neuronas aferentes del ganglio espiral se reúnen y se dirigen al sistema nervioso central formando el VIII par craneal o nervio auditivo. El destino de estos axones son los núcleos cocleares (Lorente de No, 1933 a y b; Brown y cols., 1988), donde cada uno de ellos se divide en dos ramas, la anterior o ascendente se dirige al núcleo coclear anteroventral (NCAV), mientras que la rama posterior o descendente se proyecta en el núcleo coclear posteroventral (NCPV) terminando en el núcleo coclear dorsal (NCD) (Lorente de No, 1981). La distribución de las aferencias primarias en los núcleos cocleares sigue un patrón de distribución tonotópica que continúa la localización tonotópica coclear, de manera que las fibras procedentes de la base coclear, correspondientes a las altas frecuencias, se dicotomizan en la región más profunda de los núcleos, mientras que aquellas procedentes de zonas cocleares cada vez más apicales se bifurcan en regiones progresivamente más superficiales de los núcleos cocleares. Esta ordenación, basada en la frecuencia de codificación característica de cada fibra, se conserva en el resto de la vía auditiva central. Las fibras que salen de los núcleos cocleares cruzan, en su mayoría, la línea media, constituyendo parte de las tres estrías acústicas, denominadas dorsal, intermedia y ventral. La estría dorsal está formada por fibras procedentes del NCD, de donde salen, enviando colaterales al núcleo del lemnisco lateral, hacia el colículo inferior o tubérculo cuadrigémino inferior. La estría intermedia está formada por fibras procedentes de la región posterior del NCAV que

terminan en los núcleos periolivares. La estría ventral o fascículo del cuerpo trapezoides, que procede de la región anterior del NCAV, proyecta sobre los núcleos del complejo olivar superior desde donde se enviarán fibras, a través del fascículo del lemnisco lateral, hacia el colículo inferior, donde se realiza la integración de la información sobre la localización de la fuente sonora. Las células del colículo inferior envían fibras que se dirigen, en su mayoría, al cuerpo geniculado medial del tálamo ipsilateral en cuyos tres núcleos se analiza el patrón temporal del estímulo acústico. Ya desde este núcleo saldrán axones que proyectarán sobre la corteza auditiva.

#### **b) Inervación coclear eferente**

La inervación eferente coclear proviene de un fascículo nervioso, el haz olivococlear o de Rasmussen (Rasmussen, 1946) que, procedente del complejo olivar superior, sale del cráneo por el nervio vestibular, alcanza al nervio coclear por la anastomosis de Oort y proyecta sus fibras en la cóclea. Este haz olivococlear está compuesto por dos fascículos independientes, el fascículo olivococlear lateral y el fascículo olivococlear medial (Warr, 1975; Warr y Guinan, 1979; White y Warr, 1983; Warr y cols., 1986; Dannhof y Bruns, 1993).

El fascículo medial procede de neuronas situadas en la región medial del complejo olivar superior, concretamente del entorno de la oliva medial y del núcleo ventromedial del cuerpo trapezoides. Estas fibras están mielinizadas inervan ambas cócleas. Así, un 30 % de las fibras del fascículo inerva la cóclea ipsilateral mientras que el 70 % restante de fibras del fascículo cruza la línea media alcanzando la cóclea contralateral (Warr, 1975). En el órgano de Corti establecen contactos axo-somáticos de tipo Gray I con las CCEs (White y Warr, 1983; Guinan y cols., 1984; Pujol y Lenoir, 1986; Warr y cols., 1986; Robertson y cols., 1987; Pujol, 1990; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995), de

modo que cada una de estas fibras inerva alrededor de 10 CCEs. Se trata de sinapsis colinérgicas aunque también se ha encontrado CGRP y su funcionalidad se relaciona con la iniciación y regulación de la contracción lenta de las CCEs (Eybalin, 1993).

Por otro lado, el sistema eferente lateral está formado por fibras procedentes de la oliva superior lateral ipsilateral (White y Warr, 1983; Aschoff y Ostwald, 1987). Son fibras amielínicas y penetran en el receptor auditivo por la *habenula perforata* donde, tras una distribución radial, realizan contactos sinápticos axo-dendríticos Gray tipo II con las fibras aferentes tipo I en el plexo espiral interno (Liberman, 1980 a y b; Ginzberg y Morest, 1984; Pujol y Lenoir, 1986; Liberman y cols., 1990) que pueden ser *en passant*, es decir, contactos laterales del axón eferente sobre la dendrita aferente, o terminales, realizados por el botón terminal de la fibra eferente (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a). Estos contactos sinápticos son más abundantes sobre las fibras aferentes primarias de baja frecuencia de descarga (Liberman, 1980 a; Liberman y cols., 1990). Estas sinapsis tienen diversos neurotransmisores como Ach, GABA, serotonina, dopamina y neuropéptidos como encefalinas, dinorfinas y CGRP (Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995; Gil-Loyzaga y cols., 1997 a y b; 1999 a y c; 2000; Vicente-Torres, 1998; Vicente-Torres y Gil-Loyzaga, 1997; Vicente-Torres y cols., 1996; 1998 a y b; 1999 b).

La vía auditiva descendente (Rasmussen, 1960; 1964; 1967; Harrison y Howe, 1974; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999) se origina en las neuronas de la corteza auditiva, del colículo inferior y del complejo olivar. Desde la corteza auditiva parten tres tractos descendentes: el córtico-geniculado, el córtico-colicular y el córtico-pontino. El tracto córtico-geniculado se origina en neuronas de todas las áreas corticales auditivas y llega al cuerpo geniculado medial (Jones y cols., 1976; Thompson, 1978; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a; Gil-Loyzaga y Pujol, 1999). Las proyecciones entre el tálamo y la corteza

son recíprocas y establecen relaciones homólogas en ambas direcciones (Ramón y Cajal, 1909; Diamond y cols., 1969; Oliver y Hall, 1978 b). El tracto córtico-colicular se origina en el área cortical auditiva primaria y termina bilateralmente en la corteza de ambos colículos inferiores. La corteza auditiva también envía fibras al colículo superior, procedentes de regiones periféricas del área primaria. Ambos colículos envían fibras al núcleo pontino dorsolateral a través del tracto tectopontino (Rasmussen, 1964; van Noort, 1969; Diamond y cols., 1969; Jones y cols., 1976; Oliver y Hall, 1978 a y b; Thompson, 1978). La proyección colículo-olivar, preferentemente ipsilateral, termina en los núcleos periolivares (Saldaña, 1989), donde contactan los axones ascendentes de las neuronas *octopus* (Warr, 1969) estableciendo una interacción entre las vías ascendente y descendente. La proyección colicular sobre los núcleos cocleares es bilateral, de manera que las fibras terminan en la región dorsal de dichos núcleos de manera constante, simétrica y con organización tonotópica y, sobre todo, en el área de dominio de los granos (Saldaña, 1989; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 a; Gil-Loyzaga y Pujol, 1992; 1999).

Los núcleos periolivares del complejo olivar superior contienen las neuronas cuyos axones forman el haz olivococlear descendente, y alcanzan la cóclea innervando las CCEs y las dendritas de tipo I bajo las CClS (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).

### **c) Inervación coclear simpática**

La inervación simpática coclear puede provenir del ganglio cervical superior o del ganglio estrellado (Spoendlin y Lichtensteiger, 1967; Spoendlin, 1984).

El componente que se origina en el ganglio simpático cervical superior (Gil-Loyzaga, 1997 b; Gil-Loyzaga y cols., 1998 a) está caracterizado por

poseer fibras amielínicas que se localizan y reparten por los grandes vasos cocleares, modiolos, ganglio espiral y lámina espiral ósea, sin penetrar, en ningún caso, en el órgano de Corti (Spoendlin, 1981). Pueden tener dos tipos de distribución, consideradas como dos distribuciones periféricas del mismo plexo primario, siendo fibras perivasculares, con una clara misión de control del flujo sanguíneo coclear, o fibras independientes de los vasos que podrían regular la actividad de las fibras sensoriales auditivas. De hecho, su particular abundancia en la región de la *habenula perforata* podría implicar la existencia de alguna influencia simpática en la generación de los potenciales de acción. Esta inervación se considera como la más importante, siendo la procedente del ganglio estrellado irrelevante (Shibamori y cols., 1994).

Por otro lado, el componente de inervación simpática procedente del ganglio cervical inferior o estrellado (Terayama y cols., 1968; Spoendlin, 1984) tiene distribución perivascular y puede tener un posible papel en la regulación del flujo sanguíneo del órgano de Corti mediante adrenorreceptores de tipo  $\alpha$  (Carrasco y cols., 1990), lo cual podría tener relevancia en fenómenos patológicos como la hipoxia-isquemia o el trauma acústico. No obstante, la participación de este componente en la inervación coclear parece ser minoritaria (Gil-Loyzaga y cols., 1998 a).

Las fibras simpáticas son noradrenérgicas (Eybalin y Pujol, 1983; Jones y cols., 1987; Gil-Loyzaga y Parés-Herbuté, 1986; 1989; Gil-Loyzaga y cols., 1998 a; Vicente-Torres y Gil-Loyzaga, 1999), coexistiendo varios neuropéptidos como el CGRP (Merchán-Pérez y cols., 1990 a), neuropéptido Y y la sustancia P.

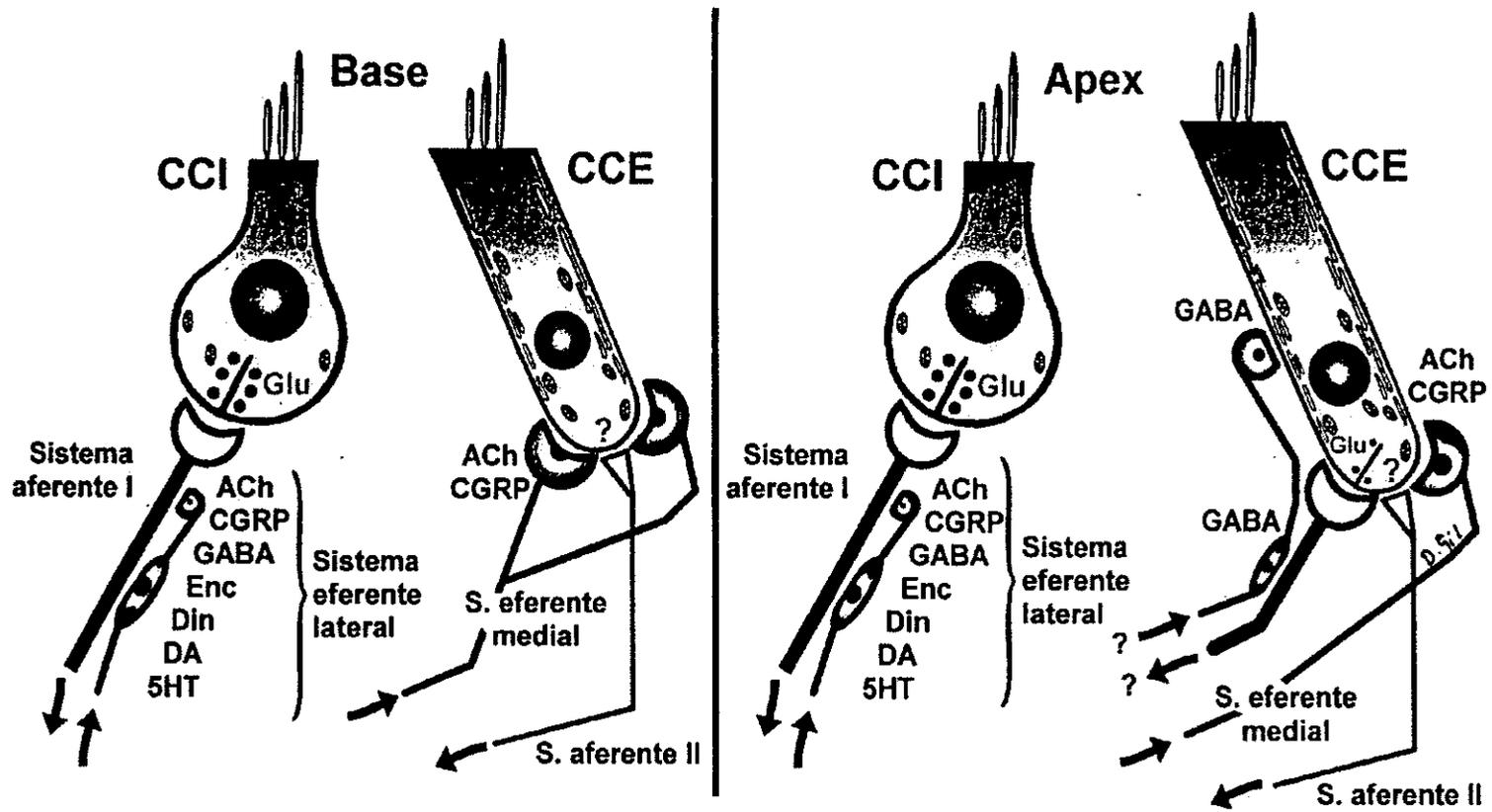


Figura 8: Esquema de los neurotransmisores del receptor auditivo (Adaptado de Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

### **- Neurotransmisores del receptor auditivo**

Se han identificado gran número de sustancias neuroactivas, neurotransmisores y neuromoduladores, en el receptor auditivo de los mamíferos. Todas ellas, con funcionalidad más o menos conocida, participan de manera conjunta en la fisiología coclear, tanto en la transmisión del mensaje auditivo al sistema nervioso central, como en el mantenimiento de un estado de recepción óptima del sistema y en la defensa del mismo frente a situaciones patológicas que podrían dañar irreversiblemente al receptor auditivo. La gran complejidad inherente al sistema de neurotransmisión auditiva hace que para simplificar su estudio se separe la vía aferente de la eferente, sin olvidar que todo ello forma un conjunto funcional indivisible (Fig. 8).

#### **a) Neurotransmisores del sistema aferente coclear.**

Estos neurotransmisores son los implicados en las sinapsis entre las células ciliadas, CCI y CCEs, y las neuronas aferentes del ganglio espiral coclear. Permiten el envío del mensaje auditivo, recogido por las células sensoriales, del sistema al sistema nervioso central. El sistema aferente de neurotransmisión se puede dividir en dos subsistemas:

- CCI y fibra aferente de tipo I.
- CCE y fibra aferente de tipo II.

##### **a.1) Sistema CCI - fibra aferente de tipo I**

El glutamato (GLU) es considerado como el neurotransmisor nominal de la sinapsis entre la CCI y las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, aunque no hay ninguna prueba determinante de que sea el único (Eybalin, 1993). Esta afirmación se apoya en numerosos datos científicos, morfológicos y electrofisiológicos (Godfrey y cols., 1976; Eybalin y Pujol, 1983; 1989;

Schwartz y Ryan, 1986; Bledsoe y cols., 1988; Altschuler y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; Gil-Loyzaga, 1995), que han llevado, además, a la identificación de los receptores glutamatérgicos de los terminales dendríticos aferentes de tipo I. Estos receptores glutamatérgicos, al igual que en el sistema nervioso central, se pueden clasificar en ionotrópicos y metabotrópicos. Estos dos tipos, a su vez, se subdividen en función de la sensibilidad selectiva a diversas moléculas, con independencia de que todos son sensibles a su neurotransmisor nominal, es decir, el GLU (Eybalin, 1993).

Los receptores ionotrópicos son aquellos que tienen asociado un canal iónico, cuya apertura se produce cuando el receptor se activa uniéndose con su neurotransmisor. Se pueden dividir en dos grandes grupos según el agonista principal del receptor: NMDA y no-NMDA (Eybalin, 1993).

El receptor glutamatérgico ionotrópico de tipo NMDA (Moriyoshi y cols., 1991), del que se obtiene su mayor respuesta excitatoria con la aplicación de N-metil-D-aspartato, permite la entrada, por su canal asociado, de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Posee un sitio de reconocimiento para el agonista y otro para la glicina, que actúa como coagonista del GLU aumentando la frecuencia de apertura del canal (Johnson y Ascher, 1987; Felix y Ehrenberger, 1990). Además, en condiciones fisiológicas de inactivación, el canal asociado a este receptor está bloqueado por  $\text{Mg}^+$  (Mayer y cols., 1984; Nowak y cols., 1984; Nicholls, 1993). El desbloqueo del canal se produce cuando la membrana postsináptica ha sido, previamente, despolarizada por la activación de los demás receptores glutamatérgicos, los receptores no-NMDA (Nicholls, 1993). La unión del agonista, la glicina y el desbloqueo del canal iónico hace que la activación de este receptor sea lenta y complementaria a los demás tipos de receptores glutamatérgicos. La administración de NMDA produce una reducción del potencial de acción compuesto cuando éste se registra con estimulación de

alta intensidad (Puel y cols., 1991 a), por lo que parece ser que su activación se produce en condiciones de intensa estimulación del receptor (Ehrenberger y Felix, 1991).

El resto de receptores ionotrópicos glutamatérgicos se engloban dentro de la denominación general de receptores no-NMDA ya que, aunque son igualmente activados por GLU, no son sensibles a la activación por el NMDA. Todos ellos tienen un canal asociado que se abre dejando pasar al interior celular iones y agua, iniciando la despolarización de la membrana que dará lugar al potencial de acción de la fibra. Cada uno de ellos tiene un agonista preferencial por el cual recibe el nombre:

- Kainato (AK).
- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA).
- Ibotenato (IBO).

De ellos, los más estudiados en el receptor auditivo son los receptores para el AK y el AMPA (Bledsoe y Bobbin, 1982; Kusakari y cols., 1984; Jenison y cols., 1986). Su administración induce un proceso excitotóxico en las dendritas aferentes de tipo I, de manera que se produce una disminución del potencial de acción compuesto (PAC) del VIII par (Puel y cols., 1991 a y b; Pujol y cols., 1992 a). Esta disminución del PAC puede llegar hasta la abolición del mismo, acompañado por restos morfológicos de signo edematoso en las dendritas primarias (Pujol y cols., 1985; Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1999 b).

Los receptores metabotrópicos son aquellos que, tras su activación por la unión del agonista al receptor, utilizan segundos mensajeros intracelulares para inducir la despolarización de la membrana celular. Así, se activa la cadena del inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y del turnover del diacilglicerol (Watkins y cols., 1990; Young y Fagg, 1990). En el órgano de Corti este tipo de receptores ha sido poco estudiado pero se ha reportado la presencia de un

tipo de receptor metabotrópico activado por quisqualato, que también activa el receptor ionotrópico AMPA, y ligado a la cascada del  $IP_3$  por medio de una proteína G (Recasens y cols., 1991).

#### **a.2) Sistema CCE - fibra aferente de tipo II**

El neurotransmisor aferente de las CCEs es todavía, hoy, desconocido. Algunos resultados, obtenidos mediante técnicas de inmunocitoquímica, implicarían al GLU en estas sinapsis (Altschuler y cols., 1989), incluso se especula con la posibilidad de que las CCEs estuvieran inervadas por fibras aferentes de tipo I, glutamatérgicas, durante el desarrollo, desapareciendo estos contactos en el adulto (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b). Por el contrario, en estudios de neurotoxicidad, en los que se utilizan agonistas de los receptores glutamatérgicos, como el AK o el AMPA, estas fibras aferentes de tipo II permanecen sin afectar, concentrándose todos los efectos neurotóxicos en las fibras aferentes de tipo I, por lo que parece claro que el neurotransmisor nominal de las dendritas aferentes de tipo II no es el GLU (Pujol y cols., 1985; Jenison y cols., 1986; Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Puel y cols., 1991 a y b; Pujol y cols., 1992 a; Gil-Loyzaga, 1995; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1999 b).

#### **b) Neurotransmisores del sistema eferente coclear.**

En las sinapsis de las fibras eferentes de los haces olivococleares lateral y medial se presentan neurotransmisores considerados clásicos como la acetilcolina, el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), la dopamina y la serotonina, así como sustancias neuroactivas de carácter neuromodulador como las encefalinas, dinorfinas y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Gil-Loyzaga, 1995; Gil-Loyzaga y cols., 1999 a; 2000).

### **b.1) Acetilcolina (ACh)**

Se ha demostrado por métodos bioquímicos la presencia de ACh (Hoffman y Jones, 1988; Hoffman y cols., 1988) y de su enzima de síntesis, la colin-acetil transferasa (ChAT) (Godfrey y cols., 1976; Godfrey y Ross, 1985). Además, mediante técnicas inmunocitoquímicas se ha localizado la ChAT en las fibras de los sistemas eferentes lateral y medial (Altschuler y cols., 1985; Eybalin y Pujol, 1987; Merchán-Pérez y cols., 1994; Gil-Loyzaga, 1995). También han sido detectados receptores colinérgicos postsinápticos, mediante el uso de técnicas inmunocitoquímicas (Canlon y cols., 1989) y electrofisiológicas (Ashmore y Ohmori, 1990), en la membrana basal de las CCEs como los muscarínicos, en concreto los M<sub>3</sub>, ligados a la cascada del IP<sub>3</sub> (Bartolami y cols., 1990; Guimarand y cols., 1990), y los nicotínicos (Plinkert y cols., 1990). Funcionalmente se considera que la ACh podría actuar como modulador de la actividad auditiva mediante la reducción de amplitud del PAC y el incremento de los microfónicos cocleares, probablemente por excitación de las CCEs (Brownell, 1984; Brownell y cols., 1985).

### **b.2) Acido $\gamma$ -amino butírico (GABA)**

La primera evidencia de la presencia de GABA en la cóclea partió de estudios bioquímicos con HPLC (Drescher y cols., 1983), en los que se detectó la liberación del neurotransmisor a la perilinfa coclear, mediante estimulación sonora, por lo que podría resultar de una activación de mecanismos sinápticos (Bobbin y cols., 1990). El GABA está presente en las terminaciones de las fibras del haz espiral interno que contactan con las aferencias de tipo I (Eybalin y cols., 1988; Usami y cols., 1988; Merchán-Pérez y cols., 1993). Por otra parte, se ha demostrado la presencia de receptores GABA tipo A en el polo sináptico de las CCEs (Plinkert y cols., 1989). La incorporación de GABA a las fibras eferentes demuestra que hay fibras GABAérgicas en contacto con

las fibras aferentes de tipo I y las CCEs (Gil-Loyzaga y cols., 1994 a). La distribución coclear de las fibras GABAérgicas es desigual. En las espiras basales, el GABA y su enzima de síntesis GAD se localizan exclusivamente en las fibras eferentes laterales que contactan con las aferentes de tipo I, mientras que en las espiras apicales, además de estos contactos se ha demostrado la presencia de fibras eferentes que contienen GABA que hacen sinapsis con las CCEs (Fex y cols., 1986; Eybalin y cols., 1988; Whilton y Sobkowitz, 1989; Merchán-Pérez y cols., 1990 a, b y c; 1993; Eybalin 1993; Gil-Loyzaga, 1995). En cuanto a la funcionalidad coclear del GABA, la microinyección de GABA en las proximidades del haz espiral interno, provoca una reducción de la frecuencia de descarga de las fibras aferentes, inducida por aminoácidos excitatorios, como el GLU o el NMDA (Felix y cols., 1991), por lo que podría modular la producción del PAC en las fibras aferentes de tipo I, de manera que evitaría daños en la aferencia debido a una excesiva estimulación del receptor auditivo (Eybalin, 1993).

### **b.3) Dopamina (DA)**

La presencia de DA fue detectada por primera vez en la cóclea, utilizando técnicas bioquímicas sobre homogeneizados cocleares (Gil-Loyzaga y Parés-Herbute, 1986; 1989). También se han localizado los enzimas implicados en la síntesis de catecolaminas como la tirosina-hidroxilasa (TH), la aminoácido aromático decarboxilasa (AAD), la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (DBH) y la fenil-etanolamina-N-metil-transferasa (PNMT). La TH se ha detectado en los terminales del sistema eferente lateral (Jones y cols., 1987) y el AAD en el haz espiral interno (Charachon y Eybalin, 1990; Charachon y cols., 1991). Así, la DA podría localizarse en los terminales del sistema eferente lateral bajo las CCI's (Gil-Loyzaga y cols., 1998 a). Por otro lado, la administración de agonistas de los receptores de DA y el análisis bioquímico de la concentración

de DA y de sus metabolitos (DOPAC y HVA), en presencia o ausencia de estimulación sonora, ha permitido identificar la existencia de los receptores de DA, que podrían estar implicados en el control de la liberación de DA desde las fibras eferentes laterales (Gil-Loyzaga y cols., 1993 a; 1994 b; 1998 b; 1999 a; Vicente-Torres y cols., 1993; Gil-Loyzaga, 1995). Se ha sugerido que la DA se comportaría como un neuromodulador que se liberaría en el receptor auditivo en función de la estimulación sonora (Gil-Loyzaga y cols., 1993 a; Gil-Loyzaga, 1995) y, que dicha liberación estaría regulada por receptores dopaminérgicos presinápticos de tipo D<sub>2</sub> (Vicente-Torres y cols., 1993; Gil-Loyzaga y cols., 1994 b).

#### **b.4) Serotonina (5-HT)**

La serotonina ha sido identificada recientemente en la cóclea presentando una distribución similar, aunque con diferencias, a la de las fibras eferentes del sistema olivococlear lateral (Gil-Loyzaga y cols., 1997 a y b; 2000; Vicente-Torres y cols., 1998 a y b). Se observan numerosos botones sinápticos que se organizan en el plexo espiral interno, bajo las CCIs, mientras algunas colaterales de estas fibras alcanzan la primera hilera de las CCEs atravesando el túnel de Corti (Gil-Loyzaga y cols., 1999 a). El papel funcional de la 5-HT es desconocido, aunque sí se conoce que su liberación no parece estar relacionada con la estimulación sonora (Vicente-Torres y cols., 1998 a y b). Este hecho junto con su peculiar patrón de distribución periférica podrían sugerir que las fibras serotoninérgicas forman un nuevo sistema de inervación coclear (Gil-Loyzaga y cols., 1997 a y b; 1999 a y c; 2000; Vicente-Torres, 1998; Vicente-Torres y Gil-Loyzaga, 1997; Vicente-Torres y cols., 1996; 1998 a y b; 1999 b).

### **b.5) Péptidos opioides**

La encefalinas fueron los primeros péptidos opioides que se aislaron en el cerebro (Hughes y cols., 1975). La presencia de encefalinas cocleares fue observada más tarde en cócleas de gato y cobaya adulto (Fex y Altschuler, 1981; Eybalin y cols., 1984) y en el desarrollo del receptor auditivo (Gil-Loyzaga y cols., 1988), identificándose péptidos derivados de la proencefalina como la Met-encefalina, la Leu-encefalina y el octapéptido (Met-encefalina-Arg<sub>6</sub>-Gly<sub>7</sub>-Leu<sub>8</sub>) (Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga, 1995). Estos péptidos se localizan exclusivamente en las fibras eferentes laterales que realizan sinapsis con las aferentes de tipo I (Eybalin y cols., 1983; Eybalin y Pujol, 1984; Gil-Loyzaga y cols., 1988; Eybalin, 1993). Por otro lado, también se ha evidenciado la presencia de dinorfinas, que forman una familia de péptidos cuyo precursor es la prodinorfina. En concreto, varios de estos derivados de la prodinorfina, como las dinorfinas A y B y la  $\alpha$ -neoendorfina, se han encontrado en las fibras eferentes olivococleares del sistema lateral, mediante técnicas inmunocitoquímicas (Abou-Madi y cols., 1987) o de radioinmunoanálisis (Hoffman y cols., 1985) observándose, en éste último caso, que la liberación de dinorfina B a la perilinfa es provocada por K<sup>+</sup> y veratridina (Hoffman y Jones, 1988; Hoffman y cols., 1989). En cuanto a los receptores para los péptidos opioides, su presencia en la cóclea es probable ya que algunos de sus agonistas y antagonistas tienen lugares específicos en homogeneizados cocleares (Hoffman, 1986). En cuanto al papel funcional de los péptidos opioides en la neurofisiología coclear, parece que pueden estar implicados en la modulación de la audición, ya que la liberación de estos péptidos está relacionada con la estimulación acústica, de hecho su concentración perilinfática aumenta en cócleas sometidas a estimulación sonora, 115 dB durante 30 minutos (Drescher y cols., 1983).

### **b.6) Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)**

Se ha propuesto al CGRP como uno de los neuromoduladores del sistema auditivo (Eybalin, 1993) que se localiza en los terminales de ambos sistemas eferentes olivococleares, lateral y medial (Kitajiri y cols., 1985; Sobkowitz y cols., 1988; Merchán-Pérez y cols., 1990 a). Su papel funcional no está bien aclarado. En estudios en la línea lateral de *Xenopus laevis* se observa un aumento de la tasa de descarga espontánea de las fibras aferentes que conectan con las células ciliadas cuando se le administra CGRP (Adams y cols., 1987). Por otro lado, la perfusión intracoclear de CGRP en mamíferos provoca una disminución dosis-dependiente del potencial de acción compuesto (Matsunaga y cols., 1986). Estos datos deben ser comparados con gran precaución debido a las grandes diferencias entre los dos órganos receptores. El CGRP parece tener un papel funcional relacionado con la liberación de ACh, de manera que se trataría de un cofactor de la misma, que facilitaría su acción a nivel postsináptico (Eybalin, 1993).

### **- Fisiología coclear**

La fisiología de la audición comprende todos los procesos implicados en la transmisión del mensaje auditivo desde el oído externo, medio e interno hasta los niveles superiores de la vía auditiva. Mientras que en el oído externo y medio se realiza la conducción y adaptación de la onda sonora, en el oído interno se produce la transducción mecano-eléctrica, mediante la cual se transforma el mensaje auditivo, implícito en las ondas de presión que forman el sonido, en mensaje eléctrico transmisible por las neuronas de la vía auditiva (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

Este proceso de transducción mecano-eléctrica supone, por tanto, el paso más importante y crítico en la recepción sonora, ya que la condición

fisiológica del receptor será la responsable de la correcta transmisión del mensaje sonoro al sistema nervioso central.

La recepción del sonido se realiza en las condiciones físico-químicas concretas que permiten los líquidos laberínticos, perilinfa y endolinfa, en los que se encuentra inmerso el órgano de Corti. Estos líquidos cocleares tienen varias funciones (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b):

- Permiten la transmisión de las ondas de presión sonora, que recibe la membrana oval, a las células sensoriales.

- Establecen un medio iónico adecuado, rico en  $K^+$ , en las zonas de transducción de las células sensoriales.

- Generan entre ellos un potencial de reposo, el potencial endococlear, que participa en los intercambios iónicos durante la activación de las células sensoriales.

- Contribuyen al transporte de nutrientes y gases desde la sangre a los distintos tipos celulares cocleares.

#### **a) Potencial endococlear**

Las diferentes composiciones iónicas que tienen la perilinfa y la endolinfa hace que se genere una diferencia de potencial, el potencial endococlear, entre ambos líquidos que es del orden de 100-120 mV. Es un potencial intrínseco al sistema y es responsable de las características receptoras del mismo, concretamente de la posibilidad de despolarización de las células ciliadas, ya que los canales implicados en el inicio de la despolarización celular se encuentran en los cilios que están bañados en endolinfa, mientras que los cuerpos celulares, implicados en la neurotransmisión al sistema nervioso, están inmersos en perilinfa (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). Todo ello justifica que se trate de un potencial estático que no varíe con la

estimulación sonora y que mantenga al receptor en las condiciones ideales de recepción.

### **b) Mecánica coclear**

Las ondas sonoras que alcanzan el oído externo llegan con pocas modificaciones al oído medio, que es el encargado de transmitir a la cóclea las vibraciones sonoras, adaptándolas para su paso del medio aéreo al medio líquido del oído interno. El oído medio también juega un papel de adaptación para la transmisión correcta de las vibraciones entre la membrana timpánica y la membrana oval coclear, ya que entre ellas hay una diferencia de superficie de 20:1 (Pujol, 1990). En la cóclea, al ser el medio interno líquido y, por lo tanto, incompresible, la vibración de los huesecillos se transforma en una onda de presión que recorrerá el órgano de Corti, produciendo la oscilación de las membranas cocleares y alcanzando la ventana redonda, en la que se produce la disipación de la energía descomprimiendo la onda e impidiendo que se acumule excesiva energía dentro del receptor que, de otra forma, como en el caso de sonidos de alta intensidad con los que este sistema queda sobrepasado, podría resultar lesiva para el receptor auditivo (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

Los movimientos pasivos realizados por la membrana basilar frente a la llegada de la onda sonora se resumen, clásicamente, en dos teorías (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999):

- Teoría de la resonancia, propuesta por von Helmholtz, que indica la existencia, en toda la longitud de la membrana basilar, de unidades o regiones independientes que resonarían exclusivamente a una determinada frecuencia de sonido.

- Teoría de la onda propagada, desarrollada por von Békésy, Premio Nobel en 1961 por este trabajo, en la que se propone que cada sonido inicia

una onda de presión que circularía a lo largo de toda la membrana basilar. Esta onda "viajera" provocaría desplazamientos basilares progresivos estableciendo su máxima amplitud de desplazamiento en una región determinada de la cóclea, característica para cada frecuencia, coincidiendo, en este punto, con la teoría de la resonancia y, luego, disminuyendo su amplitud rápidamente. Así, von Békésy propone que la membrana basilar se comportaría como un analizador frecuencial del sonido realizando, de esta manera, un papel de filtro acústico (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

Ambas teorías, aunque antagónicas, coinciden en la existencia de una distribución espacial, en la membrana basilar, para cada frecuencia de sonido. Esta propiedad, denominada tonotopía coclear, hace que los sonidos de frecuencias agudas se vean representados en las espiras basales, mientras que los sonidos de frecuencias graves se codifiquen en las espiras apicales de la cóclea. Esta característica tonotópica de la cóclea viene dada por los cambios morfológicos del órgano de Corti a lo largo de toda la espiral coclear. Así, en la base del receptor, la membrana basilar y la membrana tectoria son cortas y gruesas, mientras que las células ciliadas son cortas. A medida que nos alejamos de la base coclear la membrana basilar y la membrana tectoria se van elongando progresivamente, al igual que las células ciliadas (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). Incluso se ha llegado a establecer una relación entre la frecuencia codificada y la longitud de las CCEs, de manera que dichas células serían 5  $\mu\text{m}$  más largas cada vez que se desciende una octava en la escala tonal (Pujol y cols., 1992 b).

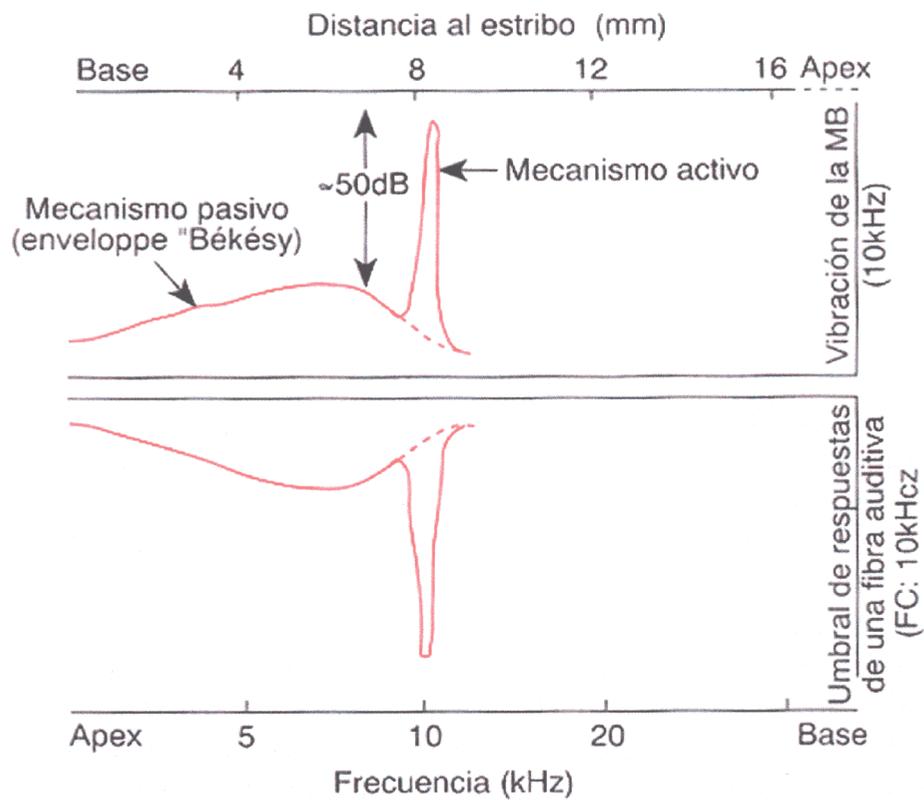
Ambas teorías sugieren mecanismos de movimiento pasivos de la membrana basilar para la consecución de la selectividad frecuencial en la cóclea, en los que se implican solamente las propiedades anatómicas y mecánicas de la cóclea. De hecho, estos modelos se ajustan al comportamiento de cócleas muy alteradas, como aquellas que tienen lesiones

por ototóxicos o las procedentes de cadáveres que fueron utilizadas por von Békésy para sus estudios, y en cócleas sanas bajo estimulación de alta intensidad. La mecánica coclear frente a sonidos de media o baja intensidad no pueden ser explicados con estos modelos de mecanismos pasivos sino mediante la utilización de modelos en los que se impliquen mecanismos activos cocleares (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

**- Mecanismos activos cocleares:**

Este modelo, descrito por Davis en 1983, implica el comportamiento del receptor en la codificación frecuencial de sonidos de baja intensidad, ya que bajo estimulación a altas intensidades los mecanismos pasivos cocleares enmascararían estos procesos activos.

En este modelo se define un segundo filtro para la codificación frecuencial tras la selección previa de frecuencia que realiza la membrana basilar (Durrant y Lovrinic, 1995; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b), ya que cuando se estimula la cóclea con sonidos de frecuencias puras y de baja intensidad sólo un pequeño número de neuronas aferentes del nervio auditivo se activan (Kiang y cols., 1965), menor del que se esperaría en los mecanismos pasivos. Este segundo filtro frecuencial corresponde a las CCEs y su actividad contráctil, ya que cuando se lesionan o se pierden se produce una disminución de la selectividad frecuencial y un notable incremento del umbral auditivo (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b; Carricondo y cols., 1999 b; 2000). Así, las CCEs actuarían como mecanismo activo en la selectividad frecuencial del receptor auditivo y, al mismo tiempo, como elementos amplificadores encargados de reducir el umbral auditivo para los sonidos de intensidad media o baja (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).



**Figura 9:** Esquema de los procesos implicados en la mecánica coclear.  
 (Adaptado de Gil-Loyzaga y Pujol, 1992)

De hecho se ha asociado el fenómeno de las otoemisiones cocleares con la actividad contráctil de las CCEs. Este fenómeno, también denominado eco coclear, se registra mediante un micrófono situado en el CAE sin estimulación, otoemisión espontánea, o después de una estimulación acústica con un tono puro de corta duración, otoemisión provocada (Kemp, 1978). La contracción de las CCEs produciría una onda de presión que al incidir en la membrana redonda coclear produciría un sonido que se registraría con el micrófono situado en el CAE.

### **c) La transducción del sonido a mensaje neural**

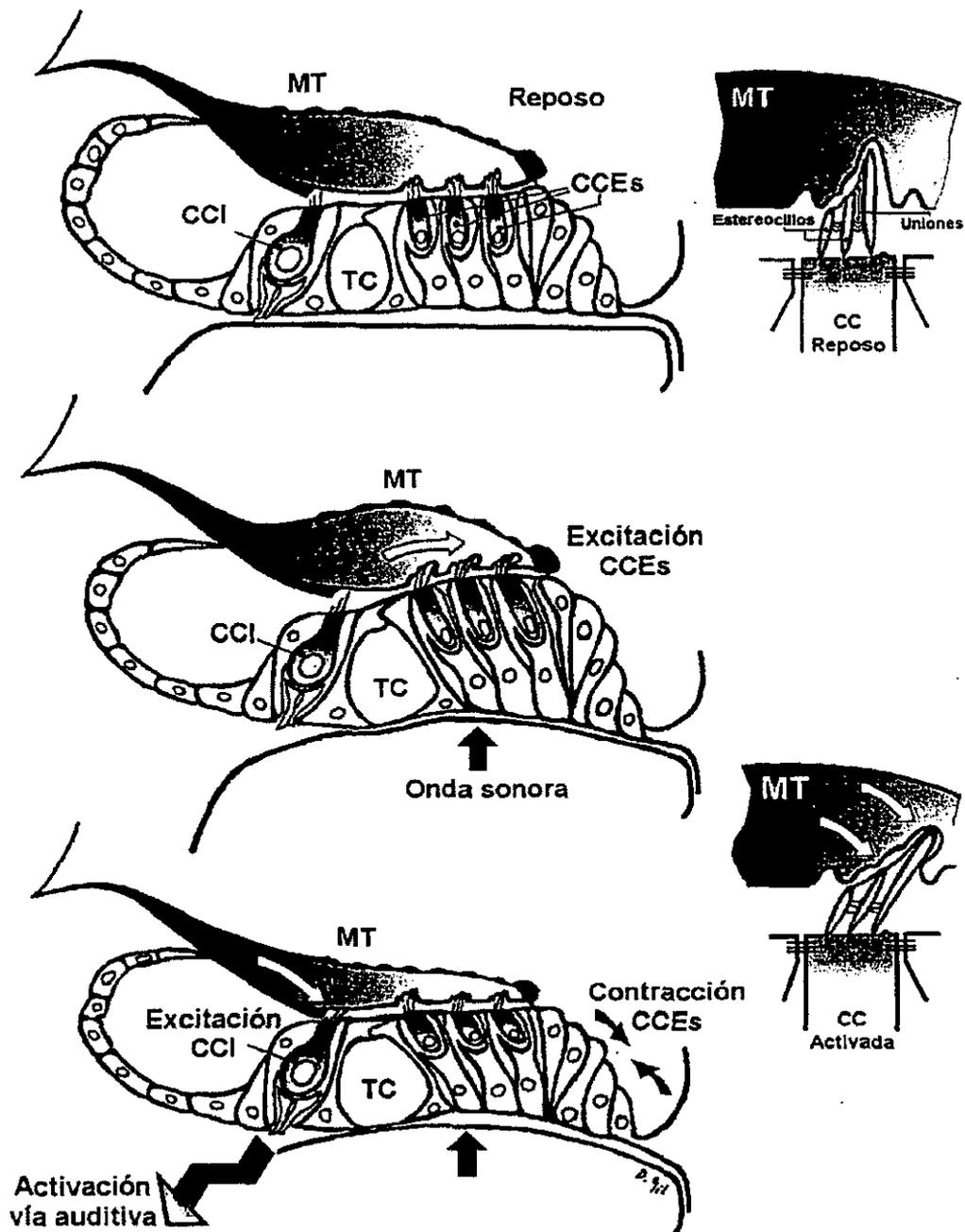
El estímulo sonoro llega a la cóclea produciendo un desplazamiento de la membrana basilar desde la base hasta el ápex. Este desplazamiento provoca la elevación del órgano de Corti hacia la membrana tectoria, haciendo que los estereocilios de las células ciliadas se flexionen (Zwislocki, 1986; Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). El proceso de transducción mecano-eléctrica se produce por la apertura, controlada por el desplazamiento de los cilios, de canales iónicos poco selectivos en su superficie. La alta concentración de  $K^+$  en la endolinfa en la que están inmersos los cilios, hace que este ión entre en la célula ciliada despolarizándola (Russell, 1987). Este tipo de despolarización es excepcional y sólo se produce en las células ciliadas auditivas y vestibulares, ya que en el resto de las células del organismo la activación se produce por la entrada de  $Na^+$  (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). Tras la despolarización, el equilibrio iónico se consigue por la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  voltodependientes y de  $K^+$  de las caras basolaterales de las células ciliadas que están en contacto con perilinfia, por lo que pueden sacar de la célula el  $K^+$  que entró en la despolarización (Hudspeth, 1986; Hudspeth y Lewis, 1988).

La excitación de las CCIs se produce de manera similar a la de las CCEs, aunque la diferencia estriba en que los cilios de las CCEs están anclados a la membrana tectoria, por lo que se mueven junto a ella, mientras que los de las CCIs están libres y se pueden mover por los movimientos de la endolinfa o bien, por el contacto con la membrana tectoria. Por otro lado, la despolarización produce efectos distintos en las CCIs y en las CCEs.

En las CCEs, la despolarización de la membrana celular produce un tipo de potencial, denominado potencial microfónico coclear, que repite en frecuencia y en amplitud el estímulo que lo genera (Carricondo y cols., 1999 b; 2000). Además, las CCEs despolarizadas iniciarán movimientos de contracción que afectarán a todo el receptor y que serán fundamentales en la micromecánica de la cóclea (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b). Presentan dos tipos de contracciones:

- Contracción rápida: Cuantificable en  $\mu$ s, se induce bajo un campo eléctrico o cambiando su potencial de membrana y no presentan consumo de energía (Brownell, 1983; Brownell y cols., 1985). Pueden relacionarse con la amplificación de sonidos de baja intensidad, selectividad frecuencial y con las otoemisiones (Russell, 1987). Funcionalmente, podrían estar relacionados con movimientos electroquinéticos relacionados con la diferente composición glicoprotéica de las caras interna y externa de las CCEs (Gil-Loyzaga y Brownell, 1988).

- Contracción lenta: Cuantificable en ms, parece ser un movimiento de elongación y contracción (Zenner, 1986; Flock y cols., 1986), con gasto de energía, similar a la contracción muscular, ya que se han encontrado en el soma de estas células proteínas contráctiles, actina y miosina, y abundantes mitocondrias. Funcionalmente, podría estar implicada en el mantenimiento de un tono mecánico basal en el órgano de Corti bajo el control del sistema eferente medial (Gil-Loyzaga y Pujol, 1999).



**Figura 10:** Esquema de los procesos contráctiles de las células ciliadas externas (Adaptado de Gil-Loyza y Poch-Broto, 2000 b).

Por otro lado, la activación de las CCl<sub>1</sub>s produce una despolarización de la membrana que provoca la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> volt-dependientes. La entrada de Ca<sup>2+</sup> permite la fusión de vesículas presinápticas a la membrana celular, por acción de proteínas dependientes de este ión, facilitando la liberación del neurotransmisor, el GLU, por exocitosis a la hendidura sináptica (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

Dependiendo de sus características electrofisiológicas, se han identificado varios tipos de canales volt-dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Los canales L, con un alto umbral requiriendo una depolarización intensa para su activación, los canales T, de bajo umbral, y los canales de tipo N, también de alto umbral de activación (Fox y cols., 1987). La liberación de GLU es Ca<sup>2+</sup>-dependiente y, al igual que otros procesos excitóticos, depende de un aporte de energía que proviene de la glicolisis. Al ser un proceso aerobio, es lógico suponer que en condiciones de hipoxia se minimiza la producción de energía, lo que conlleva a la inhibición de la liberación Ca<sup>2+</sup>-dependiente de GLU. Además, la consiguiente disfunción de la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> hace que el gradiente electroquímico de la membrana disminuya, lo que provoca que el transportador del GLU lo revierta hacia fuera de la célula (Sánchez-Prieto y González, 1988), aumentando la concentración extracelular en la hendidura sináptica de GLU, potenciando, de esta manera, los efectos neurotóxicos del neurotransmisor.

El GLU activará los receptores glutamatérgicos postsinápticos de la membrana de la dendrita aferente de tipo I. La apertura de los canales iónicos asociados a los receptores ionotrópicos y la activación de segundos mensajeros intracelulares desde los receptores metabotrópicos, inducen la génesis de un potencial de acción que se irá transmitiendo a lo largo de la membrana de la dendrita, soma y axón de la fibra aferente de tipo I, hasta alcanzar los núcleos cocleares y de ahí hacia el sistema nervioso central (Gil-

Loyzaga y Pujol, 1999). Este potencial de acción en la aferencia de tipo I se verá regulado por las fibras del sistema eferente lateral con las que contactan.

El GLU liberado a la hendidura sináptica sigue un ciclo de recaptación y reutilización. Esta reutilización del GLU puede realizarse por dos vías diferentes:

- Por recaptación directa al terminal presináptico
- Por recaptación a las células gliales próximas

En las células gliales, el GLU es conjugado a glutamina que ya se transporta al terminal presináptico donde se reconvierte a GLU que será reutilizado como neurotransmisor. El aclaramiento de GLU de la hendidura sináptica se realiza mediante un transportador acoplado a  $\text{Na}^+$  situado en la membrana plasmática, manteniendo una concentración extracelular del aminoácido cercana a  $1 \mu\text{M}$  (Kanner, 1983).

La captación de GLU al interior de las vesículas sinápticas es comparable al mecanismo de recaptación de otros neurotransmisores. De forma que, gracias a una ATPasa, se genera un gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  en la membrana vesicular que permite la entrada de GLU como anión a la vesícula. Se especula con la posibilidad de que sea necesaria una baja concentración de  $\text{Cl}^-$  para la correcta funcionabilidad del transportador (Maycox y cols., 1988).

#### **d) Electrofisiología auditiva**

Cada uno de los procesos implicados en la transducción mecano-eléctrica coclear y en la transmisión del mensaje neural producen cambios en los potenciales celulares que pueden ser registrados mediante técnicas electrofisiológicas.

En la cóclea se distinguen dos tipos de potenciales, potencial estático, que es un potencial que no se ve afectado por el mensaje auditivo, es el

potencial endococlear, y los potenciales dinámicos, que son aquellos que se generan tras la estimulación sonora.

Los potenciales dinámicos dependerán del método de registro y del estímulo utilizado. Según esto tenemos diferentes tipos:

- Potencial de sumación: Descrito inicialmente por Davis en 1958, se trata de un potencial muy complejo y que se presenta temporalmente coincidiendo con el potencial microfónico coclear y el potencial de acción compuesto del nervio auditivo. Consiste en una alteración de la línea base de potencial, positiva o negativa, que parece envolver la señal registrada. No se conoce su origen aunque parece estar relacionado con las CCEs (Gil-Loyzaga y Poch-Broto, 2000 b).

- Potencial microfónico coclear (PMC): Se trata de un potencial que reproduce, en frecuencia y amplitud, el sonido que lo genera (Sohmer y Pratt, 1976). Es el primer potencial que se produce tras la estimulación acústica y su intensidad es menor que la intensidad del potencial de acción compuesto coclear (De los Santos y cols., 1998; 1999). Descubierta por Weber y Bray (1930 a, b) corresponde a la actividad fisiológica de las CCEs (Davis, 1958; Spoendlin y Baumgartner, 1977; Russell y Sellick, 1991). Representa el estado del receptor auditivo ya que sólo se presenta en oídos funcionales (Howe, 1935; Carricondo y cols., 1999 b; 2000). Su registro se realiza, clásicamente, mediante la técnica de electrococleografía, es decir, colocando un electrodo en la ventana redonda coclear, y con estimulación discreta tipo click (López Moya, 1992). Esto limita mucho sus aplicaciones clínicas ya que la estimulación ideal para su registro son los tonos puros (De los Santos y cols., 1998; Carricondo y cols., 1999 b; 2000). Así, los primeros en registrar PMC aislados con este tipo de estimulación fueron Gavilán y Sanjuán (1961; 1964) (Ciges, 1992 a). Desde entonces, se han realizado pocos trabajos para el desarrollo de una técnica capacitada para el registro fiable del PMC, pero los trabajos del Dr. Sanjuán

han aportado datos de un nuevo equipo de registro de PMC (De los Santos y cols., 1998; 1999; Sanjuán, 1998; Carricondo y cols., 1999 b; 2000) que aportan fiabilidad en el registro, de manera que se puede aplicar clínicamente en la exploración de la fisiología auditiva.

- Potencial de acción compuesto del nervio auditivo (PAC): Así denominado ya que representa la actividad global del nervio auditivo (Gibson, 1978) (Fig. 11). Se registra mediante la técnica de electrococleografía y corresponde a la señal que se obtiene en los primeros 5 ms posteriores a la estimulación, que se realiza con clicks. Consta de dos ondas negativas, N1 y N2, cuya amplitud aumenta a medida que aumenta el estímulo, es decir, a medida que va aumentando el número de unidades neurales aferentes que crean un potencial unitario para formar el PAC (Ciges, 1992 b). A su vez, la latencia de génesis del potencial aumenta cuando la estimulación baja de intensidad (Gil-Loyzaga y cols., 1999 b).

Por otro lado, los fenómenos bioeléctricos que acaecen a lo largo de la vía auditiva, tras la estimulación sonora, también pueden registrarse con técnicas electrofisiológicas. Son potenciales evocados, es decir, se registran tras la estimulación sonora y van a variar dependiendo de la parte de la vía auditiva que exploran:

- Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral.
- Potenciales de latencia media.
- Potenciales corticales.
- P300 y el contingente de variación negativa (CVN).

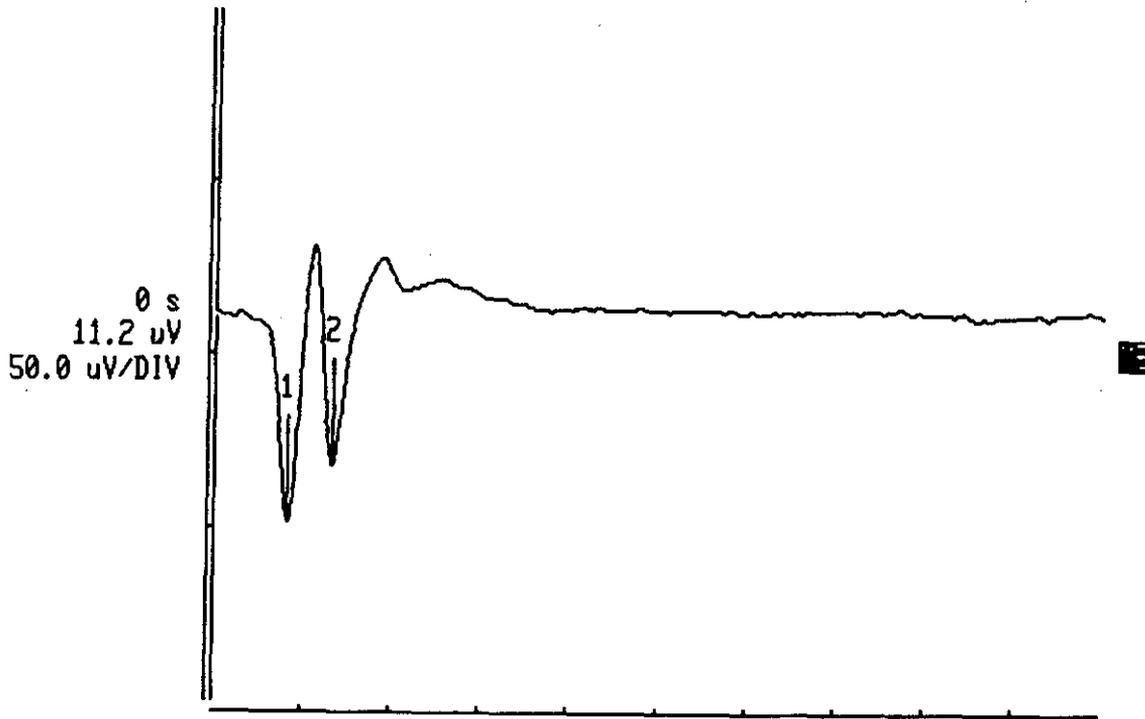


Figura 11: Registro del potencial de acción compuesto del nervio coclear.

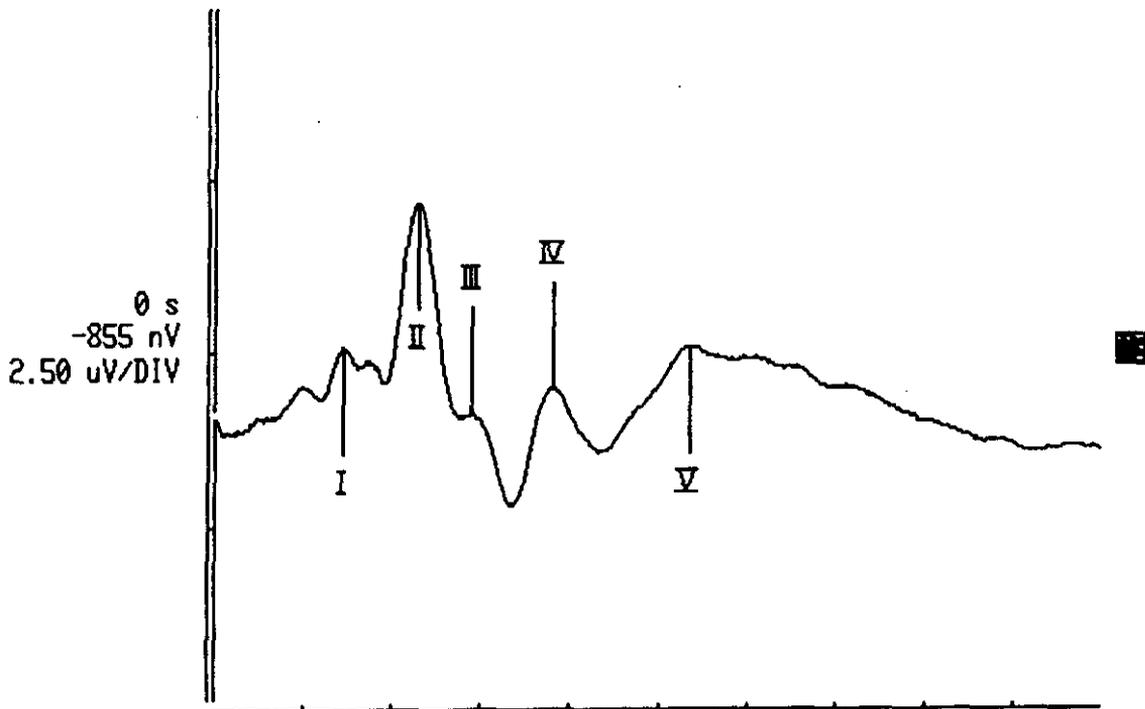


Figura 12: Registro del potencial evocado auditivo de tronco cerebral.

# Rangos de exploración de técnicas audiológicas

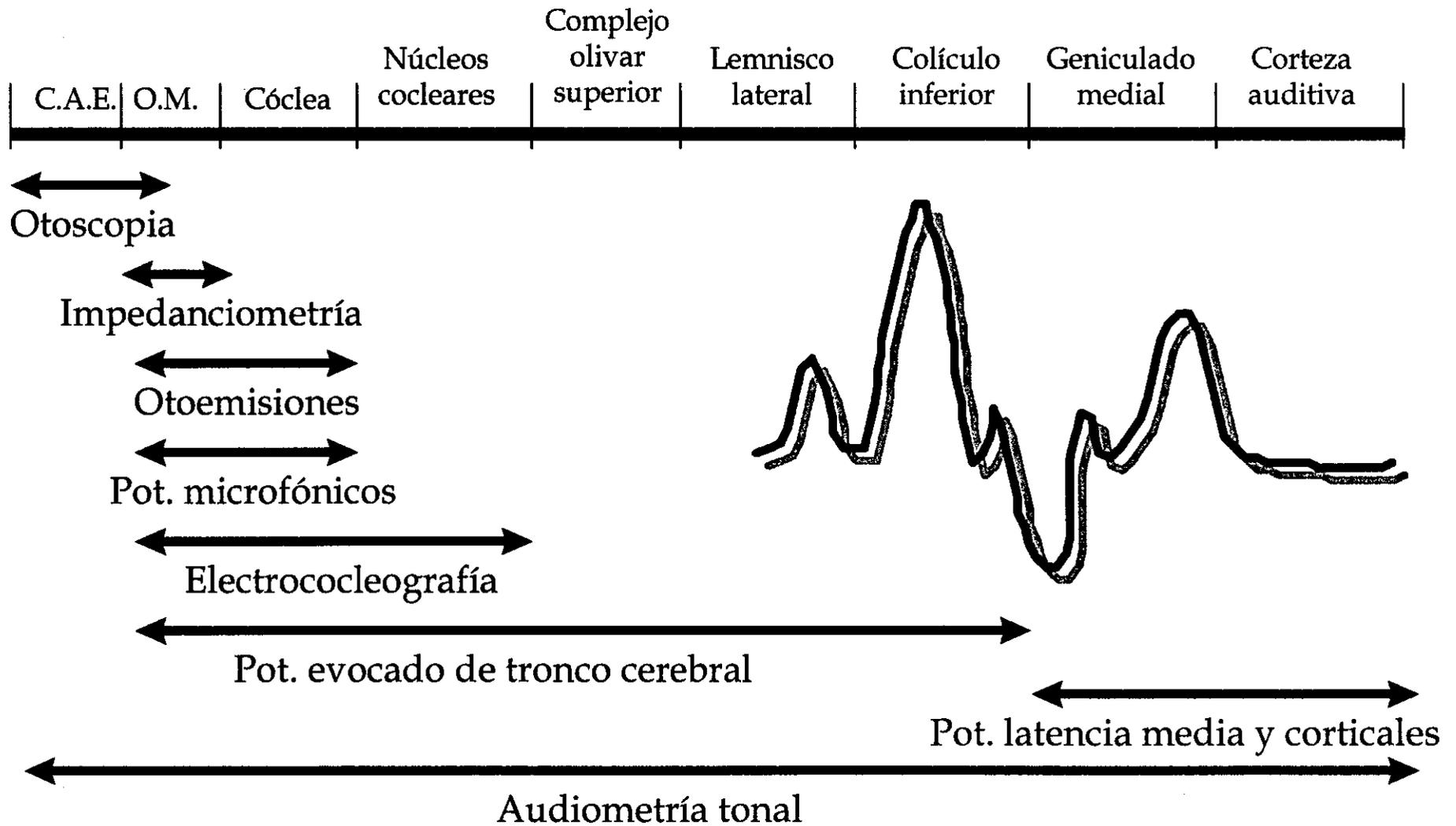


Figura 13

Todos ellos se han utilizado en investigación e, incluso, se han llegado a aplicar en clínica para determinaciones objetivas de umbral auditivo o en la determinación de alteraciones en la vía auditiva (Fig. 13). Actualmente, los más utilizados son los potenciales evocados auditivos de tronco cerebral.

- Potenciales evocados auditivos de tronco cerebral: Representan la actividad bioeléctrica sincrónica de la vía auditiva en los 10 ms posteriores a la estimulación sonora (Fig. 12). Son los más utilizados ya que son muy constantes en el tiempo y en distintos pacientes (Allen y Starr, 1978). Es un potencial de campo por lo que su registro se realiza con electrodos de superficie colocados en ambas mastoides y en vertex. Está compuesto, en la rata, por cinco ondas principales (Shaw, 1987) cuyo origen parece ser:

- 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 de las dos primeras ondas es aceptado por la mayoría de los autores, sin embargo, existen muchas discrepancias con respecto a las demás. A ello se une que estos potenciales dependen de muchos factores como los filtros utilizados, tipo de estímulo y su tasa de repetición, situación e impedancia de los electrodos, etc. (López Moya, 1992).

#### **e) Ontogenia funcional auditiva**

El sistema auditivo periférico de muchos mamíferos no termina de desarrollarse hasta varios días o semanas después del nacimiento (Walsh y McGee, 1986).

Tanto el oído externo como el oído medio determinan la llegada de sonidos al oído interno, por lo que hasta que no se desarrollan no hay llegada de un estímulo efectivo a la cóclea (Simón, 1995).

La cóclea inmadura se caracteriza por un mayor grosor de la membrana basilar, rigidez mecánica, volumen reducido de las rampas, presencia del órgano de Kölliker e inervación inmadura (Pujol y cols., 1979; Shneron y cols., 1982).

El tiempo necesario para alcanzar la madurez funcional depende de la especie. La inervación coclear es inmadura al nacimiento en muchos mamíferos (Jones y Eslami, 1983; Rebillard y Pujol, 1983; Ginzberg y Morest, 1984), estableciéndose los contactos sinápticos en las CCI antes que en las CCEs (Pujol y cols., 1978; Lenoir y cols., 1980 a y b).

Las células del ganglio espiral maduran durante la primera semana postnatal comenzando por la base y terminando por el ápex (Schwartz y cols., 1983; Romand y Romand, 1984), al igual que la mielinización de las fibras (Romand y cols., 1980; Romand y Romand, 1984). La mielinización de las fibras no parece influir, de manera significativa, en el desarrollo de los potenciales auditivos cuando se compara la latencia y la amplitud de la onda I del potencial evocado de tronco cerebral con el grado de mielinización (Walsh y McGee, 1986), proponiéndose la eficacia de las sinapsis de las CCI como el proceso que establece la latencia y amplitud de los potenciales evocados. Por otro lado, durante el desarrollo se produce un aumento de la frecuencia de descarga espontánea de las fibras, una disminución del umbral, un aumento de la selectividad frecuencial (influido por el desarrollo morfológico y de la inervación eferente en las CCEs), un cambio en las características de descarga temporal y un aumento progresivo de la capacidad de respuesta en fase con el estímulo (Carlier y cols., 1975).

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). El PMC puede ser registrado en los días 8-9 postnatales (Crowley y Hepp-Reymond, 1966), mientras que el PAC se puede registrar a los 11-12 días de desarrollo postnatal (Carlier y cols., 1979; Henley y Rybak, 1995).

El desarrollo del potencial endococlear, que ha sido estudiado en gatos (Fernández e Hinojosa, 1974) y en rata (Bosher y Warren, 1971), está constituido por dos períodos de aumento del potencial, el primero de aumento lento y el segundo rápido. Este crecimiento del potencial endococlear se correlaciona con la maduración de la estría vascular.

En general, durante la ontogenia del receptor auditivo deben darse una serie de condiciones previas para la generación del PAC:

- 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 que contiene y se llena de aire hacia el día 11 postnatal, por lo que se puede atribuir la maduración del PMC, en el día 15 postnatal, al desarrollo del oído medio. Sin embargo, la maduración del PAC no se alcanza hasta el 25, por lo que en su maduración deben intervenir procesos neurales (Uziel y cols., 1981).

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

1978). Los cambios en la latencia reflejan el incremento en la eficacia de la transmisión sináptica (Romand y cols., 1976).

Las características adultas del PAC se observan 10 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 15 días y en ratón 5 días. Esto es debido a que los diferentes períodos de gestación da lugar a diferentes estados de maduración del sistema nervioso en el nacimiento (Uziel y cols., 1981).

Por otro lado, los neurotransmisores del órgano de Corti se detectan muy pronto en el desarrollo ontogénico. Con la única excepción de las encefalinas, cuya primera detección acaece en el 10º día postnatal de la rata, todos estos neurotransmisores están presentes con anterioridad al inicio de la audición, así como en la maduración electrofisiológica coclear. De hecho, se puede comenzar a detectar Ach, GABA o CGRP en los primeros 5 días de vida de la rata. Esto implica, por un lado, que estas sustancias neuroactivas estarían preparadas para actuar tan pronto como se pudieran producir los primeros potenciales de acción en el nervio coclear, modulándolos hasta alcanzar sus características adultas. Por otra parte, la aparición precoz de estas sustancias, antes de que el receptor sea funcional, les confiere un papel distinto a la transmisión y modulación de los mensajes auditivos, de manera que podrían actuar como sustancias neurotróficas que estarían relacionadas con el desarrollo correcto del receptor auditivo (Merchán-Pérez, 1992).

### **Patologías cocleares**

Múltiples patologías afectan al receptor auditivo, todas ellas de etiología más o menos conocida y con efectos diversos a lo largo de todo el receptor. A continuación serán comentadas las características de dos de ellas, la neurotoxicidad, como afectación propia de las sinapsis glutamatérgicas, y la

ototoxicidad, en la que la lesión se produce en el epitelio sensorial del órgano de Corti.

#### **a) Neurotoxicidad en el receptor auditivo. Fisiopatología de las sinapsis glutamatérgicas**

El GLU ha sido identificado como el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso participando, por lo tanto, en procesos de transferencia rápida de información (Mayer y Westbrook, 1987; Monaghan y cols., 1989; Nicholls, 1993).

En condiciones patológicas, tales como la hipoxia, la membrana presináptica libera descontroladamente gran cantidad de GLU que activará todos los receptores glutamatérgicos postsinápticos. Esta excesiva activación de la fibra postsináptica induce el comienzo de un proceso neurotóxico, denominado excitotoxicidad (Olney, 1969; 1983), que culminará con la muerte de la fibra.

En los primeros experimentos en los que se puso de manifiesto el concepto de excitotoxicidad se observó que la administración de dosis altas de GLU o cualquiera de sus análogos, en roedores, producía una degeneración neuronal en la retina y otras zonas del sistema nervioso donde no había barrera hematoencefálica. Estos experimentos llevaron a postular que el mismo neurotransmisor que activaba la neurona postsináptica era capaz, a altas dosis, de producir la muerte de la misma (Olney, 1969; 1983).

El mecanismo básico de la excitotoxicidad implica dos procesos consecutivos, cada uno de ellos mediado por un subtipo específico de receptor glutamatérgico. El proceso comenzaría con un aumento de la concentración de GLU en la hendidura sináptica, de forma que los mecanismos naturales de recaptación y regulación, entre los que se encuentran las células gliales, para el neurotransmisor no serían suficientes para eliminarlo del espacio

intersináptico. Este fenómeno produciría la apertura prolongada de los canales iónicos de la membrana postsináptica, responsables de la depolarización del elemento postsináptico, por los que entran en la célula iones y agua. En concreto, la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  al interior celular sucede a través de los receptores no-NMDA intensamente activados por una alta concentración de GLU en la hendidura sináptica. Esta entrada de  $\text{Na}^+$  induce un desequilibrio iónico y una pérdida del equilibrio osmótico en la fibra, que provoca la entrada de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  produciendo un edema en el terminal glutamatérgico (Choi, 1987; Rothman y Olney, 1987). Tras esta activación de los receptores no-NMDA, se produce la activación de los receptores NMDA, por cuyo canal asociado, y liberado el  $\text{Mg}^{2+}$  que lo bloquea voltaje-dependientemente en condiciones de reposo, entra  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular da lugar a la activación de gran cantidad de enzimas, proteasas, fosfatasas, etc., que producen la degeneración y muerte celular (Olney y cols., 1986; Choi, 1987; Mayer y Westbrook, 1987; Rothman y Olney, 1987; Meldrum y Garthwaite, 1990).

Al igual que el sistema nervioso central, el órgano de Corti también puede verse afectado por los efectos de la excitotoxicidad, en concreto las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, cuyo neurotransmisor es el GLU. Por otro lado, situaciones patológicas como la hipoxia, la isquemia y el trauma acústico, presentan en el receptor auditivo lesiones similares, lo que ha llevado a sugerir que pueden tener una base fisiopatológica común en los procesos excitotóxicos (Puel y Pujol, 1992). Consecuentemente, en la cóclea, los edemas dendríticos que se observan tras el comienzo de las condiciones de afección neurotóxica, como el trauma acústico, hipoxia-isquemia o por aminoácidos excitotóxicos, se deben al primer mecanismo antes mencionado, es decir, a la entrada de iones y agua por los canales iónicos asociados a los receptores glutamatérgicos, mientras que las subsecuentes pérdidas de fibras

mielinizadas y neuronas del ganglio espiral estará mediada por mecanismos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes y por la pérdida de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  debida al aumento de concentración del ión en el citoplasma (Eybalin, 1993).

La etiología de estos procesos se basa en la disminución de la presión parcial de oxígeno en el órgano de Corti producida por una reducción del flujo sanguíneo coclear. Así, reducciones del flujo sanguíneo coclear se ponen de manifiesto en situaciones de sobreestimulación acústica mantenida durante 30-60 minutos (Thorne y Nuttall, 1987; Okamoto y cols., 1990).

Las lesiones cocleares producidas por estas patologías neurotóxicas se centran, como ya se ha indicado, en los terminales de las fibras aferentes de tipo I bajo las CCIs, en los que se observan edemas dendríticos e incluso disrupciones de la membrana. Estos patrones de degeneración neural son similares a los observados en animales tratados con agonistas glutamatérgicos, como el AK, AMPA, NMDA o el glutamato monosódico (GMS) (Pujol y cols., 1985; Jensen, 1988; Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Puel y cols., 1991 a; Janssen y cols., 1991; Janssen, 1992; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1999 b), por lo que queda claro que estas alteraciones, de origen excitotóxico, se relacionan con una liberación masiva y, por lo tanto patológica, de glutamato a la hendidura sináptica (Faden y cols., 1989; Eybalin, 1993) y que estos modelos de administración de agonistas glutamatérgicos son válidos para el estudio de estas afectaciones cocleares.

El influjo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  es el principal y responsable último de la degeneración neuronal de origen excitotóxico, producida por la activación prolongada de los receptores glutamatérgicos no-NMDA y NMDA (Weiss y cols., 1990). Así, la liberación de GLU o de cualquier otro agonista glutamatérgico, tras su administración en el animal, provoca en el terminal glutamatérgico la activación prolongada de sus receptores postsinápticos, manteniendo una depolarización continuada de la membrana neuronal (Olney

y cols., 1986), período en el cual los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  postsinápticos están abiertos. Será a través de ellos, principalmente, por donde entrará el  $\text{Ca}^{2+}$  desestabilizando la homeostasis celular e induciendo el proceso neurotóxico.

En condiciones normales, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es inferior a la extracelular gracias a la actuación de tres mecanismos: el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , la ATP-asa  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente y la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en orgánulos citoplásmicos como la mitocondria o el retículo endoplásmico liso. La apertura prolongada de los canales voltaje-dependientes de este ión, en el proceso excitotóxico, constituye el principal camino de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Este aumento de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma activa el sistema ATP-asa  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente, reduciendo esta concentración intracelular pero también disminuyendo los niveles de ATP. Si estas condiciones se mantienen en el tiempo, como ocurre en la excitotoxicidad, la célula acabará entrando en la producción de ATP mediante un sistema de glucólisis anaerobia, produciéndose lactato que acidificará el medio intracelular, afectando mecanismos enzimáticos y mitocondriales como la misma producción de ATP, etc. Todo ello conducirá a una gran lesión neuronal (Matías-Guiu, 1990).

La entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula a través de los canales voltaje-dependientes de este catión divalente es, solamente, uno de los caminos de entrada del ión. Otro sitio de entrada del ión es, por ejemplo, el canal iónico asociado a los receptores NMDA (Weiss y cols., 1990). También puede ser introducido por el intercambiador intramembrana de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que en condiciones normales saca de la célula  $\text{Ca}^{2+}$  introduciendo  $\text{Na}^+$  extracelular, manteniendo la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de la célula, usando el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  mantenido por la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ . En condiciones neurotóxicas, disminuye el gradiente de  $\text{Na}^+$  de la membrana, por la disfunción de la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ , y el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  revierte

su acción introduciendo  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula agravando el proceso excitotóxico llegando a producir la muerte de la célula (Stys y cols., 1991).

Así, la gran mayoría del calcio entra en la fibra a través de los canales ionotrópicos asociados a los receptores NMDA y por los canales voltodependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana postsináptica, dejando a un lado las pequeñas cantidades del ión que se liberan en el citoplasma, en las condiciones de reversión funcional ya comentadas, desde las bombas  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , desde los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, etc.

Resumiendo, existen dos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : los canales voltodependientes que se activan en respuesta a cambios en el potencial de membrana, y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  receptor-dependientes que se activarían cuando un agonista específico se uniese a sus receptores (Delgado y cols., 1990). Según estos datos, el bloqueo selectivo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la fibra en cualquiera de estos puntos de entrada en la célula, durante la afectación neurotóxica, podría suponer la protección de la fibra frente a dicha patología.

De hecho, existen modelos de experimentación en los que la administración de antagonistas de los receptores glutamatérgicos bloquean los procesos de degeneración neuronal (Rothman, 1984; Simon y cols., 1984; Clark y Rothman, 1987; Gill y cols., 1987; Goldberg y cols., 1987; Faden y cols., 1989; Olney y cols., 1989). Por otro lado, en el receptor auditivo también se han utilizado estas sustancias. Así, la administración de DNQX (6-7-dinitroquinoxalin-2,3-diona), antagonista específico de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, protegió los terminales dendríticos aferentes de tipo I del ganglio espiral frente a las lesiones producidas por AMPA (Puel y cols., 1991 b; Pujol y cols., 1992 a). La neurotoxicidad coclear también fue antagonizada mediante la administración de ácido kinurénico, de MK-801 (Janssen, 1992) o de D-AP-5 (Siegel, 1991), antagonistas específicos de los

receptores de tipo NMDA. De hecho, la combinación de antagonistas NMDA y no-NMDA, D-AP-5 y DNQX, protegen totalmente de los efectos neurotóxicos debidos a la inducción de isquemia coclear durante 20 minutos (Pujol y cols., 1992 a).

Por otro lado, en otros modelos experimentales, en parte realizados en nuestro laboratorio (Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; Hernández, 1993; Carricondo, 1995), se ha estudiado la protección derivada del bloqueo selectivo de los canales volto-dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  frente a los efectos neurotóxicos derivados de la administración de agonistas glutamatérgicos. Las sustancias que actúan como bloqueantes de estos canales, también llamados antagonistas del  $\text{Ca}^{2+}$ , previenen la entrada del ión en la célula mediante el bloqueo selectivo de estos canales de tipo L, N o T. Entre los antagonistas más representativos de los canales de tipo L se encuentran el verapamil, que pertenece a las fenilalquilaminas, el nimodipino, de las 1,4-dihidropiridinas y el diltiazem, dentro de las benzotiazepinas (Janis y Scriabine, 1983).

El mecanismo de acción de estos compuestos es variado, aunque es común la inhibición de la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular ya que acortan el tiempo de apertura de los canales. Considerando que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden adoptar tres estados: reposo, activo e inactivo, el  $\text{Ca}^{2+}$  solo entra en la célula cuando el canal está en estado activo, mientras que estas sustancias los mantienen en los otros dos estados, en reposo o inactivos. De esta manera contribuyen a la reducción de la probabilidad de su apertura (Delgado y cols., 1990).

Sin embargo, existen diferencias en su forma de actuación. Así, el verapamilo y el diltiazem, que están ionizados a pH fisiológico, deben atravesar la membrana en su forma no cargada, para alcanzar su receptor en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  desde dentro de la célula, nuevamente cargados. La unión se produce cuando el canal esta en estado activo o inactivo. Por otro lado, las

dihidropiridinas no están cargadas a pH fisiológico, por lo que alcanzarían al receptor en la misma superficie de la membrana, en la superficie externa del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , independientemente del estado del canal, aunque su afinidad por su receptor aumenta cuando está en estado inactivo (Hess y cols., 1984). Por ello, al aumentar la frecuencia de estimulación y, consecuentemente, el mantenimiento de los canales en estado activo o inactivo (bloqueo frecuencia-dependiente), aumenta el efecto del diltiazem y del verapamilo. El mismo efecto se observa en células depolarizadas (bloqueo voltage-dependiente) en las que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  están en estado inactivo. Además, el verapamilo y el diltiazem se disocian lentamente del canal por lo que retardan su activación, lo cual es especialmente marcado en células depolarizadas. Las dihidropiridinas, por su parte, se disociarían a mayor velocidad permitiendo que el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  se reactive antes. Ello explicaría el bloqueo más marcado presentado por el verapamilo y el diltiazem, frente a las dihidropiridinas (Delgado y cols., 1990).

En nuestro laboratorio se han evaluado los efectos protectores de varios de estos bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , el diltiazem y el nimodipino, frente a la neurotoxicidad coclear inducida por la administración de agonistas glutamatérgicos como el AK o el GMS (Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; Hernández, 1993; Carricondo, 1995). Estos estudios demostraron la capacidad de protección de estos productos en la fisiología y la morfología coclear frente al proceso neurotóxico, de manera que la administración del bloqueante del  $\text{Ca}^{2+}$  previa al tratamiento con el neurotóxico disminuyó notablemente la afectación edematosa de las fibras aferentes del ganglio espiral inducida por la acción neurotóxica del agonista glutamatérgico, mientras que el potencial de acción compuesto del nervio coclear recuperó, a su vez, los valores obtenidos en el grupo control.

Hay que decir que estas no son las únicas estrategias de bloqueo de la neurotoxicidad coclear, aunque sí las únicas basadas en el bloqueo directo de la entrada de calcio en la fibra aferente de tipo I. Nuestro laboratorio ha investigado otros modelos de prevención de esta patología como la activación de los terminales axónicos eferentes laterales que contactan con la fibra aferente de tipo I del ganglio espiral. Estas neuronas controlan el paso de potenciales hacia el sistema nervioso central de manera que su activación, mediante la administración de agonistas gabaérgicos, como las benzodiazepinas, o de agonistas dopaminérgicos, como la apomorfina o la bromocriptina, induce la inhibición de la despolarización de las dendritas aferentes y, por lo tanto, de la formación de los edemas dendríticos con la consiguiente capacidad de protección de estas fibras frente al proceso neurotóxico (Jiménez-Ferreres, 1996; Gil-Loyzaga y cols., 1998 b; 1999 a; Vicente-Torres, 1998; Vicente-Torres y cols., 1999 a y b; Jiménez-Ferreres y cols., 1999).

#### **b) Ototoxicidad inducida por antibióticos aminoglicósidos.**

Es bien conocida la capacidad ototóxica de los antibióticos aminoglicósidos (Eybalin, 1993). Esta patología se centra en las células del epitelio sensorial del órgano de Corti, en concreto las primeras que se ven afectadas son las CCEs, y tiene un gradiente de lesión en el tiempo, de manera que la afectación comienza por la espira basal de la cóclea y va avanzando hacia el ápex a medida que aumenta el tiempo de administración del antibiótico (Hawkins y Johnsson, 1981; Wersäll, 1981; Lenoir y Puel, 1987; Bartolomé y cols., 1999 a). Fisiológicamente, se caracteriza por aumentos en el umbral auditivo, disminución de la amplitud del PAC del nervio coclear y del PMC, más evidente en las frecuencias agudas ya que la espira basal coclear

es la más afectada (Nuttall y cols., 1977; Aran, 1981; Dumas y Charanchon, 1982; Puel y cols., 1987; Carricondo y cols., 1999 b; 2000).

El mecanismo de acción asociado a la ototoxicidad consiste en la entrada en la célula del antibiótico, donde se une al fosfatidil-inositol-4,5-difosfato bloqueando la síntesis de los segundos mensajeros inositol trifosfato y diacilglicerol. Secundariamente, este proceso lleva a una inhibición de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  desde su almacén intracelular, es decir, el retículo endoplásmico. El  $\text{Ca}^{2+}$  y el inositol trifosfato tienen importantes papeles en el metabolismo celular con lo que la alteración de estos procesos lleva a las CCEs a un desequilibrio metabólico que puede terminar con la muerte de la célula (Schacht, 1986; Schacht y Zenner, 1987).

Por otro lado, en el desarrollo del receptor auditivo se observan los primeros efectos de los antibióticos ototóxicos en el inicio de la funcionalidad de la cóclea. La ototoxicidad se caracteriza por un período inicial de extrema sensibilidad que es concomitante con la maduración de los potenciales cocleares y la ultraestructura del órgano de Corti. En este período, que está entre el 10° y 25° día postnatal en la rata y el 50° día gestacional del cobaya, la cóclea en desarrollo es lesionada por bajas dosis de antibiótico que usualmente no afectan a la cóclea adulta. Asimismo, cuando se usan concentraciones de ototóxico que afectan a la cóclea adulta, los daños encontrados en el receptor auditivo en desarrollo son mayores que los observados en la cóclea madura (Pujol, 1986).

# ***JUSTIFICACION DEL TRABAJO***

## **Hipótesis**

El receptor auditivo puede verse afectado por distintas patologías, entre las que destacan la neurotoxicidad y la ototoxicidad.

Los procesos neurotóxicos cocleares, de etiología hipóxico-isquémica o de trauma acústico, producen alteraciones en el órgano de Corti que se centran en las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, en las que se producen edemas dendríticos que pueden suponer la ruptura de la membrana celular y la muerte de la fibra. Esta patología está asociada a una intensa activación de la dendrita primaria causada por un aumento de la concentración de glutamato en la sinapsis entre las células ciliadas internas y las dendritas aferentes de tipo I. Este proceso neurotóxico puede producir distintos niveles de afectación en el desarrollo ontogénico del receptor, dependiendo de la sensibilidad del sistema a la neurotoxicidad.

Por otro lado, la ototoxicidad es producida por la administración de antibióticos aminoglucósidos como la gentamicina, kanamicina, etc. Sus efectos se circunscriben a lesiones en el epitelio sensorial del órgano de Corti, concretamente en las células ciliadas externas, en primer término, y en las células ciliadas internas. Al igual que la neurotoxicidad, en el desarrollo del receptor auditivo existen períodos de máxima sensibilidad a los efectos producidos por estas sustancias. Pero al producir, ambas patologías, distintas lesiones en el órgano de Corti, sus efectos sobre los potenciales cocleares podrían ser distintos.

Por ello, la administración de agonistas glutamatérgicos, como modelo de estudio de la neurotoxicidad, y de antibióticos aminoglucósidos, en distintos períodos del desarrollo del receptor auditivo, pueden aportar valiosos datos sobre la evolución de la neurotoxicidad y la ototoxicidad en la fisiología y la morfología coclear durante su desarrollo ontogénico.

## **Objetivos**

**1º.** Estudiar, desde el punto de vista electrofisiológico y morfológico, la evolución de la patología neurotóxica durante el desarrollo ontogénico postnatal del receptor auditivo, mediante la administración de un agonista glutamatérgico, el glutamato monosódico, en diferentes períodos postnatales.

**2º.** Evaluación morfofuncional de los posibles efectos protectores de un antagonista del calcio, el diltiazem, frente a la neurotoxicidad inducida por la administración de glutamato monosódico.

**3º.** Estudio de los efectos morfológicos y electrofisiológicos de la administración de un antibiótico aminoglucósido, la kanamicina, sobre el receptor auditivo de la rata adulta y en desarrollo.

**4º.** Comparación funcional y morfológica de las lesiones cocleares debidas a la neurotoxicidad y las de etiología ototóxica inducida por el tratamiento con antibióticos aminoglucósidos.

## ***MATERIAL Y METODOS***

## 1. MATERIAL

Se utilizaron 96 ratas macho de la cepa Long-Evans en los distintos experimentos propuestos para la realización de esta Tesis Doctoral. Todos ellos estuvieron estabulados en el Animalario Central de la Universidad Complutense de Madrid (CAI-UCM), en habitaciones con la temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (luz a partir de las 08:00 h) y con libre acceso al agua y a la comida. El número de animales y las edades de tratamiento se presentan en forma de tablas de distribución para cada protocolo experimental así como las especificaciones de cada tratamiento en el apartado 2 (ver *METODOS*).

## 2. METODOS

Para la consecución de los objetivos propuestos se diseñaron dos protocolos experimentales independientes.

El **protocolo de neurotoxicidad** se dirigió a la realización de los experimentos referentes a los objetivos 1º y 2º, es decir, el estudio de los efectos en el desarrollo del receptor auditivo de la administración de glutamato monosódico y la evaluación de los efectos protectores del antagonista del  $\text{Ca}^{2+}$  diltiazem.

El **protocolo de ototoxicidad** se diseñó en base al 3º y 4º objetivo, de manera que posibilitó la comparación de los efectos lesivos de origen neurotóxico con los producidos por la ototoxicidad, patología ésta totalmente distinta a la neurotoxicidad, pero que tiene algunos efectos comunes en el receptor auditivo.

## **PROTOCOLO DE NEUROTOXICIDAD**

### **a) Diseño experimental**

En este protocolo se utilizaron 65 ratas pigmentadas de la cepa Long-Evans que se distribuyeron en 15 grupos de tratamiento, según el siguiente diseño experimental:

<b>Período de tratamiento. Días postnatales</b>					
	<b>2-5</b>	<b>6-9</b>	<b>9-12</b>	<b>15-18</b>	<b>30-33</b>
<b>GMS</b>	5	5	5	5	5
<b>DIL+GMS</b>	5	5	5	5	5
<b>CONTROL</b>	2	2	2	2	2

Cada grupo de animales fue tratado, en cada uno de los períodos de tratamiento, bien con neurotóxico (GMS), bien con el antagonista del  $\text{Ca}^{2+}$  (DIL). Los resultados de cada grupo se compararon con los del grupo control. En cada animal se registraron, electrofisiológicamente, las dos cócleas, y sus datos fueron considerados independientes, lo que hace que cada grupo tenga en realidad una muestra de 10 datos ( $n=10$ ), mientras que en el caso de los grupos control sea  $n=4$ .

Los períodos de tratamiento se distribuyeron para el abarcar el estudio de los siguientes procesos de desarrollo ontogénico del receptor (PND: *día postnatal*):

- Período 2-5 PND: Estadío de maduración sináptica aferente.
- Período 6-9 PND: Estadío de maduración sináptica eferente.
- Período 9-12 PND: Comienzo de registro de PMC y PAC del VIII par.
- Período 15-18 PND: PMC y PAC con características adultas.
- Período 30-33 PND: Animales adultos.

Una vez tratados en cualquiera de estos períodos de tratamiento, los efectos producidos en el receptor auditivo fueron evaluados cuando los animales alcanzaron 45 días de edad, considerándolos de esta manera adultos a efectos electrofisiológicos y morfológicos.

### **b) Tratamientos**

Los fármacos utilizados en este estudio han sido:

- Glutamato monosódico (GMS): El GMS (Sigma) fue administrado, por vía intraperitoneal (4 g/Kg), diariamente durante 4 días consecutivos en cada uno de los períodos de tratamiento.

- Diltiazem + glutamato monosódico (DIL+GMS): El DIL (Sigma) se administró por vía intraperitoneal (3 mg/Kg) una hora antes de cada una de las administraciones diarias de GMS.

- Control: Los animales de este grupo, fueron tratados con inyecciones del vehículo de administración, agua destilada, en volumen equivalente y en cada uno de los períodos de tratamiento.

### **c) Estudio electrofisiológico**

Una vez los animales alcanzaron la edad adulta, 45 días postnatales, se comenzó el estudio electrofisiológico coclear (Gil-Loyzaga y cols., 1999 b).

Para ello, los animales fueron anestesiados con una solución de hidrato de cloral al 8% en agua destilada, e introducidos en una cámara anecoica (Stock SA) con una atenuación de 30 dB (SPL) sobre el sonido externo.

A continuación se pasó a preparar al animal para el registro del potencial de acción compuesto (PAC) del nervio coclear, mediante la técnica electrococleográfica. Para ello, se procedió a la realización de una traqueotomía para poder colocar una cánula conectada a un equipo de respiración asistida para pequeños animales (New England Medical

Instruments 141 A). Se mantuvo al animal durante todo el proceso quirúrgico y el registro electrofisiológico a una temperatura constante de 37°C con una manta eléctrica que cubría al animal.

La aproximación a la bulla timpánica, utilizando un microscopio de microcirugía (Leica Wild M715), se realizó mediante una incisión en la zona lateral del cuello y la disección de los músculos digástrico, esternocleidomastoideo y omohioideo, exponiéndose, de esta manera, la zona ventral de la bulla timpánica. En esta superficie se practicó un pequeño orificio con un bisturí, con la finalidad de observar la situación de la cóclea y sus ventanas oval y redonda. En la ventana redonda se coloca un electrodo de plata cubierto de Teflon excepto en los extremos, el electrodo activo, con la punta redondeada para evitar la perforación de la membrana redonda y la salida de perilinfa de la cóclea. El electrodo de referencia se sitúa en la musculatura mandibular del lado ipsilateral a la cóclea registrada y el electrodo neutro, que hace las veces de tierra, en la axila contralateral. Ambos electrodos, el de referencia y el de tierra, son de acero inoxidable e intraepidérmicos.

Tras la colocación de unos pequeños auriculares (Telephonics TDH 39) en la proximidad de ambos oídos del animal, se pasó a la realización del registro del PAC del VIII par. Para ello se utilizó una unidad compacta de potenciales evocados (Mistral, Medelec Int.) conectada a un sintetizador de ondas (Hewlett Packard HP 8904 A). Los estímulos utilizados fueron ondas cuadradas de tipo click, de 100  $\mu$ s de duración a una tasa de 10 clicks/sg, filtradas a 6 frecuencias principales, 22, 18, 16, 12, 8 y 4 KHz, con intensidades decrecientes, para cada una de las frecuencias de estudio, desde 100 hasta 30 dB (SPL), en pasos de 10 dB (SPL). La intensidad del estímulo se calibró mediante un micrófono (Promax CLR-224) conectado a un sonómetro (Promax SI-131 A) situado del auricular a la misma distancia que el

oído del animal, utilizando la escala lineal (SPL) de presión sonora. La estimulación, en campo libre, consistió en 64 estímulos con los que la unidad de potenciales evocados realizó el promedio de la señal bioeléctrica registrada. El registro se realizó en una ventana de análisis de 20 ms, ya que el filtrado de la señal de estímulo para frecuencia por parte del sintetizador produce un retraso de aparición de la onda de 15.4 ms.

En cada registro del PAC, se midieron los valores de latencia y amplitud de la onda N1 del PAC. Los valores obtenidos en los tres grupos de tratamiento, control, GMS y DIL+GMS, fueron distribuidos en gráficas *input-output* para cada frecuencia de estimulación. El conjunto de resultados, de latencia o de amplitud de la onda N1 del PAC, para cada frecuencia y, dentro de ella, para cada intensidad, fue caracterizado por su media aritmética y su desviación estándar. Por otro lado, la comparación de los resultados obtenidos en cada grupo de tratamiento, en cada intensidad y cada frecuencia se realizó mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, con un test de comparación *a posteriori* de Bonferroni.

#### **d) Estudio morfológico**

Tras el estudio electrofisiológico se llevó a cabo la fijación del tejido coclear para realizar el estudio morfológico.

Para ello y bajo anestesia profunda se sacrificó el animal y se extrajeron ambas cócleas, que fueron perfundidas perilinfáticamente con una solución de fijación de glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4. Tras una postfijación en el mismo fijador de 2 horas a temperatura ambiente, se comenzó el proceso de decalcificación en una solución de ácido ascórbico al 1% en NaCl al 0.9%, tras el cual las cócleas se postfijaron en OsO<sub>4</sub> y se incluyeron en Spurr. A partir de aquí se realizó el seccionamiento de la muestra en cortes de 1µm de espesor en un ultramicrotomo (LKB Bromma

8800-III Ultratome). Las secciones fueron teñidas en azul de Richardson y estudiadas y fotografiadas en un microscopio óptico (Leica Leitz DMRB).

### **PROTOCOLO DE OTOTOXICIDAD**

Este protocolo se diseñó para el estudio del comportamiento del potencial de microfónico coclear (PMC) y del potencial de acción compuesto del nervio coclear (PAC), frente a la neurotoxicidad inducida por un agonista glutamatérgico, en este caso el ácido kaínico (AK), y frente a la ototoxicidad inducida por la administración de un antibiótico aminoglucósido, la kanamicina (KANA). En este último caso, se realizaron dos experimentos independientes, uno para el estudio de la ototoxicidad en la rata adulta y otro para el estudio de los períodos más sensibles a la ototoxicidad en el desarrollo del receptor auditivo (Carricondo y cols., 2000).

Para la realización de los tres experimentos incluidos en este protocolo se usaron en total 31 ratas de la cepa Long-Evans distribuidas en los siguientes grupos de tratamiento

**Período de tratamiento. Días postnatales**

	<b>10-13</b>	<b>10-20</b>	<b>Adulto</b>
<b>AK</b>			<b>4</b>
<b>KANA</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>
<b>CONTROL</b>			<b>10</b>

A continuación se desglosarán los materiales y métodos utilizados en cada uno de estos tres experimentos.

### **a) Neurotoxicidad coclear en la rata adulta**

En este experimento se evaluaron los efectos sobre el PMC y el PAC producidos por la administración de AK, para lo cual se designaron los siguientes grupos de estudio:

- Grupo AK: 4 ratas que recibieron una inyección intraperitoneal (5 mg/Kg) de AK (Sigma).

- Grupo control: El grupo control utilizado en este caso para la valoración de los datos del PAC fue el mismo que el utilizado en el protocolo de neurotoxicidad explicado anteriormente

Los animales fueron anestesiados con una solución de hidrato de cloral al 8% en agua destilada, tras lo cual se llevó a cabo el registro electrofisiológico del PMC y del PAC en la cámara anecoica (Stock SA).

En primer lugar se realizó el registro del PMC de los animales sin tratamiento, para lo cual se colocaron tres electrodos intraepidérmicos de aguja de acero inoxidable en ambos músculos mandibulares y en el vertex. El registro del PMC se llevó a cabo usando tonos puros de 4 frecuencias, 4000, 2000, 1000, 500 y 250 Hz (*ver sección: Registro del PMC*). Este registro previo a la administración del AK, permitió la obtención de los valores control para el PMC. Tras este registro se les administró a los animales una inyección intraperitoneal de AK. Al día siguiente, 24 horas más tarde, los animales fueron de nuevo anestesiados para la realización de los registros del PMC y PAC del nervio coclear. El PAC se registró de la misma manera que la expuesta en el protocolo de neurotoxicidad anteriormente. Tras ello, se extrajeron las cócleas y se prepararon para el estudio morfológico mediante el protocolo antes descrito. Las medias aritméticas y la desviación estándar de los valores de latencia y amplitud de la onda N1 del PAC, así como los valores de umbral auditivo del PMC y del PAC, fueron graficados y comparados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía con un test *a posteriori* de Bonferroni.

### **b) Ototoxicidad en la rata adulta**

En este experimento se utilizaron 5 ratas adultas a las que se les realizó un registro de PMC previo al tratamiento con el antibiótico aminoglucósido elegido, la kanamicina (Sigma) en dosis diarias de 300 mg/Kg. La KANA fue administrada diariamente a los animales mientras que se fue realizando regularmente el registro del PMC a lo largo del experimento. El tratamiento diario con KANA se alargó en el tiempo hasta que desapareció totalmente el PMC, hecho que acaeció en el 22º día de administración. En este día se realizó el registro del PAC y se sacrificaron los animales para realizar la extracción de las cócleas y el procesado morfológico antes descrito. Los valores de umbral auditivo para el PMC en las distintas frecuencias y a lo largo del período de tratamiento fueron graficados para poder observar la evolución de este potencial durante la administración de KANA.

### **c) Ototoxicidad en la rata en desarrollo**

En este experimento se utilizaron un total de 12 ratas de 10 días de edad distribuidas en dos grupos de estudio:

- 10-13 pnd: 6 ratas a las que se les administró por vía intraperitoneal KANA, 300 mg/Kg, diariamente en el período comprendido entre el 10º y el 13º día postnatal (pnd).

- 10-20 pnd: 6 ratas a las que se les administró por vía intraperitoneal KANA, 300 mg/Kg, diariamente en el período comprendido entre el 10º y el 20º pnd.

Cuando los animales alcanzaron la edad adulta (45º pnd) fueron anestesiados y se llevaron a cabo los registros del PMC y del PAC del nervio coclear. Tras estos registros los animales fueron sacrificados y las cócleas extirpadas para poder realizar el estudio morfológico.

#### **d) Registro del potencial microfónico coclear**

Este análisis fue llevado a cabo utilizando un nuevo equipo de registro del PMC, diseñado por el Dr. Julio Sanjuán Juaristi. Este protocolo de ototoxicidad permitió la constatación de la fiabilidad del registro y, por otro lado, el estudio de la afectación sobre el PMC de la administración del antibiótico aminoglucósido.

Este nuevo equipo de registro de PMC (PM/97, Electrónica General Española SL) está compuesto por dos unidades independientes. La primera es la unidad de estimulación, con la que se controla, en frecuencia y en intensidad, el estímulo con el que se registrará el PMC. La segunda unidad es la más compleja ya que es la que recoge, filtra, amplifica y promedia el potencial bioeléctrico registrado. Esta segunda unidad incluye los electrodos, un preamplificador diferencial, un amplificador y el ordenador con su software particular para el promediado de la señal (Fig. 14).

El registro del PMC se basa en la principal propiedad del PMC, es decir, en la capacidad de este potencial de repetir fielmente, en frecuencia y amplitud, el sonido que lo genera.

El PMC es registrado mediante electrodos de superficie. En el caso de estos experimentos se utilizaron para mejorar la señal registrada electrodos de acero inoxidable intraepidérmicos de aguja, pero cuando se registran humanos se utilizan electrodos de superficie, en forma de disco, que se colocan pegados en la piel. Los electrodos se sitúan en la musculatura mandibular de ambos lados, mientras que el electrodo de tierra se sitúa en el vertex. Los tres electrodos se conectan a un preamplificador diferencial, que registra la señal bioeléctrica. Este preamplificador al ser diferencial, discrimina solamente aquellos potenciales que pasan por uno de los dos electrodos activos, de manera que aquellas señales de inducción o ruido ambiente que entren a la

vez por estos dos electrodos serán eliminadas. Además, el preamplificador filtra las señales cuya frecuencia está entre los límites de registro del equipo, es decir, entre 4000 y 250 Hz, lo que constituye el primer sistema de discriminación de la señal del PMC.

En esta etapa del registro, la relación entre el PMC y el ruido que enmascara la señal microfónica, no es buena. El conjunto de señales que pasen por el preamplificador diferencial, situadas entre 4000 y 250 Hz, llegan al amplificador donde son específicamente filtradas, de manera que se discrimina la parte de la señal que posea la misma frecuencia que la del sonido estimulante. Para ello, el amplificador tiene potentes filtros de paso alto y de paso bajo (90 dB por tercio de octava en ambos lados), que seleccionan las señales bioeléctricas cuya frecuencia coincide con la del estímulo, dentro de las que tiene que estar la señal del PMC, rechazando el resto de señales de distinta frecuencia que componen el ruido que enmascara el PMC.

El mayor problema técnico surge en este momento, es decir, la identificación del PMC entre toda la señal filtrada a una frecuencia determinada por el amplificador. Para ello, se utiliza una característica del PMC que es que se genera en fase con el sonido estimulante. De manera que el PMC será, dentro de la señal, aquel que esté en fase con el estímulo. Para discriminarlo, se marca el estímulo con una señal de comienzo en cada ciclo de las ondas del estímulo, un *trigger*, que el promediador identifica, de manera que selecciona aquellos potenciales bioeléctricos en fase con el *trigger* y por lo tanto con el estímulo. Esta sincronización de la actividad de las CCEs y el estímulo hace posible el promediado de la señal del PMC con el software del ordenador.

Todo ello es tan complejo porque la señal estimulante utilizada en este tipo de registro no es la habitual, es decir, no son estímulos transitorios como el click, sino que el estímulo es un tono puro continuo. Esto tiene que ser así,

porque los auriculares no reproducen correctamente los sonidos transitorios como el click (Fig. 15).

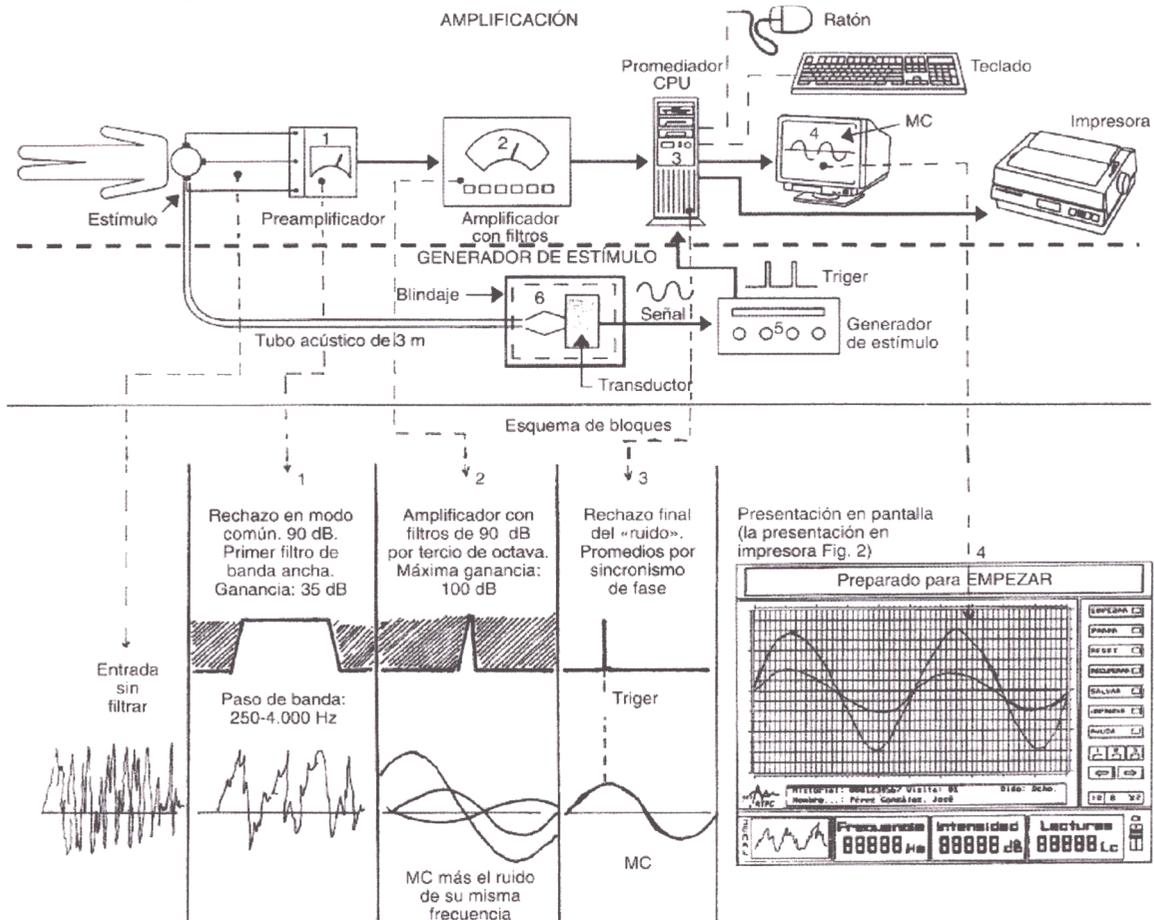
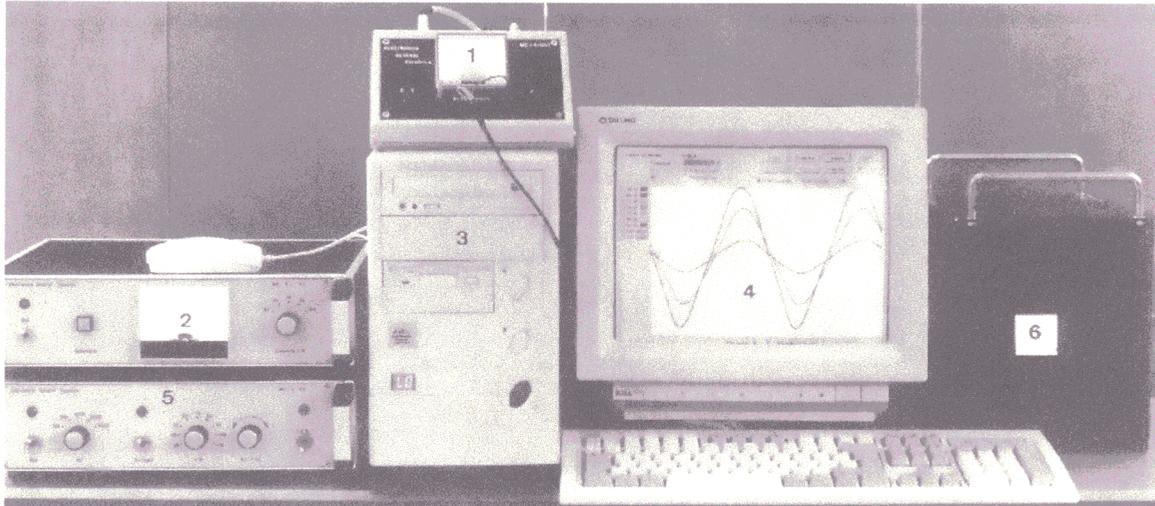
La membrana del altavoz que intenta reproducir un click, al tener una masa, tiene una inercia que impide reproducir fielmente la brusca rampa de subida y de bajada del click, formando una respuesta tardía y llena de reberveraciones incontrolables desde el punto de vista de discriminación frecuencial de la señal. Con un sonido de estas características, el PMC creado carece de la especificidad frecuencial que se pretende para el estudio. Esto no quiere decir que la estimulación con sonidos transitorios sea inútil, sino que para poder extraer con esta estimulación información frecuencial se necesitan costosos equipos de análisis espectral del potencial registrado. Por ello, en este nuevo equipo se utilizan tonos puros continuos como sonido estimulante y la promediación es en tiempo real.

Así, el estímulo que se utiliza en este equipo son tonos puros continuos de cuatro frecuencias: 4000, 2000, 1000, 500 y 250 Hz, estimulación que recorre ampliamente el espectro frecuencial auditivo humano en la zona conversacional. Los estímulos se realizan a diferentes intensidades, de 110 dB a 30 dB, en pasos decrecientes, de 10 en 10 dB, para buscar el umbral auditivo para el PMC.

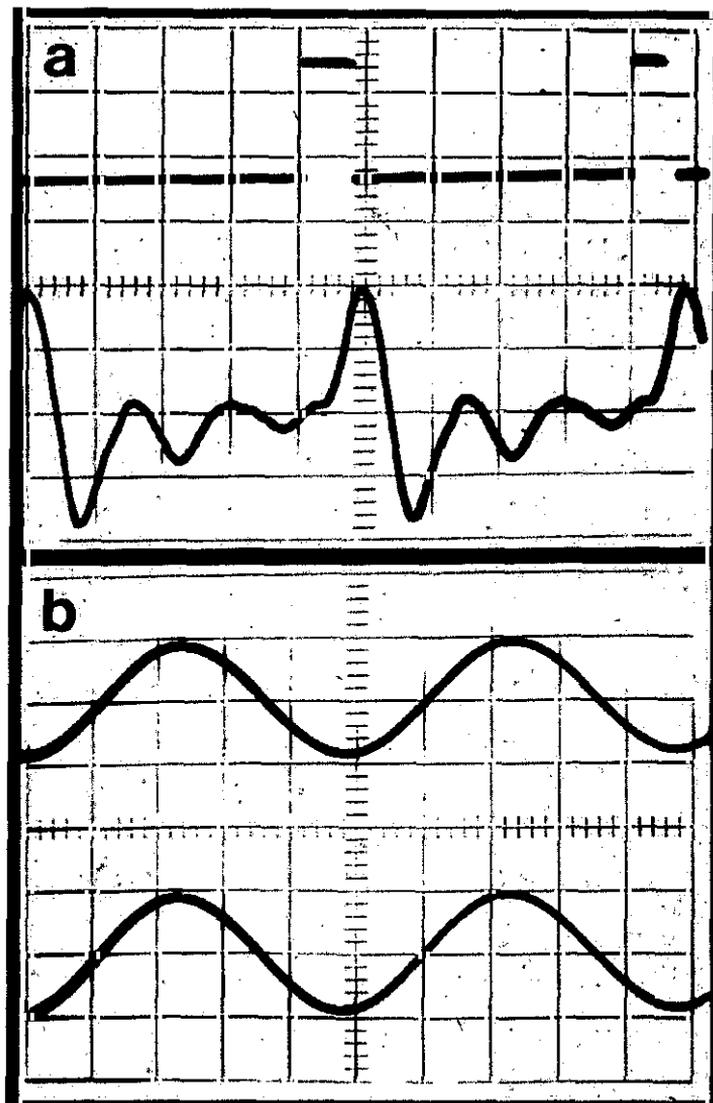
La señal eléctrica del tono puro estimulante es convertida en sonido por un transductor. Este transductor es un elemento electromagnético que produce un fuerte campo magnético de la misma frecuencia que el sonido estimulante y, además, es sincrónico con el estímulo. Esto es un problema añadido para el registro del PMC ya que este campo magnético puede introducir artefactos en la señal bioeléctrica recogida y contaminar el registro. Para evitar este problema, el transductor debe ser aislado y alejado de los electrodos, de manera que la estimulación se realizará conectando un tubo de plástico al transductor y conectando su parte terminal al oído del paciente. En el caso de

las ratas, el tubo termina en un cono en cuyo vértice se coloca un tubo de calibre similar al del conducto auditivo externo, de manera que la estimulación se realiza en campo cerrado. Antes de proceder a los registros de PMC, la intensidad sonora se calibra con un sonómetro.

Una vez registrado el PMC para cada una de las frecuencias de estímulo, los resultados pueden ser impresos para su estudio posterior.



**Figura 14:** Esquema del equipo de registro de potenciales microfónicos cocleares (Tomado de Sanjuán, 1998)



**Figura 15:** Imágenes de osciloscopio que representan el comportamiento a la salida de un altavoz de un estímulo tipo click (a) y de un estímulo en forma de tono puro continuo (b). El click (a) produce a la salida del altavoz una serie de reverberaciones de frecuencia incontrolada, mientras que el tono puro continuo (b) es fielmente reproducido por los altavoces.

# ***RESULTADOS***

## **NEUROTOXICIDAD EN EL DESARROLLO DEL RECEPTOR AUDITIVO**

A continuación pasaremos a comentar los resultados obtenidos tras la realización del protocolo de neurotoxicidad propuesto en el apartado de *material y métodos*.

En todos los grupos de tratamiento los resultados, tanto electrofisiológicos como morfológicos, serán comparados con los del grupo control (Fig. 16).

### **a) Período del 2º al 5º día postnatal.**

La administración intraperitoneal de GMS en el período comprendido entre los días 2º y 5º de vida de la rata, produjo una serie de efectos electrofisiológicos sobre el PAC del nervio auditivo, que redundaron sobre todo en la amplitud de la onda N1 del PAC.

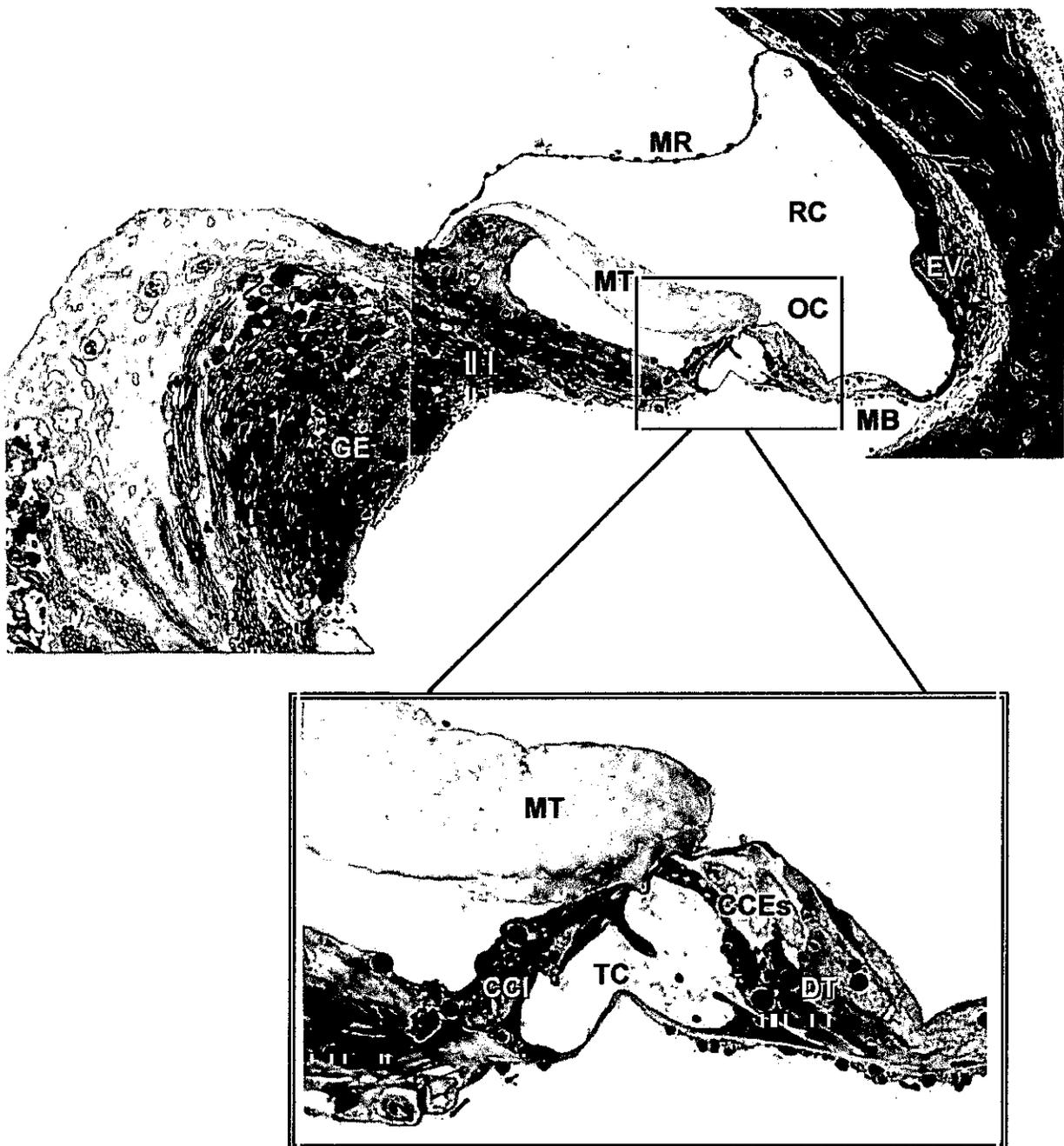
Así, la latencia media de la onda N1 del PAC (Fig. 17), medida a partir de todos los registros de estos animales tratados con GMS, no presentó variaciones significativas respecto a las obtenidas en el grupo control. Solamente, en los registros con estimulación con clicks filtrados a 22 KHz se observó un aumento de la latencia obtenida en el grupo de administración con GMS en las intensidades de estimulación más altas. La administración previa de DIL a la de GMS tampoco produjo variaciones significativas de la latencia de la onda N1 del potencial a ninguna de las frecuencias estudiadas frente a las obtenidas en el grupo control ni con las del grupo de tratamiento con GMS.

En cuanto a la amplitud de la onda N1 del PAC (Fig. 18), la administración de GMS en este período de vida postnatal produjo una disminución significativa de dichos valores de amplitud frente a los valores obtenidos en el grupo control en todas las frecuencias de estudio. Por otro lado, la administración previa de DIL a la de GMS indujo una recuperación de

estos valores de amplitud obtenidos en los animales del grupo de GMS. Estos resultados obtenidos en los animales del grupo DIL+GMS no llegaron a ser tan altos como los obtenidos en el grupo control pero sus diferencias disminuyeron significativamente.

En cuanto al estudio morfológico de las cócleas de los animales tratados en este período de estudio, la administración de GMS (Fig. 19) no produjo grandes alteraciones en la morfología del receptor auditivo. Así, en el órgano de Corti (Fig. 19 b) se observaron pequeños edemas dendríticos en la base de las CCIs, mientras que en el resto del epitelio sensorial no se apreciaron alteraciones reseñables. En el ganglio espiral de la cóclea (Fig. 19 c) se observaron pequeños huecos entre las neuronas del ganglio, que representan espacios vacíos dejados por neuronas muertas.

En las imágenes obtenidas de las cócleas procedentes de animales que fueron tratados con DIL+GMS (Fig. 20) se observó una disminución de los edemas dendríticos de las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral en la base de las CCIs que se presentan en el órgano de Corti de los animales tratados solamente con GMS (Fig. 20 b). Por otro lado, en el ganglio espiral se observa un número discreto de espacios vacíos entre las neuronas del ganglio, consecuencia de la pérdida de unidades neuronales tras el tratamiento (Fig. 20 c).



**Figura 16:** Imágenes de microscopía óptica de la rampa media coclear y del órgano de Corti procedentes de una cóclea de un animal del grupo control. Se observa la morfología normal del receptor auditivo. (CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; DT: células de Deiters; EV: estria vascular; GE: ganglio espiral; MB: membrana basilar; MR: membrana de Reissner; MT: membrana tectoria; OC: órgano de Corti; RC: rampa coclear; TC: túnel de Corti).

## Período 2-5 pnd. Latencia onda N1 del PAC

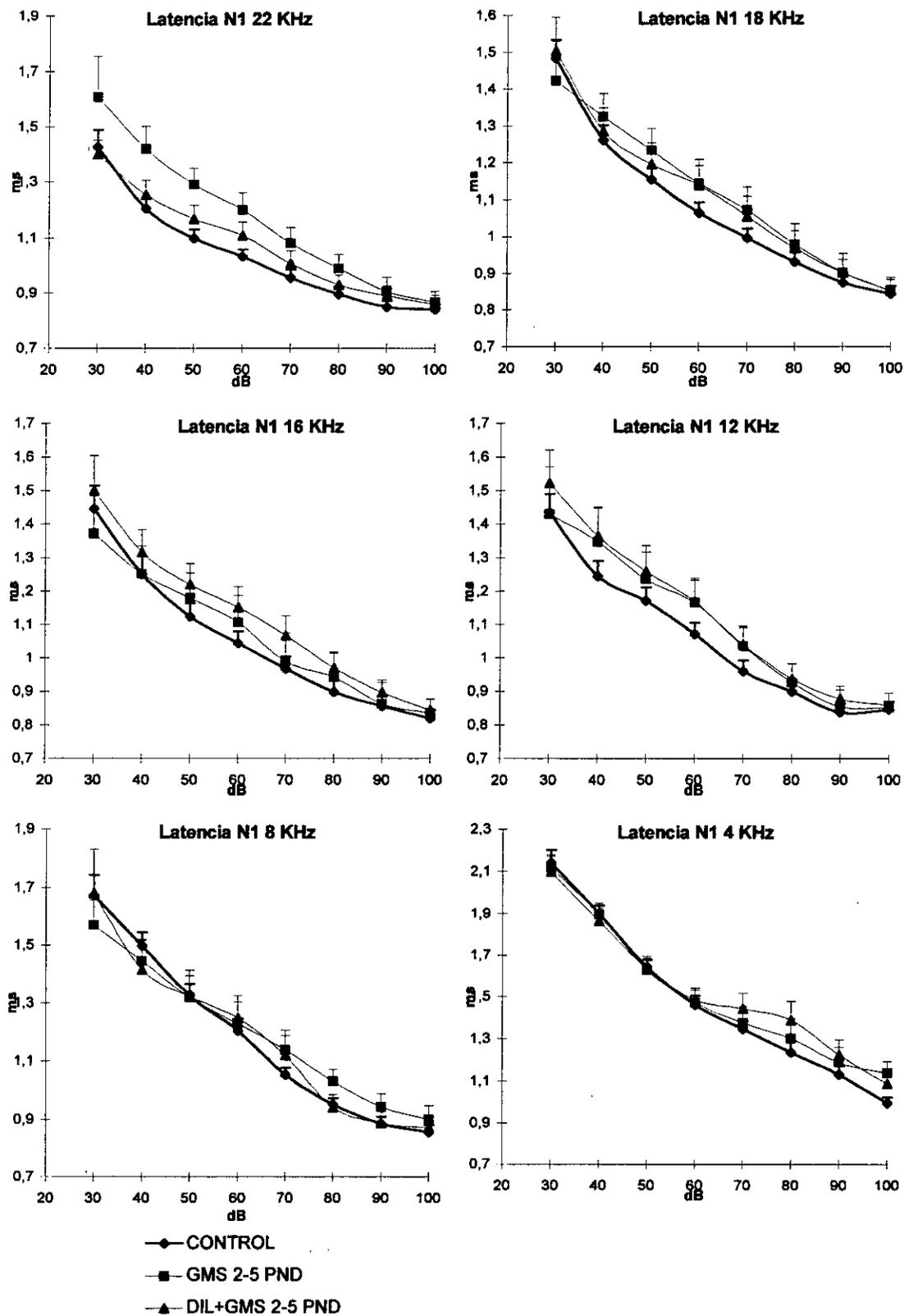


Figura 17

## Período 2-5 pnd. Amplitud onda N1 del PAC

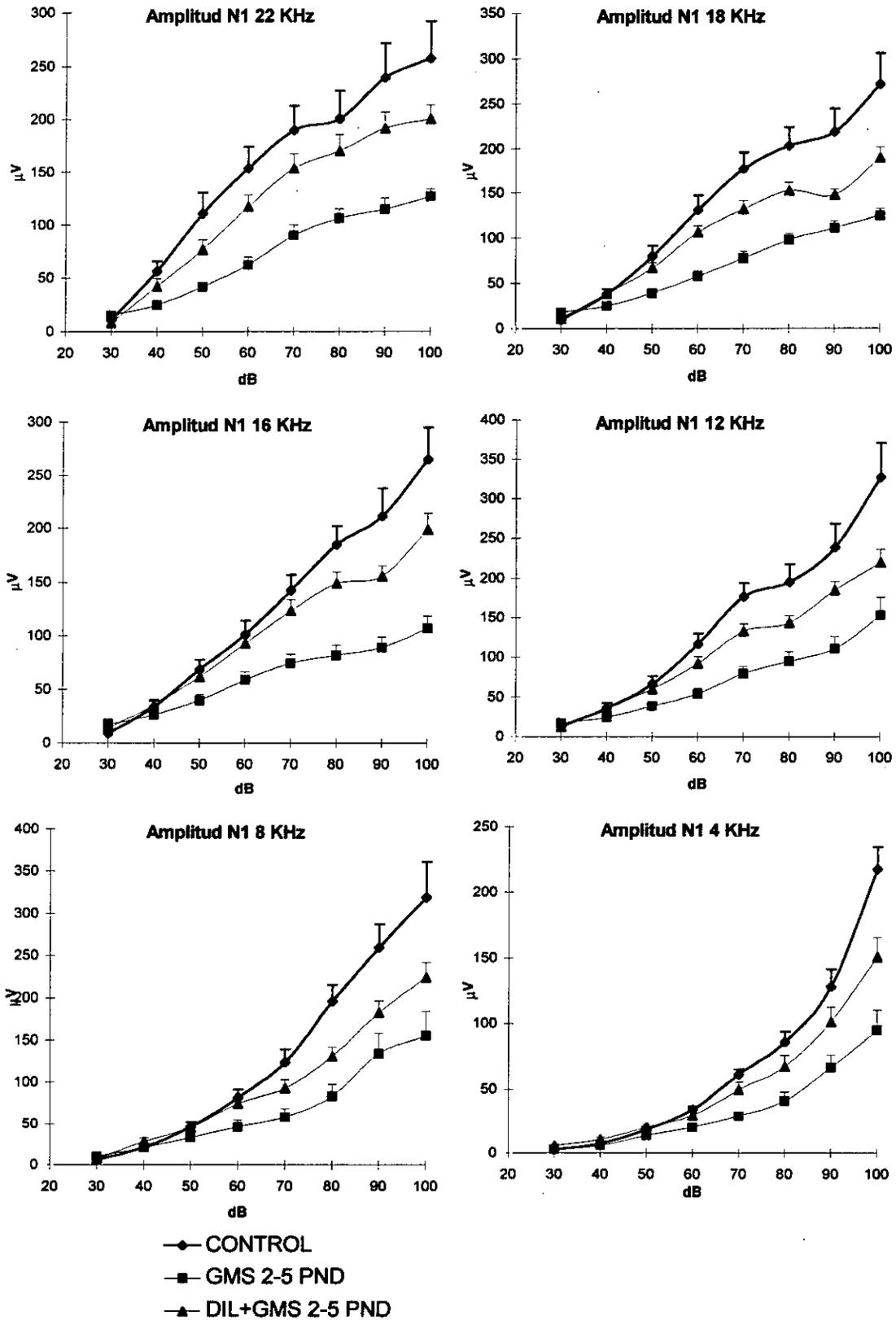
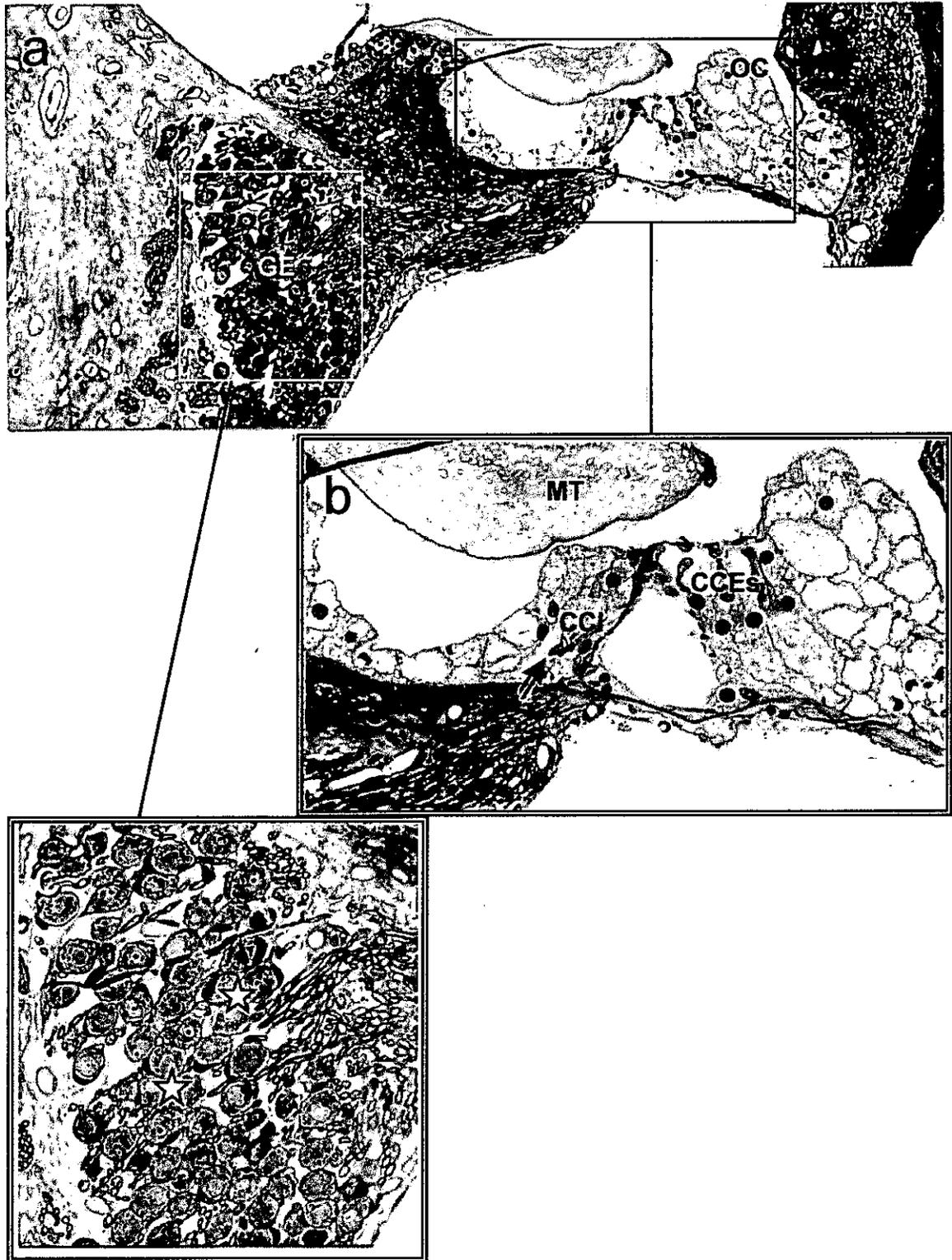
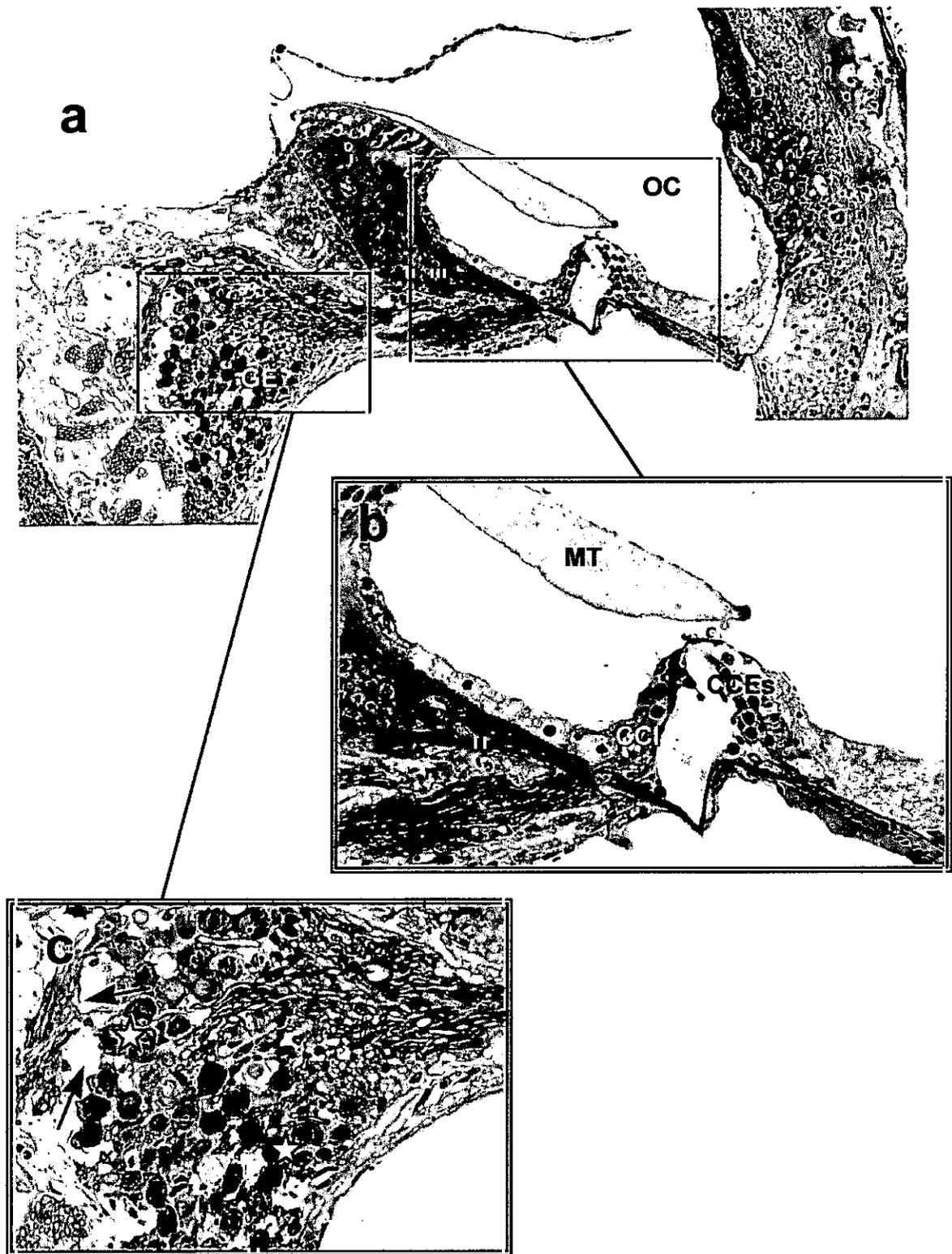


Figura 18



**Figura 19:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con GMS en los días 2 al 5 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti, en el que se pueden observar algunos edemas dendríticos en la base de la CCI (flecha negra); c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan los núcleos de las fibras aferentes de tipo I (estrellas). CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; MT: membrana tectoria; OC: órgano de Corti.



**Figura 20:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con DIL+GMS en los días 2 al 5 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan los núcleos de las fibras aferentes de tipo I (estrellas) y algunos huecos de fibras muertas (flechas). CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; MT: membrana tectoria; OC: órgano de Corti.

**b) Período del 6° al 9° día postnatal.**

Los efectos de la administración del neurotóxico GMS en la producción del PAC fueron, en general, de mayor calibre que los observados en los estudios referentes al anterior periodo, es decir, del 2° al 5° día postnatal.

Así, la latencia de la onda N1 del PAC del nervio coclear (Fig. 21) obtenida en los registros de los animales que recibieron GMS en este período se vió incrementada en todas las frecuencias de estudio respecto a los valores obtenidos en el grupo control. La administración previa de DIL al tratamiento con GMS no mejoró la situación de los valores de latencia conseguidos por los animales del grupo de administración con GMS, de manera que sus medias se situaron a la altura de las representantes del grupo GMS sin aportar diferencias significativas con ellas y quedando siempre retrasadas frente a los valores referencia del control.

En cuanto a la amplitud de la onda N1 del PAC (Fig. 22), la administración de GMS en este período indujo una disminución significativa de los valores de amplitud de la onda N1 del PAC respecto a los valores obtenidos en el grupo control en todas las frecuencias estudiadas. La administración de DIL mejoró los valores de amplitud, pero sólo a medias y altas intensidades de estimulación, manteniéndose estos valores a la par que los obtenidos en el grupo GMS en las intensidades de estimulación bajas.

El tratamiento con GMS en este período produjo grandes alteraciones en el receptor auditivo (Fig. 23). En el órgano de Corti, se observaron gran cantidad de edemas dendríticos en la base de las CCIs (Fig. 23 b), mientras que en el ganglio espiral coclear se observaron grandes pérdidas neuronales (Fig. 23 c). El pretratamiento con DIL (Fig. 24) no disminuyó en apariencia la pérdida de neuronas del ganglio espiral (Fig. 24 c) inducida por el GMS.

## Período 6-9 pnd. Latencia onda N1 del PAC

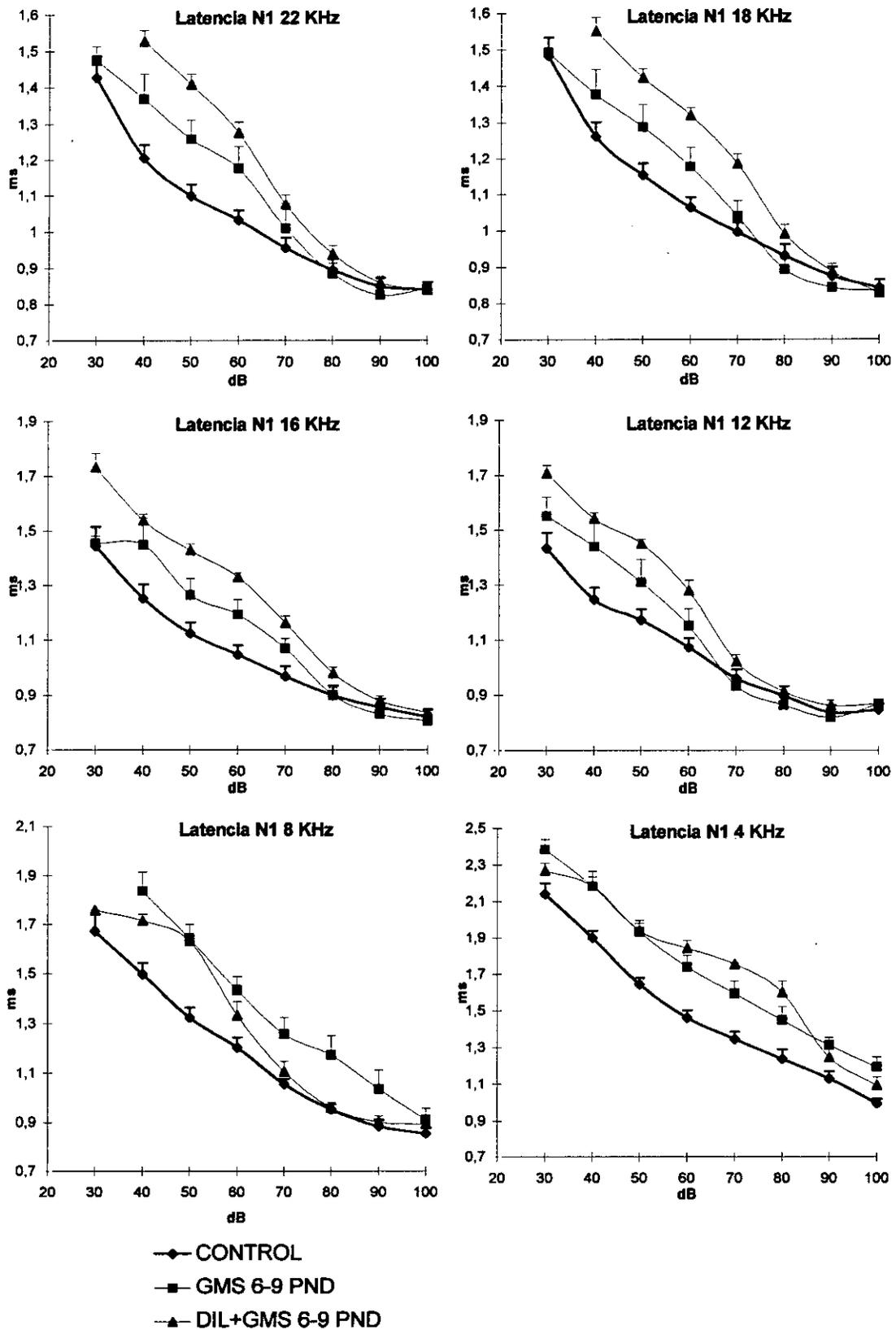


Figura 21

## Período 6-9 pnd. Amplitud onda N1 del PAC

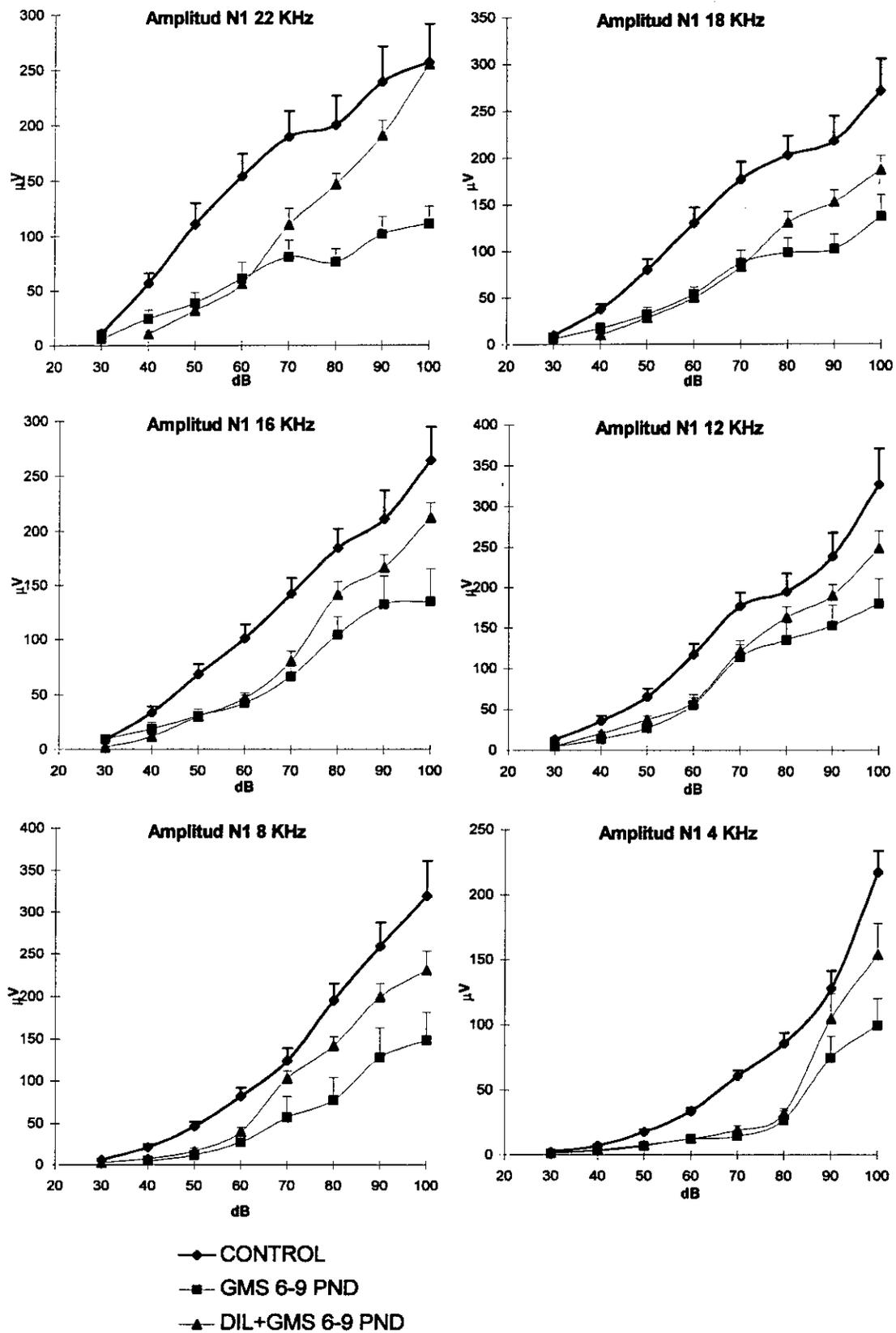
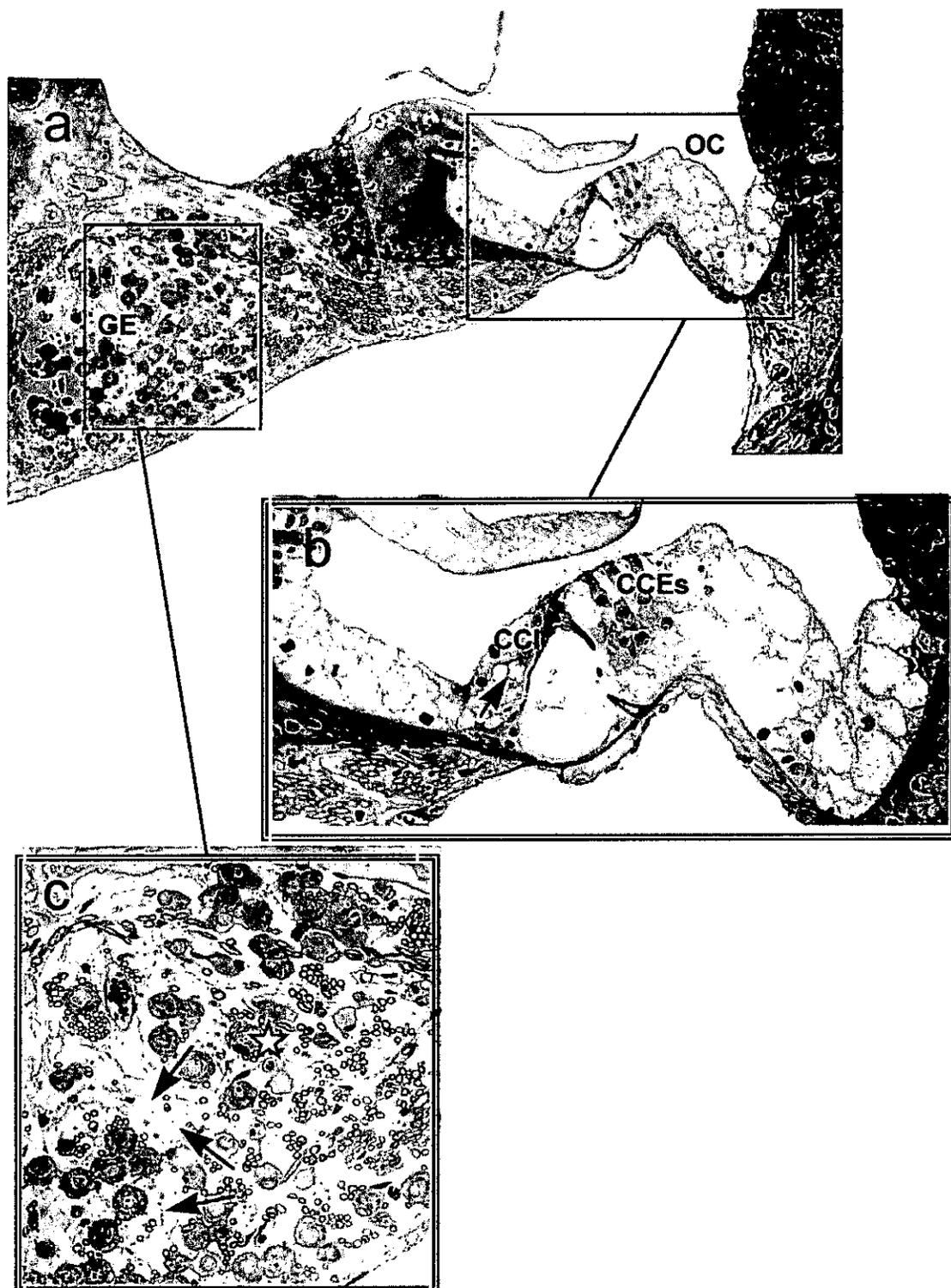
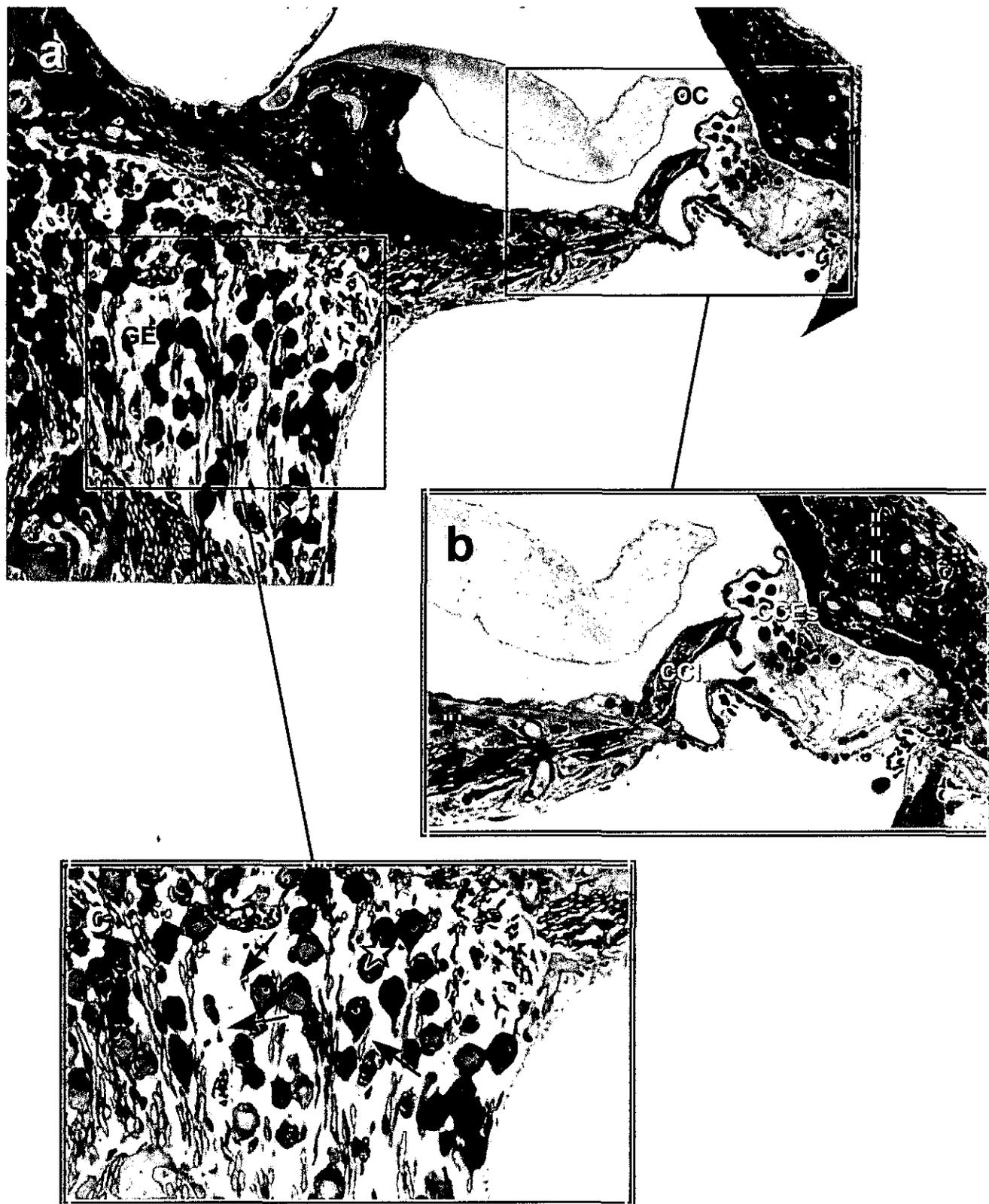


Figura 22



**Figura 23:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con GMS en los días 6 al 9 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti, en el que se pueden observar edemas dendríticos en la base de la CCI (flecha negra); c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan las fibras aferentes de tipo I (estrellas) y los huecos dejados por las fibras desaparecidas (flechas). CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; OC: órgano de Corti.



**Figura 24:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con DIL+GMS en los días 6 al 9 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan las fibras aferentes de tipo I (estrellas) y algunos huecos dejados por fibras muertas (flechas). CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; OC: órgano de Corti.

### **c) Período del 9° al 12° día postnatal.**

Electrofisiológicamente y morfológicamente, la administración de GMS en este período produjo alteraciones similares a las encontradas en los animales tratados en el período del 6° al 9° día postnatal.

La latencia de la onda N1 del PAC del VIII par (Fig. 25) se vio afectada por el tratamiento con el neurotóxico, de manera que incrementó sus valores respecto a los valores obtenidos del grupo control en todas las frecuencias de estudio. En este caso, la preadministración de DIL a la del GMS, remedó de alguna manera algunos de los datos de latencia del grupo GMS, consiguiendo disminuir discretamente los valores de latencia acercándolos a los del grupo control.

La amplitud de la onda N1 del PAC también se mostró muy alterada por el tratamiento con GMS en este período (Fig. 26) de manera que se disminuyeron significativamente sus valores frente a los obtenidos en el grupo control. La administración previa de DIL a la del GMS mejoró de manera notable la situación aumentando los valores de amplitud pero sin alcanzar en ningún caso los valores referentes del grupo control.

Las imágenes de microscopía aportaron datos sobre los efectos neurotóxicos del GMS (Fig. 27) que fueron predominantes sobre el ganglio espiral donde se observaron grandes pérdidas de unidades neuronales (Fig. 27 c). El tratamiento con DIL mejoró esta situación protejiendo, aunque no totalmente, al ganglio espiral coclear de la pérdida de neuronas (Fig. 28).

## Período 9-12 pnd. Latencia de N1 del PAC

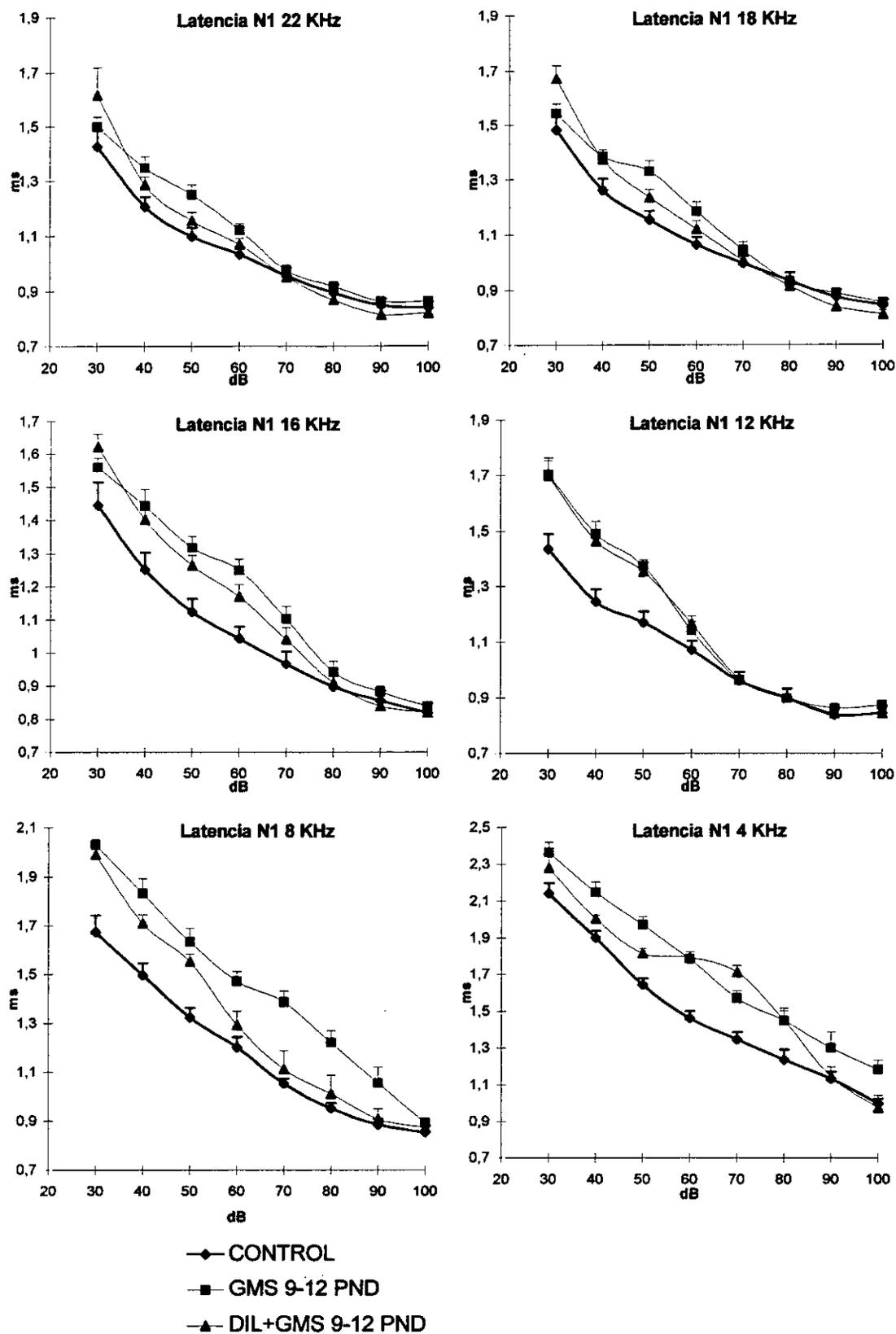


Figura 25

## Período 9-12 pnd. Amplitud de N1 del PAC

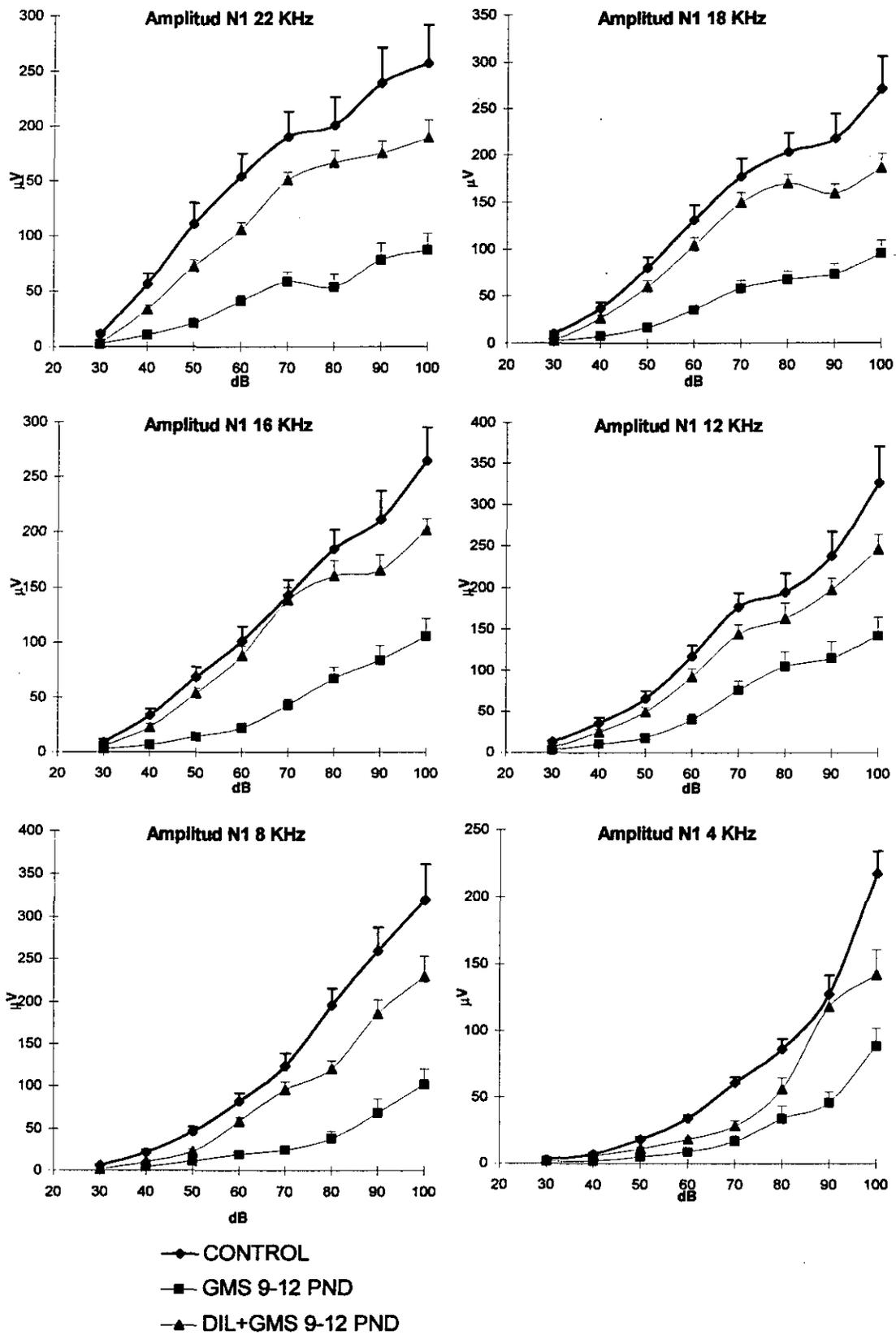
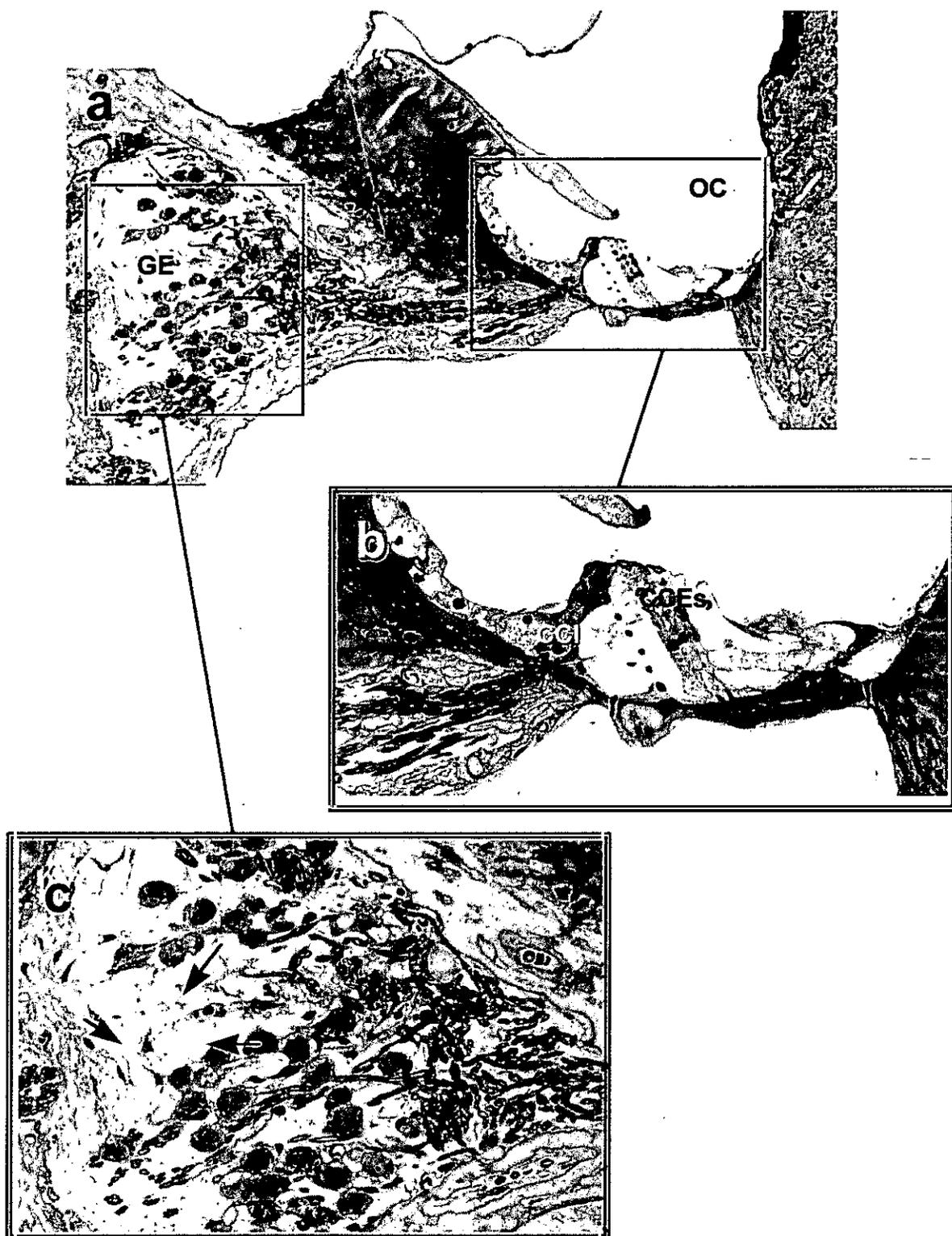
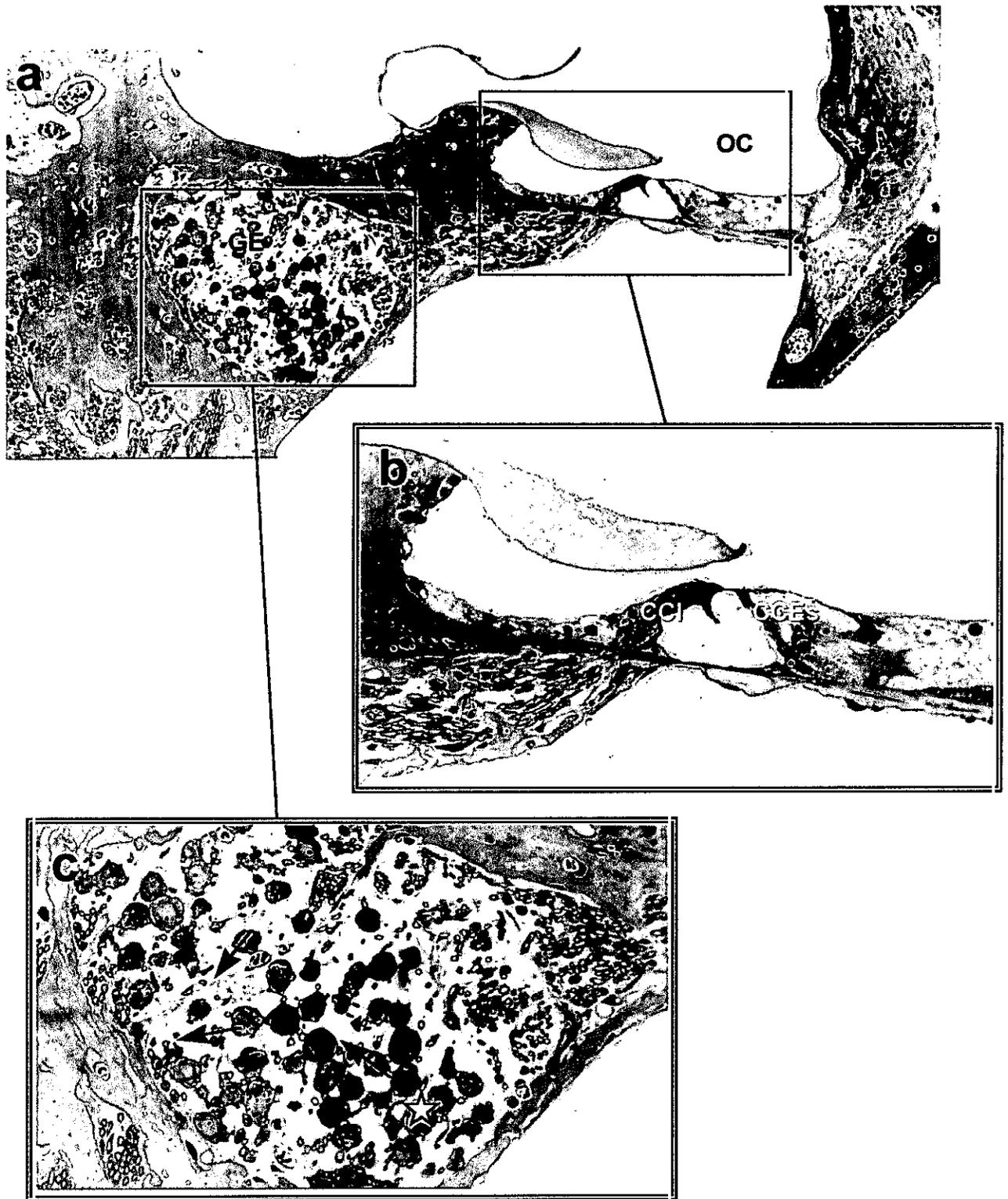


Figura 26



**Figura 27:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con GMS en los días 9 al 12 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan los huecos dejados por las fibras aferentes desaparecidas (flechas). CCEs: *células ciliadas externas*; CCI: *célula ciliada interna*; GE: *ganglio espiral*; OC: *órgano de Corti*.



**Figura 28:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con DIL+GMS en los días 9 al 12 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan las fibras aferentes de tipo I (estrellas) y huecos dejados por fibras muertas (flechas). CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; OC: órgano de Corti.

#### **d) Período del 15° al 18° día postnatal.**

Los efectos de la neurotoxicidad inducida por la administración de GMS en este período de desarrollo postnatal de la rata indujo menores alteraciones que las observadas en los grupos anteriores.

Así, la latencia de la onda N1 del PAC del nervio coclear (Fig. 29) no se vió afectada de manera significativa, en ninguna de las frecuencias estudiadas, por la administración de GMS en este período respecto a lo obtenido en el grupo control. Asimismo, en los animales pretratados con DIL al tratamiento con GMS, si bien se obtuvieron valores de latencia sensiblemente mayores a los del grupo control, prácticamente no fueron significativos en ningún caso, con lo que se puede considerar que no varían los valores respecto a los del grupo control.

En cuanto a la amplitud de la onda N1 del PAC del VIII par (Fig. 30), al igual que en los anteriores grupos de tratamiento, la administración de GMS en este período produjo una disminución significativa de los valores de amplitud respecto a la de los animales del grupo control en todas las frecuencias de estímulo. En este caso, el tratamiento con DIL produjo un incremento de la amplitud que se situó al nivel de los datos obtenidos en el grupo control, aunque en las intensidades mayores de estimulación sufre una pequeña disminución respecto a los referentes del control.

En el estudio morfológico de las cócleas pertenecientes a los animales tratados con GMS en este período de desarrollo (Fig. 31), se observa que las alteraciones del ganglio espiral, aun siendo menores que en grupos precedentes, todavía significan una pérdida significativa del número de neuronas en el ganglio (Fig. 31 c). La preadministración de DIL indujo una protección, aunque no total, de las neuronas del ganglio espiral, observándose todavía un pequeño número de neuronas perdidas (Fig. 32).

## Período 15-18 pnd. Latencia de N1 del PAC

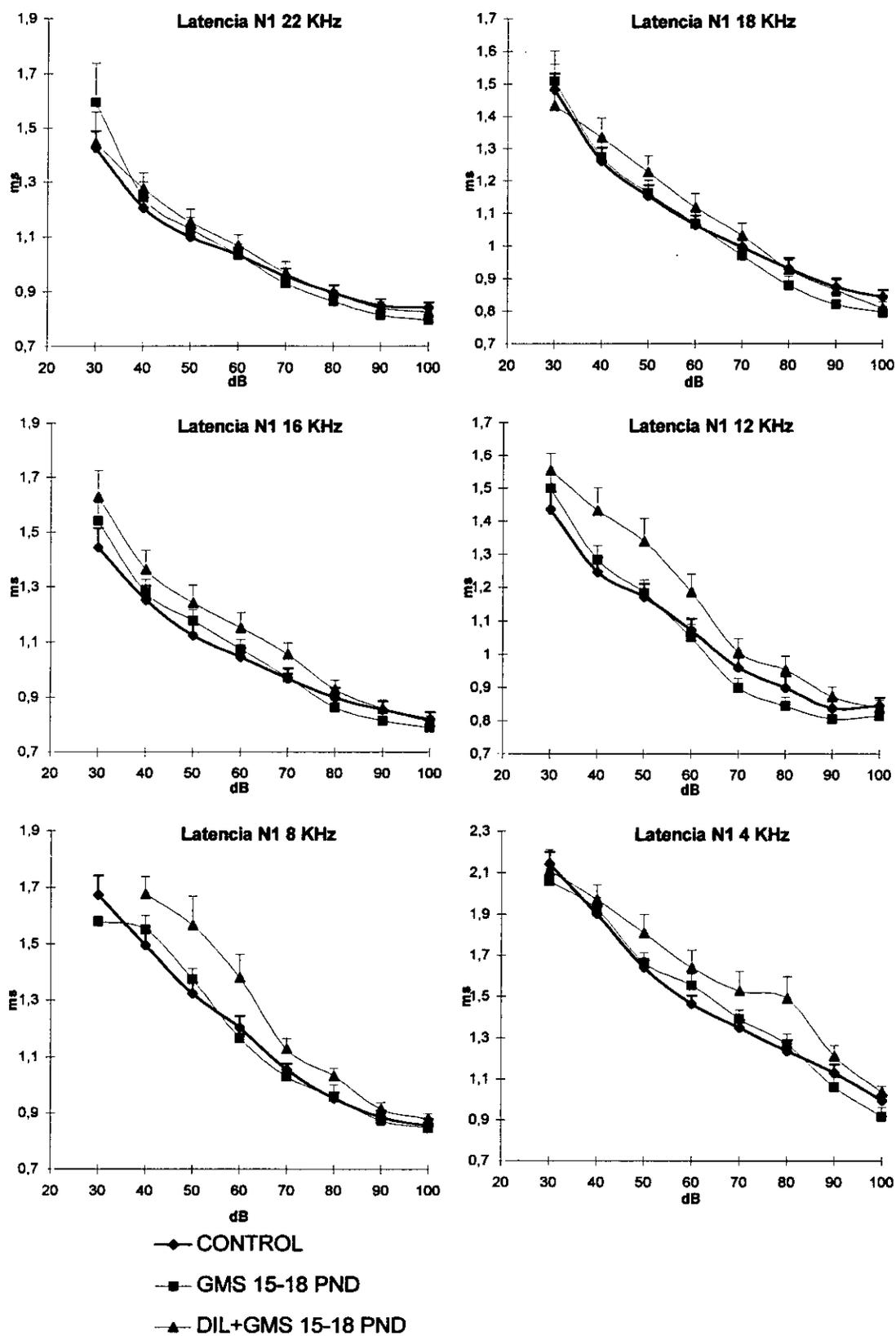


Figura 29

## Período 15-18 pnd. Amplitud de N1 del PAC

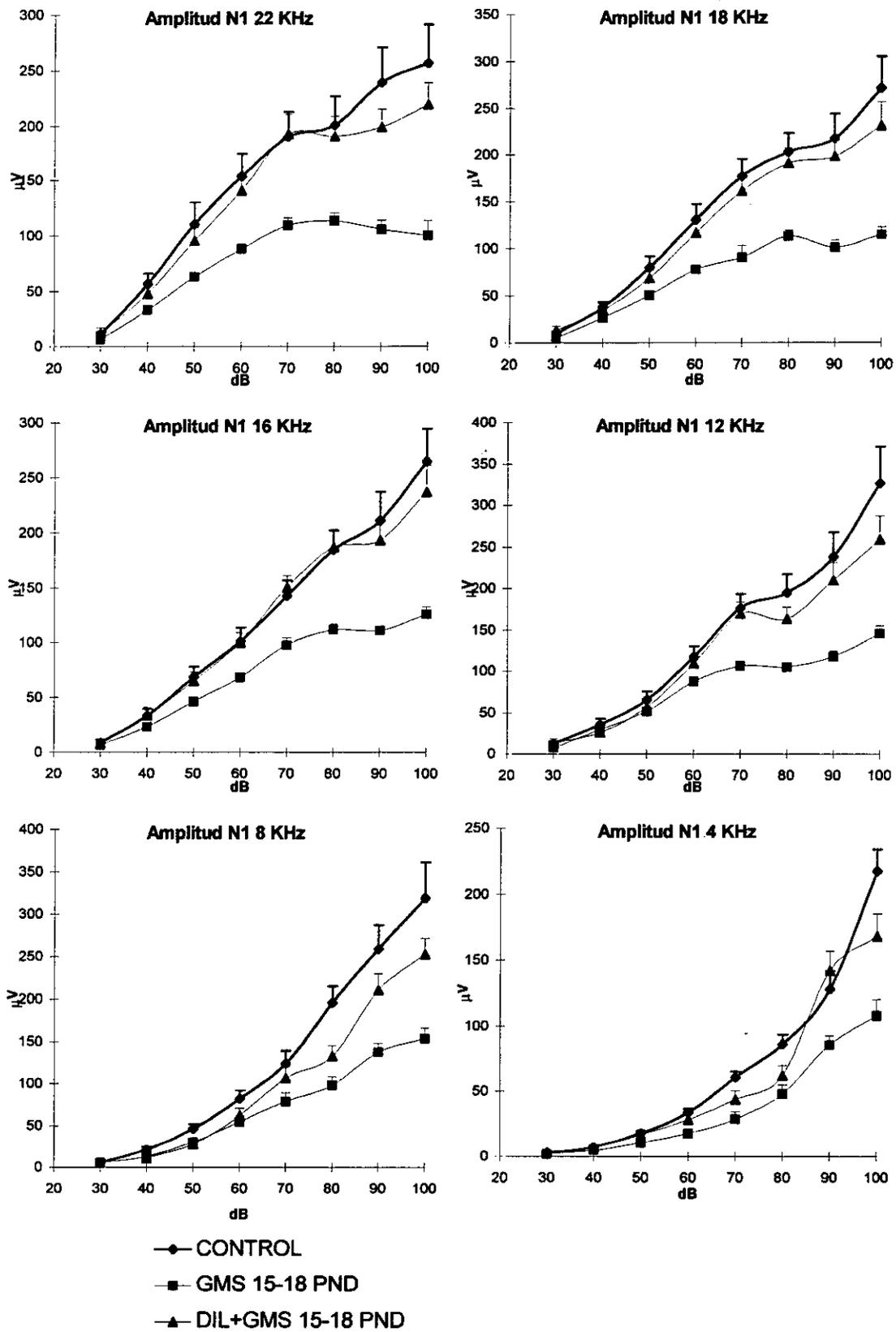
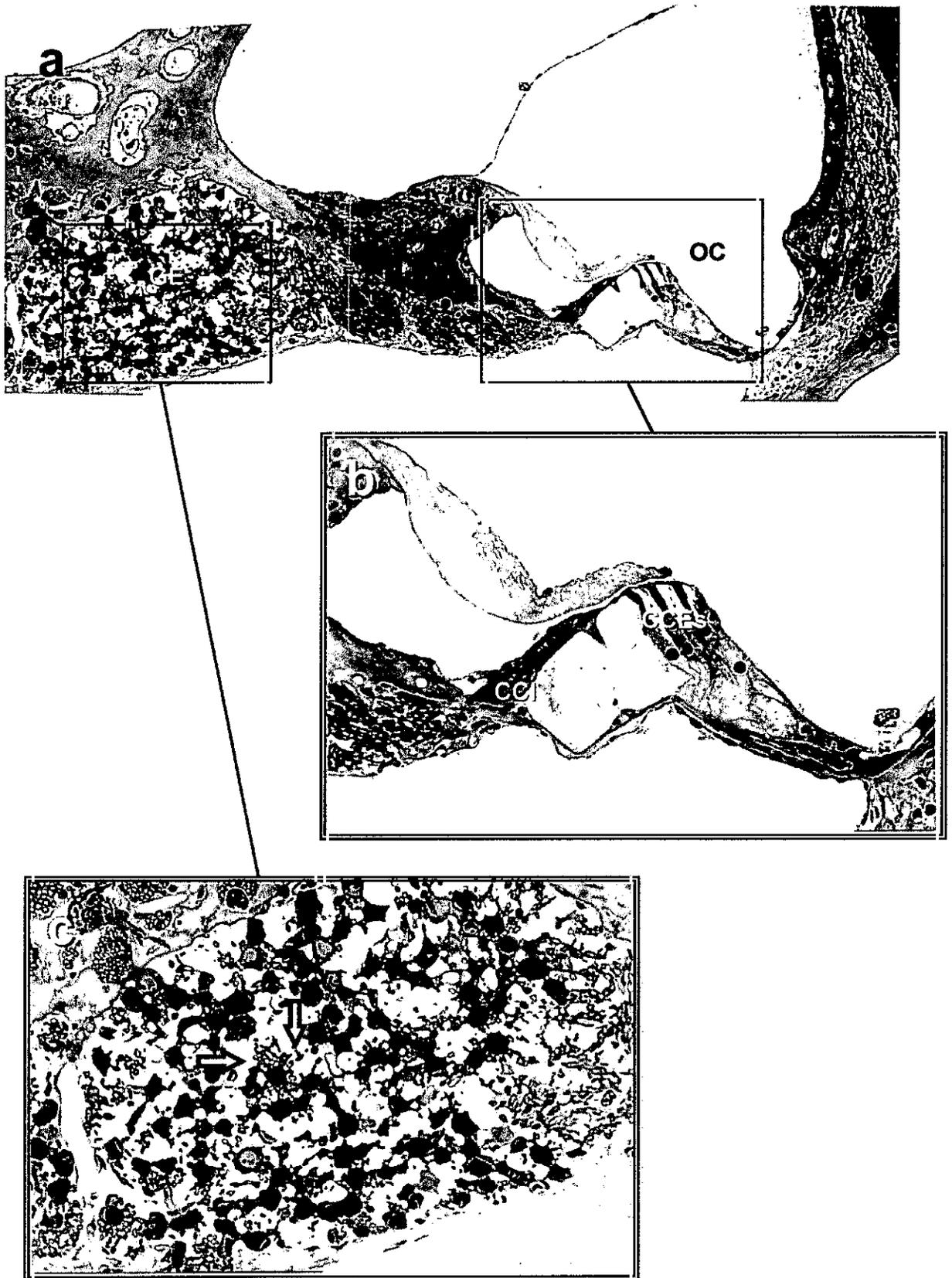
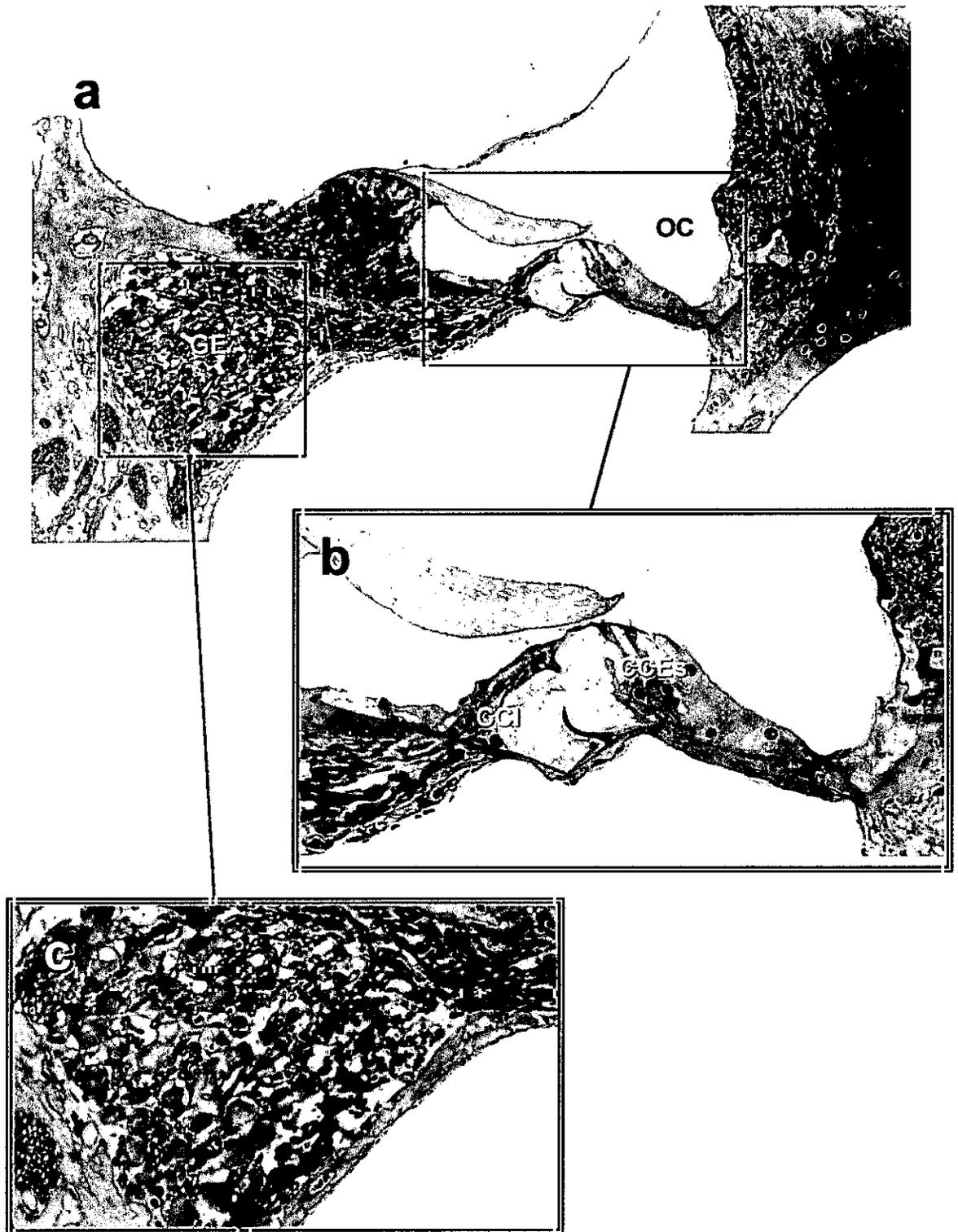


Figura 30



**Figura 31:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con GMS en los días 15 al 18 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan los huecos dejados por las fibras aferentes desaparecidas (flechas). CCEs: células ciliadas externas; CCl: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; OC: órgano de Corti.



**Figura 32:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con DIL+GMS en los días 15 al 18 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que prácticamente no se observan huecos de fibras muertas y desaparecidas. CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; OC: órgano de Corti.

**e) Período del 30° al 33° día postnatal.**

Los efectos morfológicos y electrofisiológicos del tratamiento con GMS en este periodo fueron menores que en los grupos precedentes.

La latencia de la onda N1 del PAC del nervio coclear apenas se vió afectada por el tratamiento con el neurotóxico (Fig. 33) comparando los valores obtenidos en este grupo con los del grupo control. De la misma manera, la preadministración de DIL a la administración de GMS tampoco produjo alteraciones significativas en el comportamiento de la latencia de la onda N1 del PAC respecto a los valores obtenidos en los otros dos grupos de estudio, control y GMS.

En cuanto a los resultados de la amplitud de la onda N1 del PAC del VIII par (Fig. 34), se observaron disminuciones significativas de la amplitud en los animales tratados con GMS, respecto a los valores del grupo control. Estas disminuciones de la amplitud solo fueron aparentes en estimulaciones de media y alta intensidad, en las frecuencias de estímulo 22, 18, 16, y 12 KHz mientras que en las frecuencia más graves de estimulación, 8 y 4 KHz, no se observan estas variaciones. El pretratamiento con DIL corrige estos valores llevándolos incluso, en algunos casos, por encima de los valores medios obtenidos en el grupo control.

En las imágenes de microscopía se observaron pequeñas muestras de las alteraciones producidas por el GMS (Fig. 35), de manera que se detectó un pequeño número de huecos en el ganglio espiral dejados por neuronas muertas (Fig. 35 c). El tratamiento con DIL (Fig. 36) corrigió esta situación devolviendo al receptor auditivo a su estado normal.

## Período 30-33 pnd. Latencia de N1 del PAC

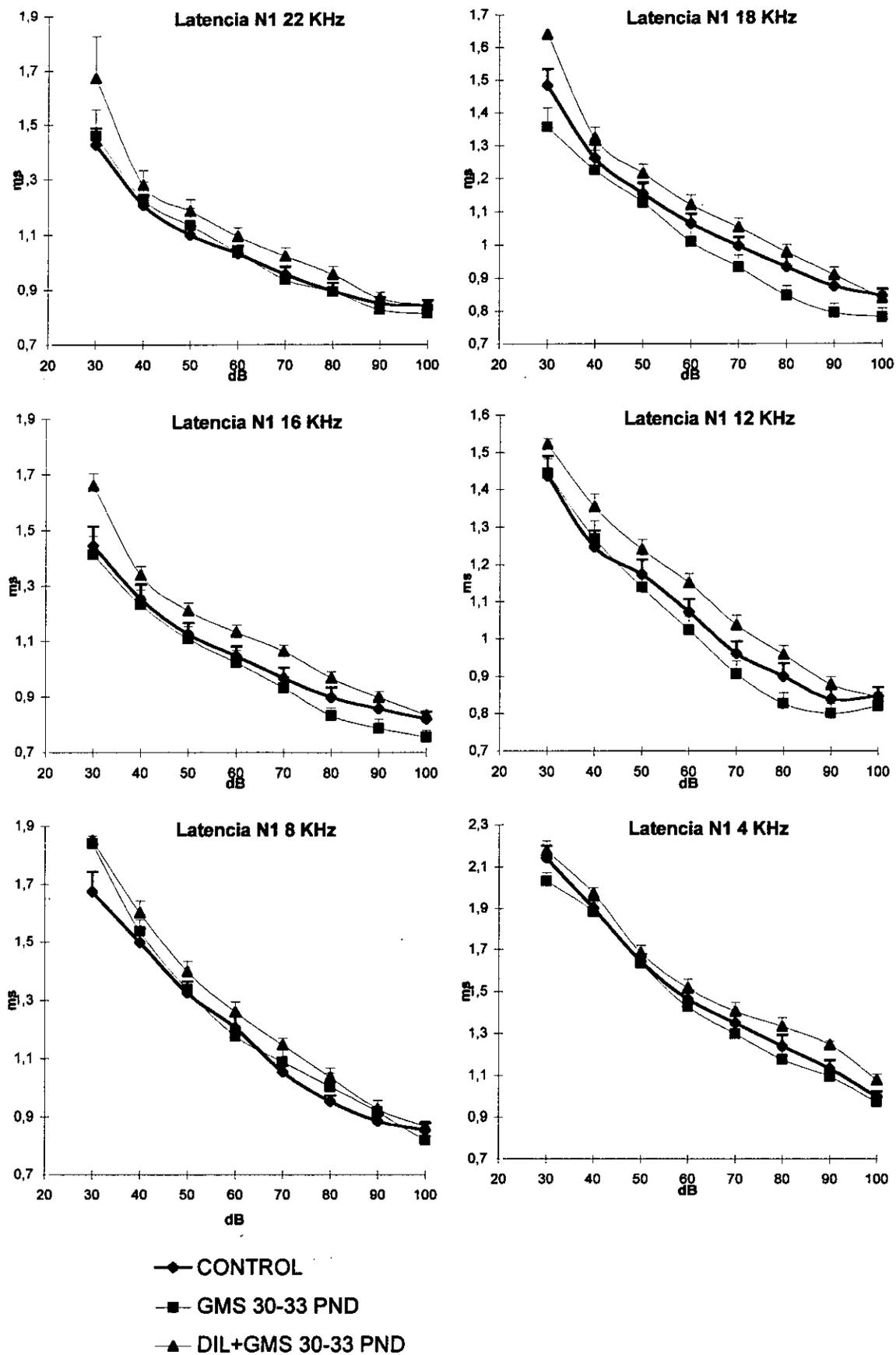


Figura 33

## Período 30-33 pnd. Amplitud de N1 del PAC

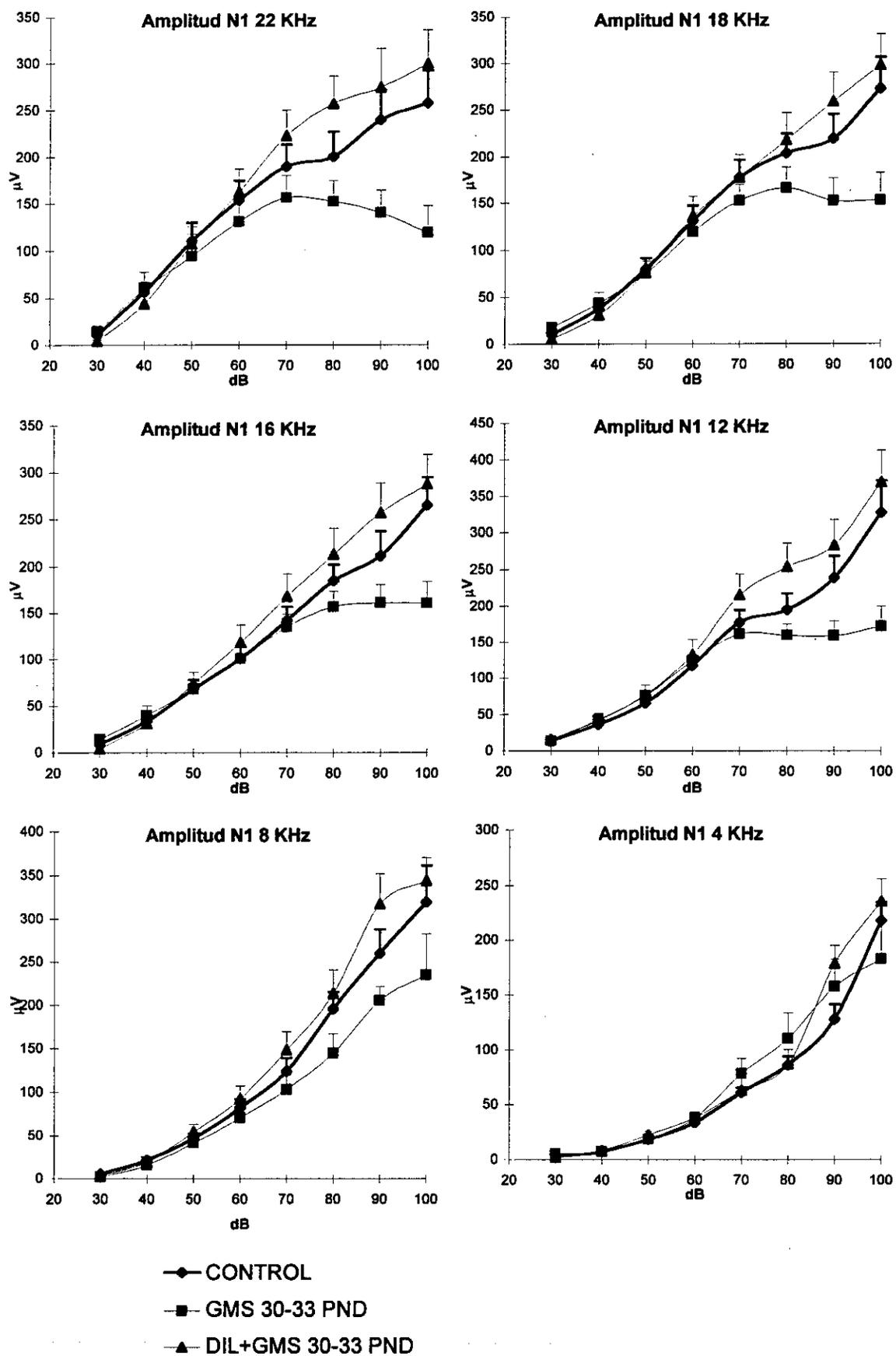
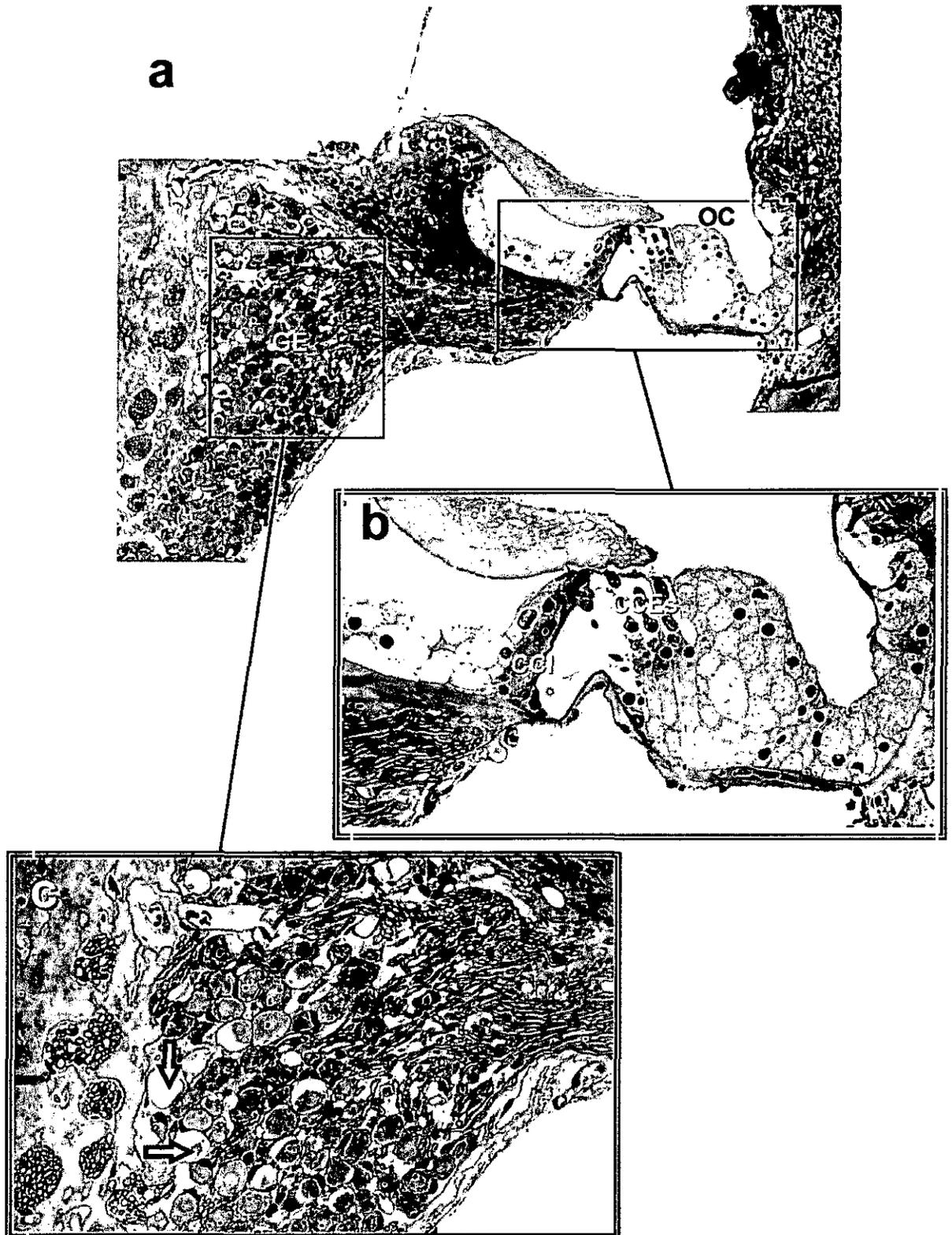
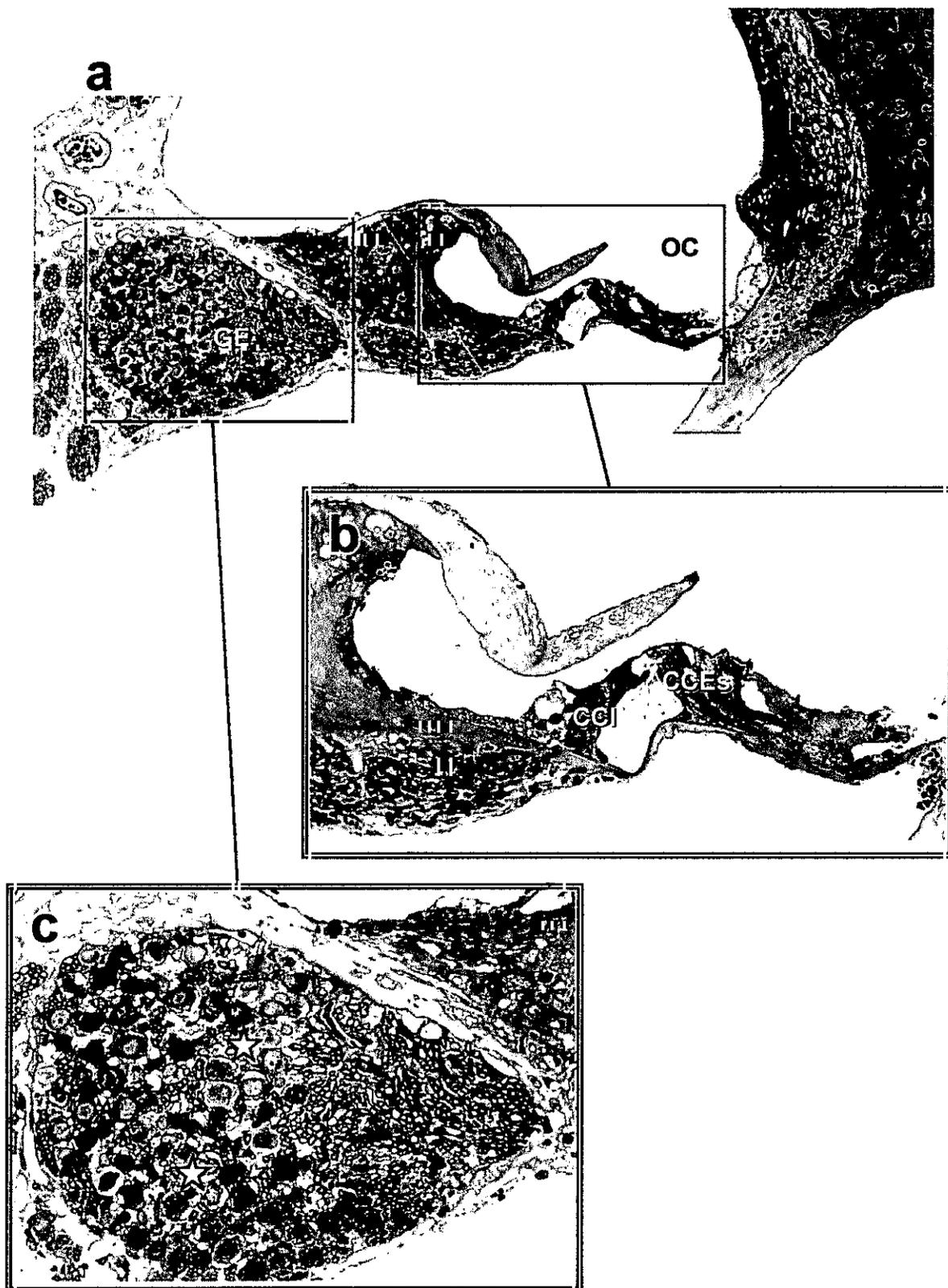


Figura 34



**Figura 35:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con GMS en los días 30 al 33 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan algunos huecos dejados por las fibras aferentes desaparecidas (flechas). CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; OC: órgano de Corti.



**Figura 36:** Imágenes a microscopía óptica de la cóclea de un animal tratado con DIL+GMS en los días 30 al 33 postnatal. a) Espira media coclear; b) Detalle del órgano de Corti; c) Detalle del ganglio espiral coclear en el que se observan las neuronas que lo constituyen (estrella). CCEs: células ciliadas externas; CCI: célula ciliada interna; GE: ganglio espiral; OC: órgano de Corti.

## **OTOTOXICIDAD EN EL DESARROLLO DEL RECEPTOR AUDITIVO**

A continuación se comentarán los resultados obtenidos tras la realización del protocolo de ototoxicidad propuesto en el apartado de *material y métodos*.

### **a) Neurotoxicidad coclear en la rata adulta**

Este experimento de neurotoxicidad fue llevado a cabo mediante la administración de un agonista glutamatergico, el ácido kaínico (AK), en ratas adultas. La neurotoxicidad así inducida afectó desigualmente a los dos tipos de potenciales cocleares evaluados en este protocolo, el PAC y el PMC.

En cuanto al PAC del VIII par (Fig. 37), la administración intraperitoneal de AK produjo grandes alteraciones en los valores evaluados del PAC. Así, la latencia de aparición de la onda N1 se incrementó significativamente en todas las frecuencias de estimulación, respecto a los valores considerados como control del experimento. Por otro lado, el parámetro más afectado por el tratamiento con el AK fue el de la amplitud de la onda, que sufrió una amplia regresión de sus valores comparándolos con los obtenidos en el grupo control.

Por otro lado, en los registros del PMC (Fig. 38), se observó que la administración de AK no produjo variaciones significativas en la media de los umbrales de audición para este potencial en ninguna de las frecuencias de estimulación estudiadas (Fig. 38 a). En esta figura se muestran dos ejemplos de registros de PMC de un animal control (Fig. 38 b) y de un animal tratado con AK (Fig. 38 c), en los que se puede observar la falta de diferencias en el umbral auditivo para el PMC, considerando como umbral la mínima intensidad que es registrada inteligiblemente.

El examen microscópico de estas cócleas (Fig. 39) puso de manifiesto las alteraciones de etiología neurotóxica en forma de edemas dendríticos de las fibras aferentes de tipo I bajo las CCIs (Fig. 39 b). No se observaron daños en las CCEs ni en otras estructuras cocleares.

## Efectos del ácido kaínico sobre el PAC

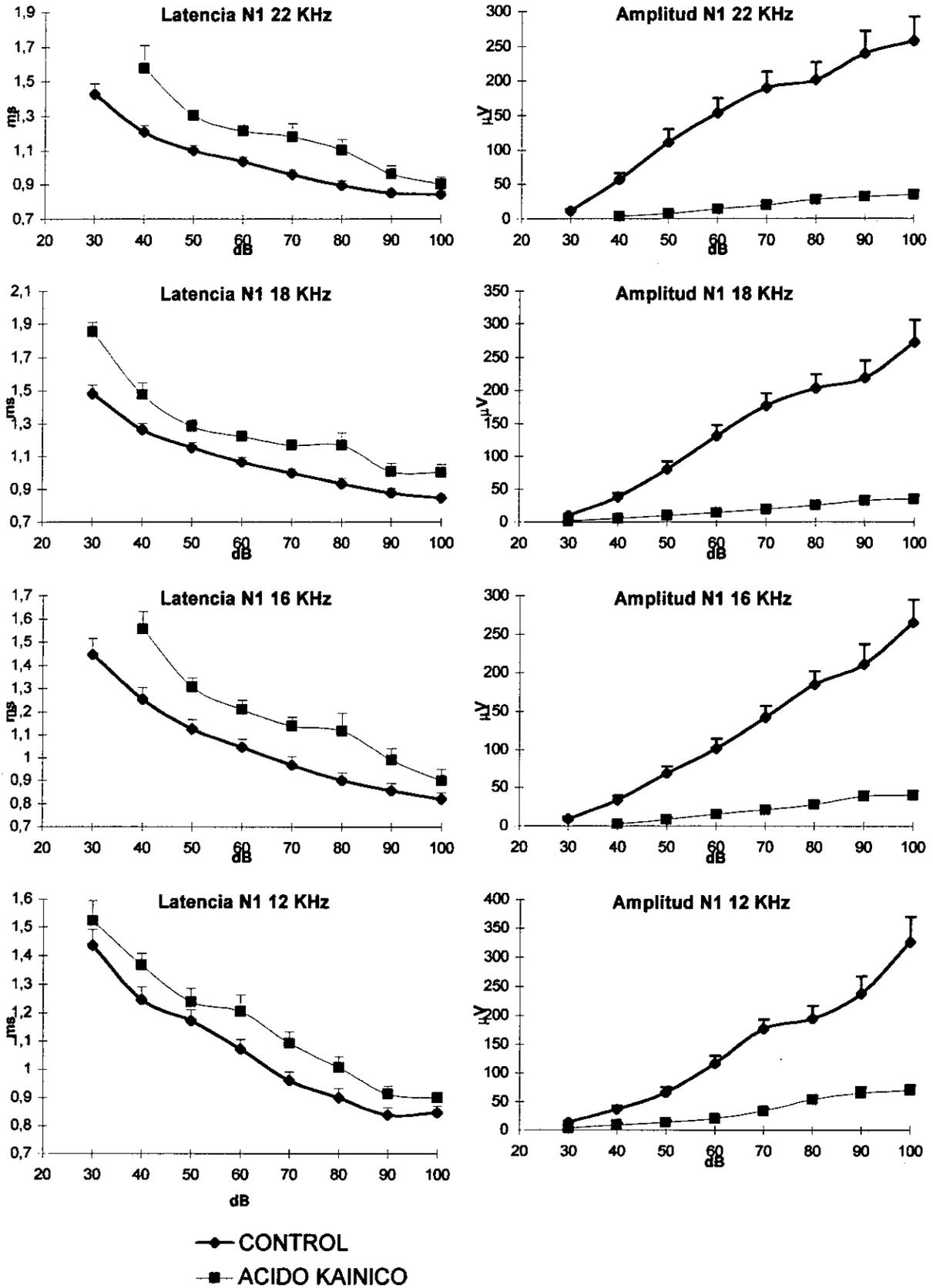
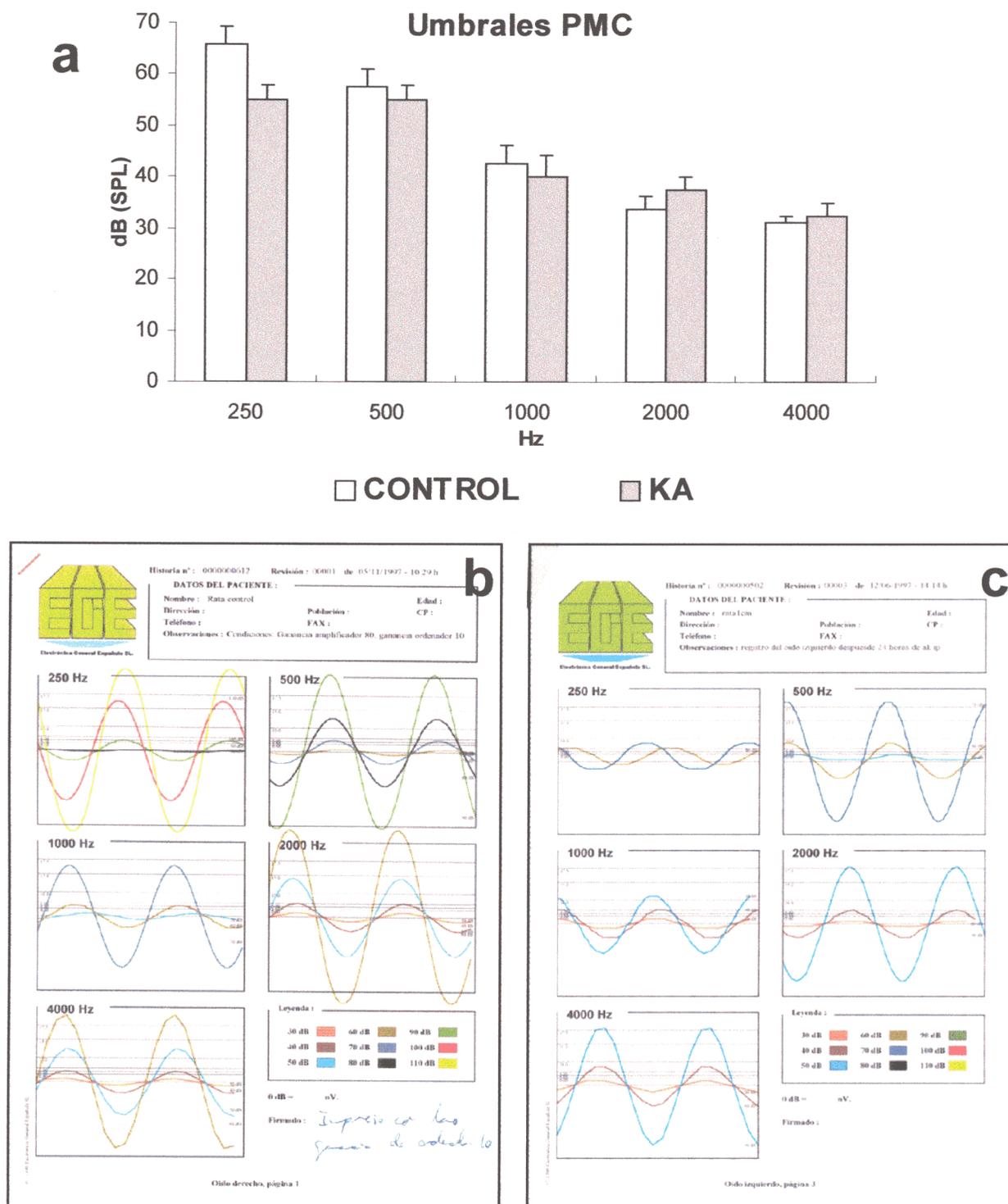
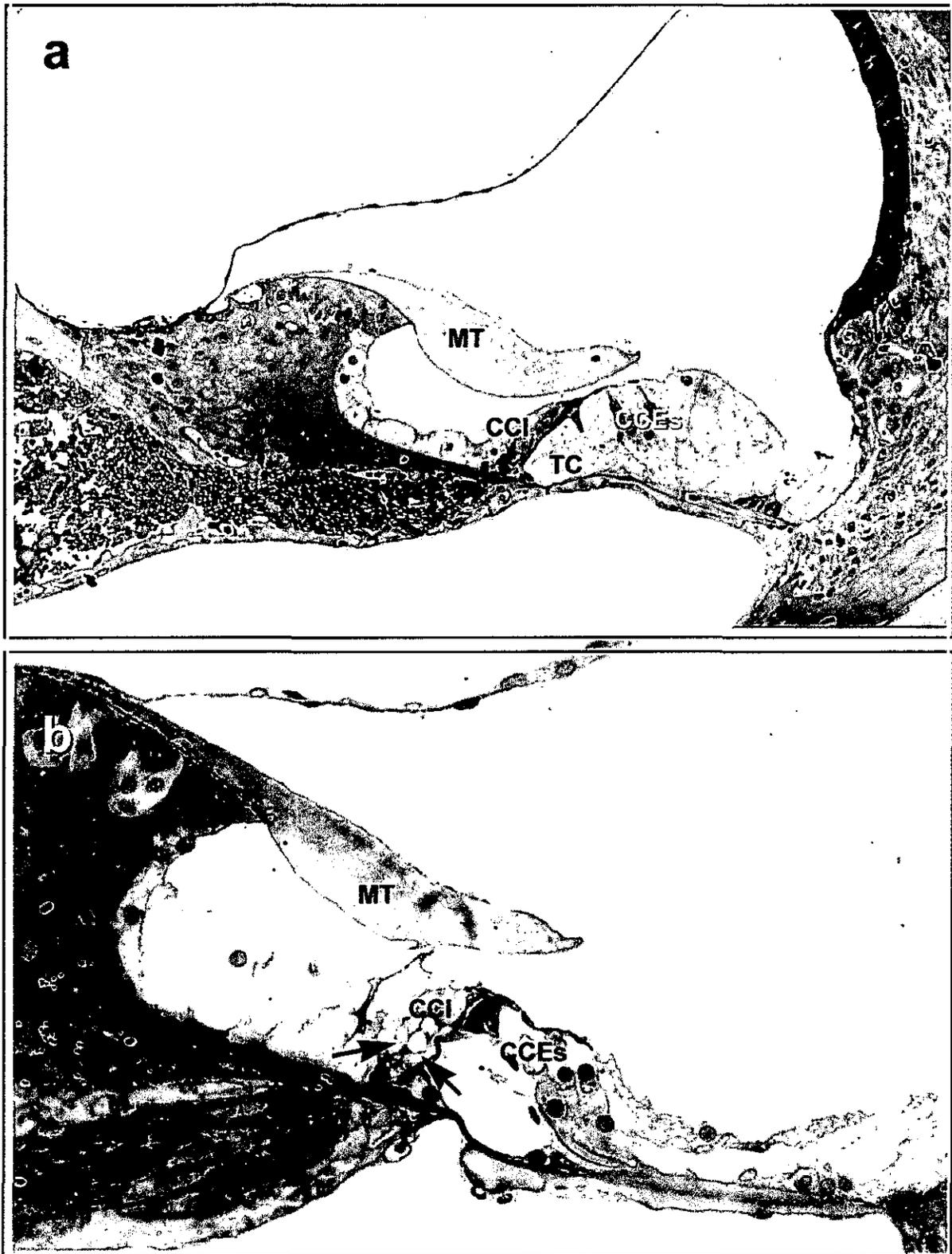


Figura 37



**Figura 38:** Potenciales microfónicos cocleares. Neurotoxicidad.

a) Comparación de los umbrales microfónicos obtenidos en animales tratados con ácido kaínico con los obtenidos en el grupo control. No se aprecian diferencias significativas en ninguna de las frecuencias de exploración. b) Hoja de resultados de PMC de un animal control. c) Hoja de resultados de un animal tratado con ácido kaínico.



**Figura 39:** Imágenes microscópicas del órgano de Corti de rata.

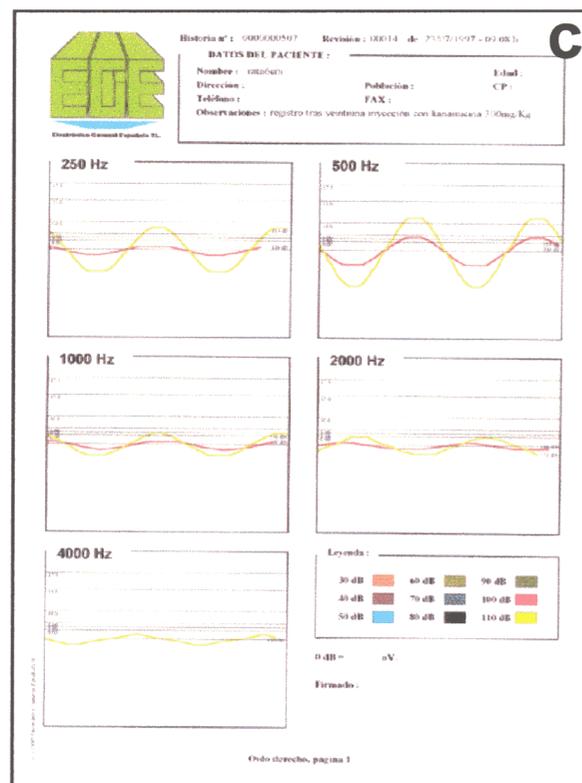
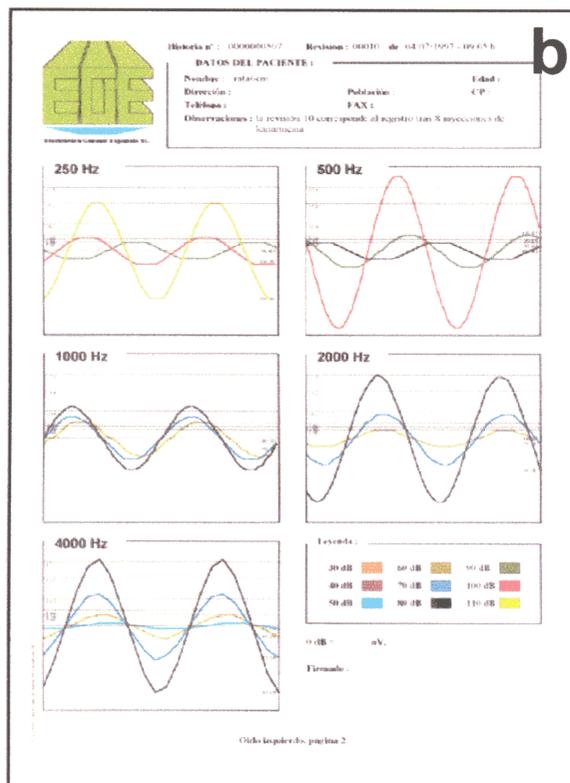
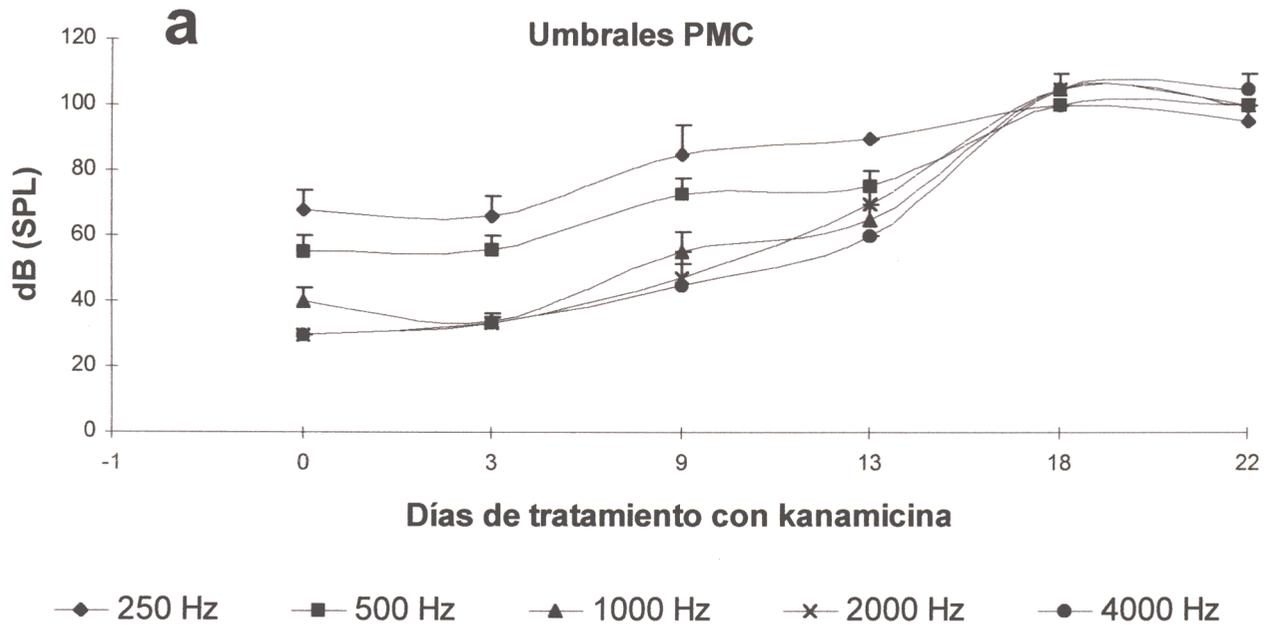
a) Detalle de la espira media coclear de una rata del grupo control. b) Detalle de la espira media coclear de una rata tratada con ácido kaínico. El tratamiento con el neurotóxico produjo edemas dendríticos en las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, que se pueden observar en la base de la CCI (flechas). CCEs: células ciliadas externas, CCI: célula ciliada interna, MT: membrana tectoria, TC: túnel de Corti.

### **b) Ototoxicidad en la rata adulta**

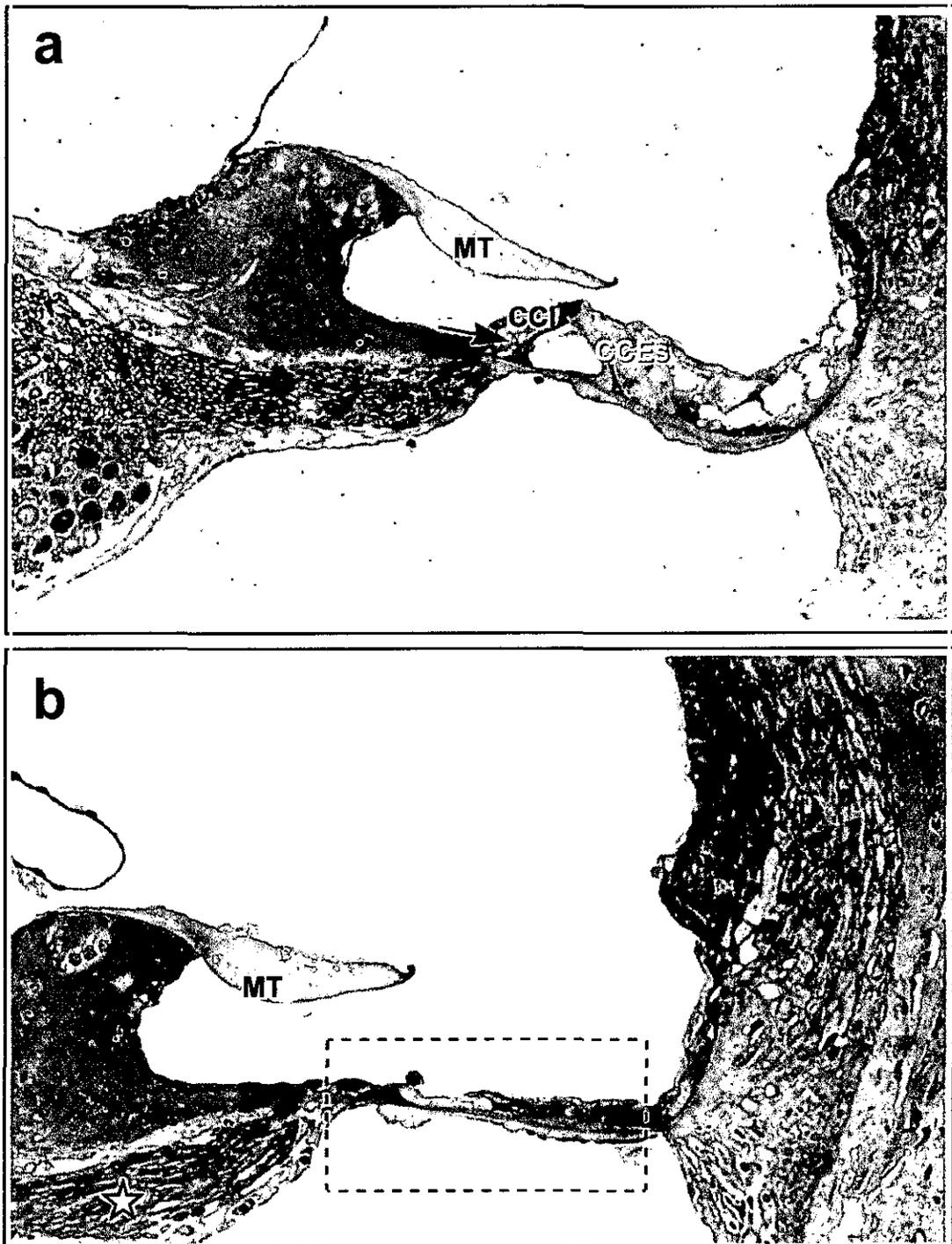
Este experimento permitió evaluar la evolución de la afectación ototóxica a lo largo de un tratamiento crónico, que en este caso duró 22 días, sobre los umbrales auditivos del PMC (Fig. 40).

La administración diaria de KANA produjo un incremento constante de los umbrales auditivos para el PMC desde el tercer día de tratamiento (Fig. 40 a), hasta el umbral máximo, conseguido para todas las frecuencias de estímulo en el 22º día de tratamiento. Por otro lado, no todas las curvas de frecuencias de estudio se comportaron de igual manera a lo largo del tratamiento. Así, en el día 0, registro previo al comienzo del tratamiento con KANA, no se obtuvieron los mismos umbrales auditivos “basales” para todas las frecuencias, de manera que los menores umbrales se obtuvieron con las frecuencias de estimulación más agudas, 4000, 2000 y 1000 Hz, mientras que para las frecuencias de estímulo más graves, 500 y 250 Hz, se obtuvieron umbrales más elevados. A partir de estos umbrales, todas las curvas incrementaron sus valores de umbral medio durante el tratamiento con KANA. A continuación se presentan dos ejemplos de registros de PMC en dos momentos del tratamiento con KANA, en el día 9º (Fig. 40 b) y en el 22º (Fig. 40 c).

En las imágenes de microscopía (Fig. 41) se pudieron observar los efectos de este tratamiento crónico con el antibiótico aminoglucósido KANA. Las lesiones se centraron en el epitelio sensorial del órgano de Corti con degeneración de las células ciliadas, en especial las de la espira basal de la cóclea (Fig. 41 b), aunque en las demás espiras la afectación también fue evidente en las CCEs, además de la aparición de edemas dendríticos de las fibras aferentes de tipo I en la base de las CClIs (Fig. 41 a). No se observaron daños en otras estructuras cocleares como el ganglio espiral.



**Figura 40:** Efectos de la administración crónica de KANA en ratas adultos. a) Evolución de los umbrales de los PMC de cada frecuencia de exploración a lo largo del tratamiento. b) Registro de PMC en el 9º día de tratamiento con KANA. c) Registro de PMC en el 22º día de tratamiento con KANA.



**Figura 41:** Imágenes microscópicas del órgano de Corti de rata adulto tratado con kanamicina durante 22 días.

a) Detalle de la espira media coclear. El tratamiento crónico con kanamicina produjo alteraciones en las CCEs así como un inicio de edemas dendríticos en las fibras aferentes de tipo I (flecha). b) Detalle de la espira basal coclear. La espira basal coclear es la más afectada por el tratamiento con el antibiótico, con pérdida del epitelio sensorial del órgano de Corti (rectángulo). No se observan daños apreciables en las fibras del ganglio espiral (estrella). CCEs: células ciliadas externas, CCI: célula ciliada interna, MT: membrana tectoria.

### **c) Ototoxicidad en la rata en desarrollo**

Este experimento permitió evaluar el período de sensibilidad extrema en la ontogenia del receptor auditivo a los daños de etiología ototóxica por tratamiento con KANA.

Tras el tratamiento con KANA en los dos períodos de desarrollo postnatal del estudio, es decir, del 10° al 13° día postnatal y del 10° al 20° día postnatal, se observan grandes alteraciones en el PAC del nervio coclear. La latencia de la onda N1 del PAC del VIII par (Fig. 42), sufre una gran regresión en ambos grupos de tratamiento, retrasando su aparición y perdiendo la morfología típica de una curva *input-output*. Por otro lado, la amplitud de la onda N1 del PAC (Fig. 43) también sufre modificaciones importantes en los animales tratados en el período de desarrollo con KANA, produciéndose disminuciones importantes de los datos de amplitud respecto a los valores obtenidos en los animales del grupo control.

Este tratamiento con KANA también alteró los componentes del umbral de audición para el PAC del nervio coclear a todas las frecuencias de estudio (Fig. 44 a), así como los valores de umbral del PMC (Fig. 44 b), aunque en este caso las diferencias de umbral entre los animales tratados y los valores control fueron mayores en las frecuencias agudas mientras que a 500 y a 250 Hz se produce un incremento del umbral auditivo medio del grupo control, reduciendo las diferencias con los registros de los animales tratados con KANA. Se presenta un ejemplo de una hoja de resultados de un registro de PMC en un animal tratado con KANA en los días 10° al 13° (Fig. 44 c) y del 10° al 20° (Fig. 44 d).

El estudio morfológico de estas cócleas (Fig. 45) reveló alteraciones y desaparición del epitelio sensorial del órgano de Corti, así como una degeneración de las fibras del ganglio espiral coclear, en ambos períodos de tratamiento.

## Efectos de KANA sobre el PAC del nervio coclear. Latencia de la onda N1

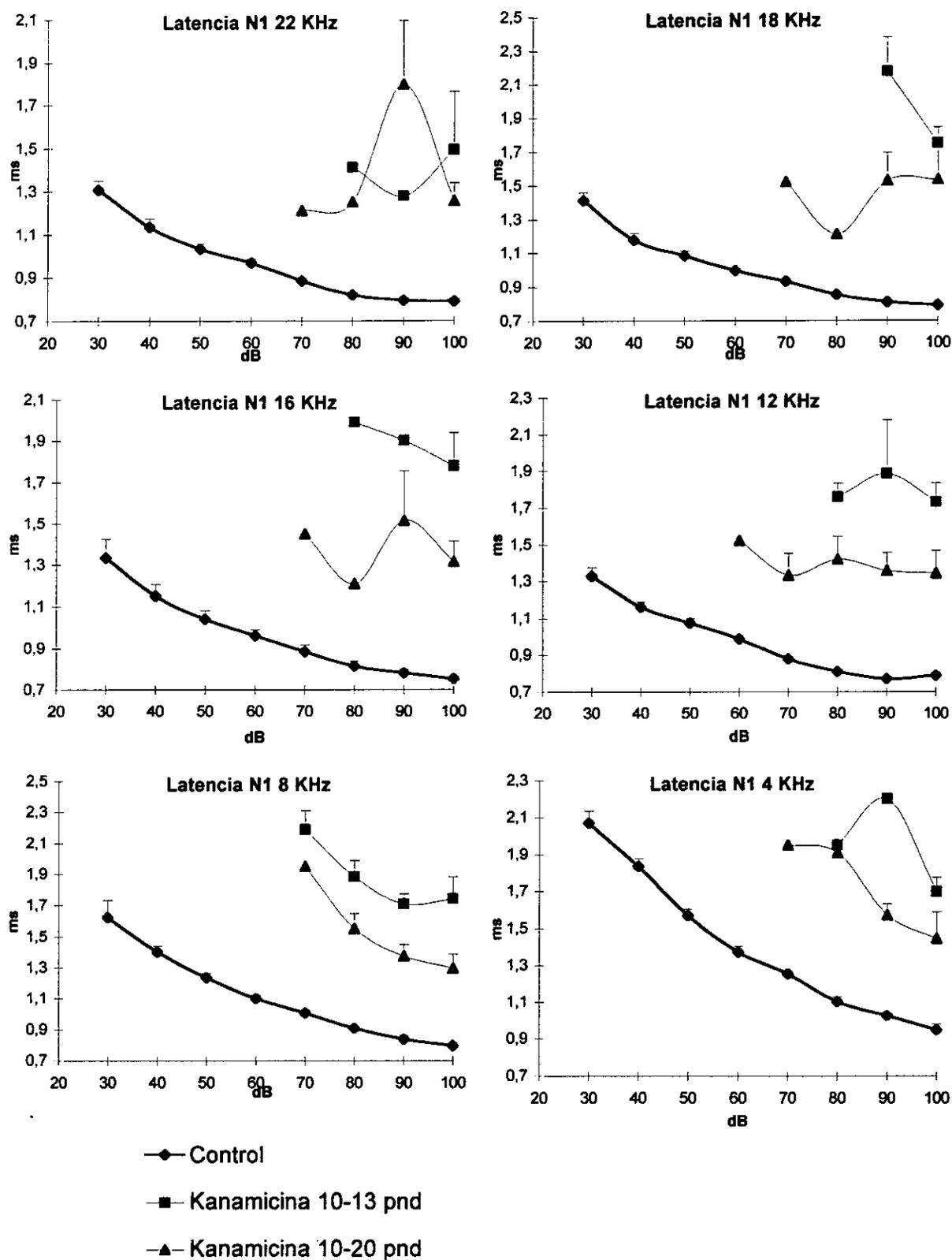


Figura 42

# Efectos de KANA sobre el PAC del nervio coclear.

## Amplitud de la onda N1

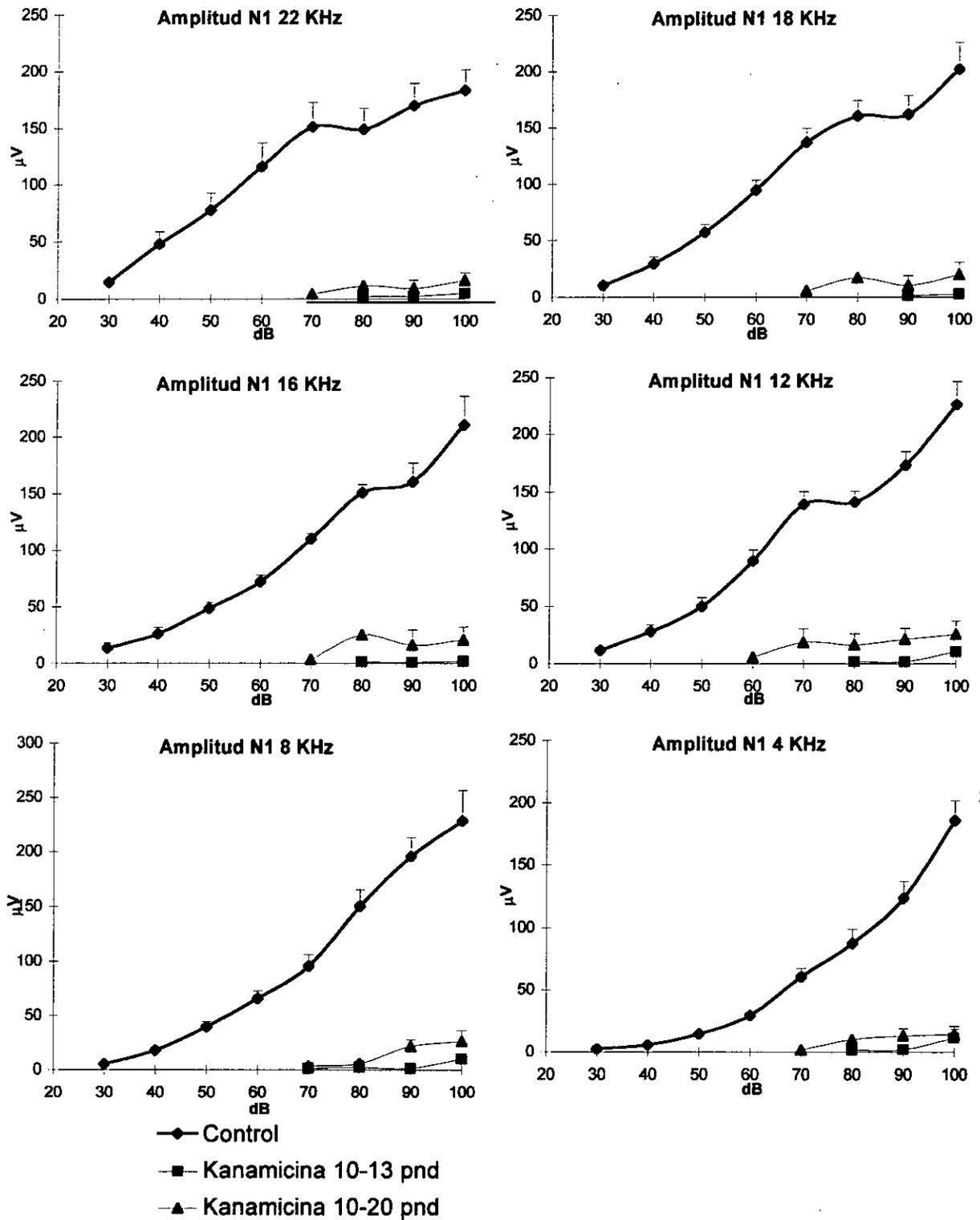
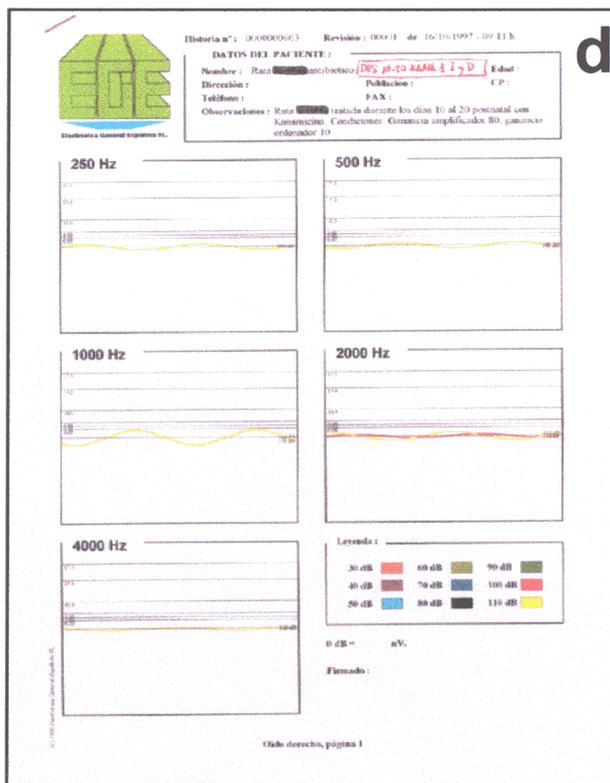
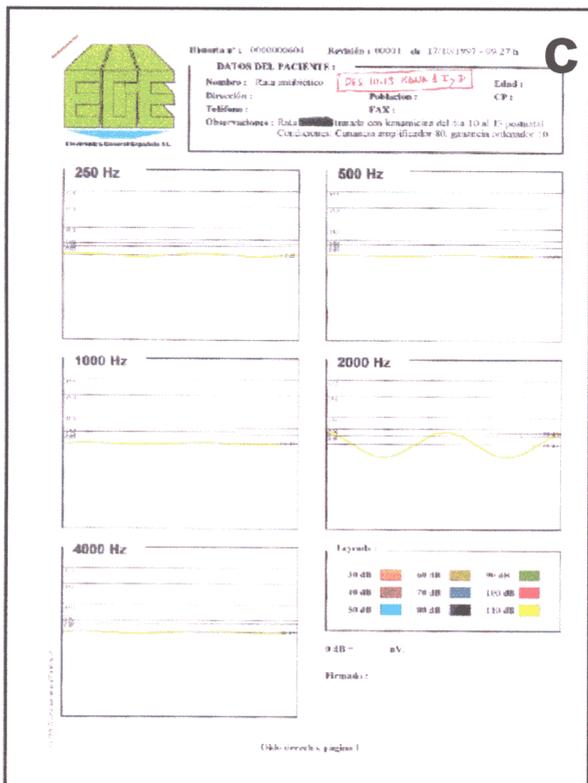
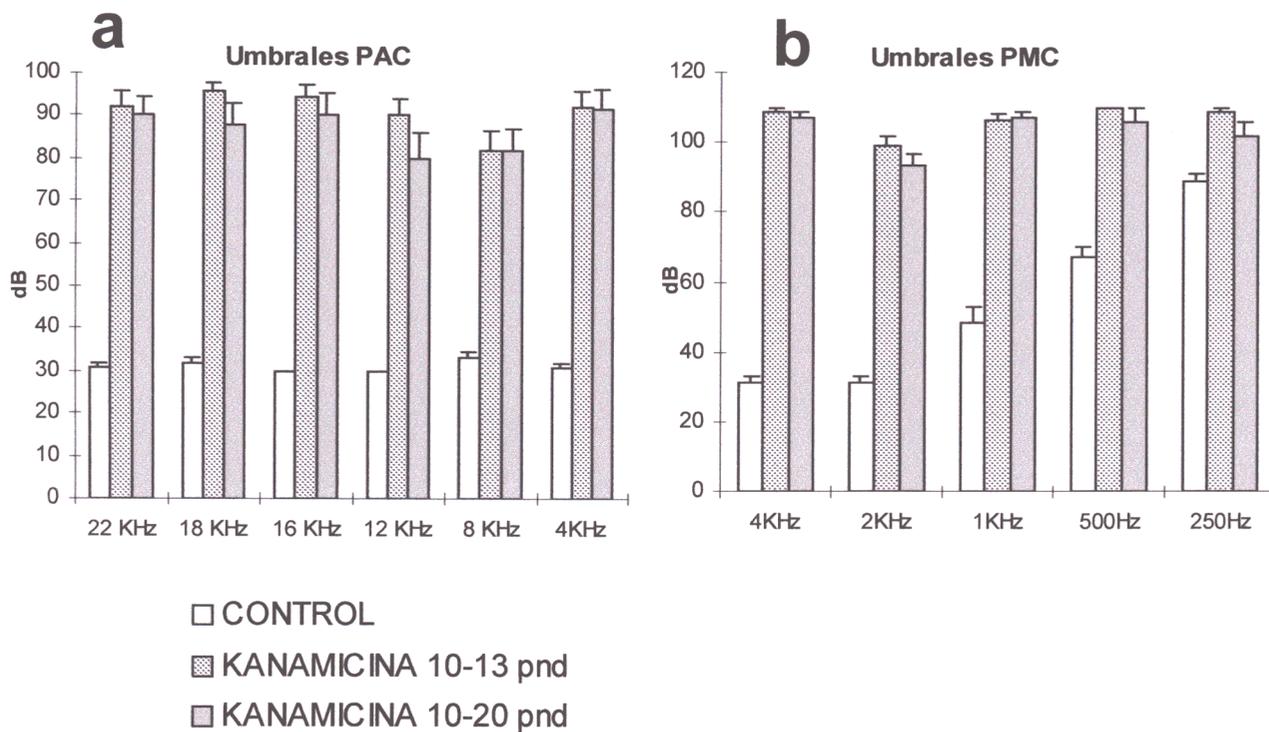
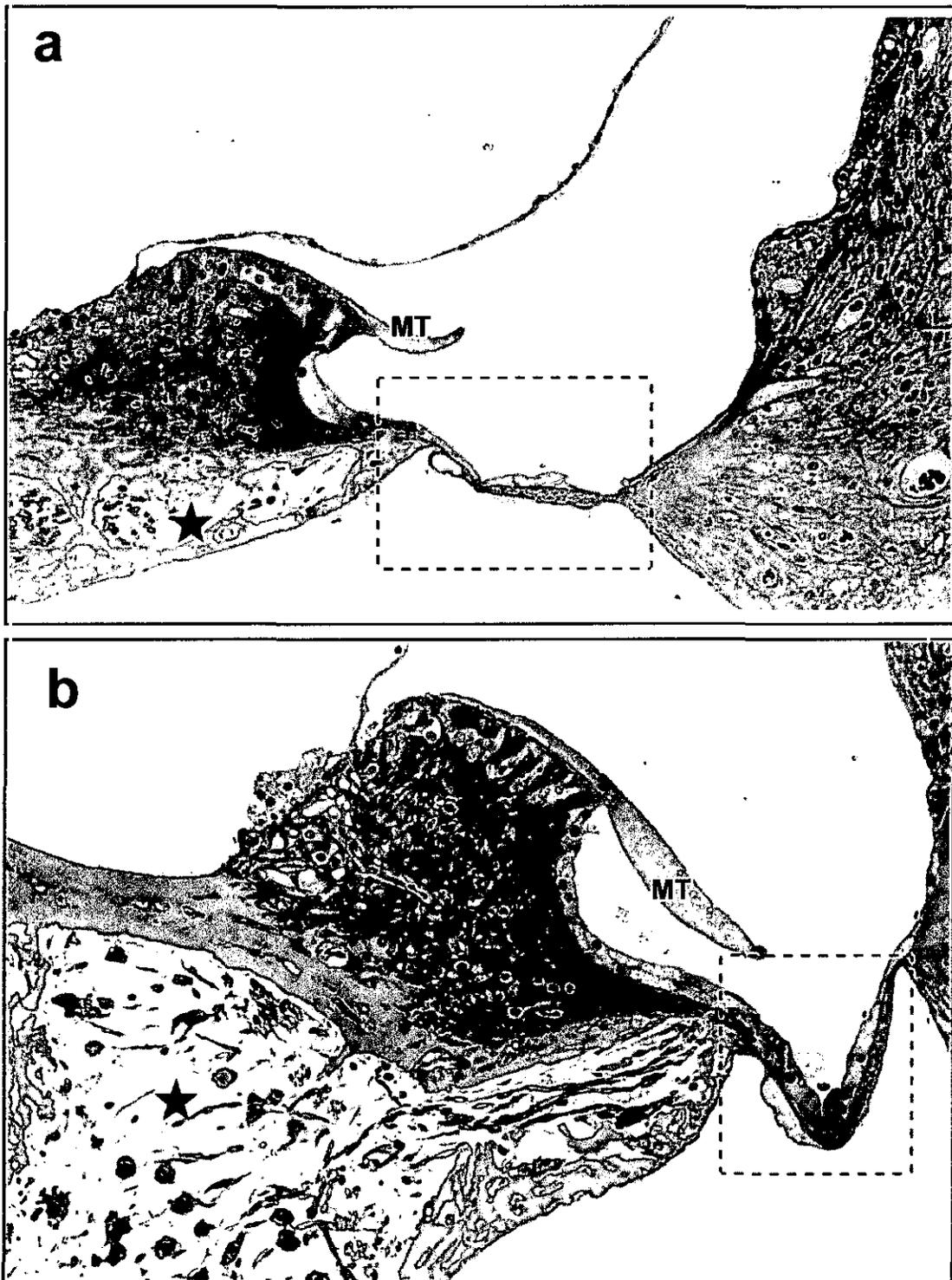


Figura 43



**Figura 44:** Efectos del tratamiento con KANA en el desarrollo. a) Umbrales para el PAC del nervio coclear. b) Umbrales para el PMC. c) Registro de un animal tratado con KANA del 10° al 13° día postnatal. d) Registro de un animal tratado con KANA del 10° al 20° día postnatal.



**Figura 45:** Imágenes microscópicas del órgano de Corti de ratas en desarrollo tratadas con kanamicina.

a) Cóclea de un animal tratado con kanamicina durante los días 10° al 13° postnatales. El tratamiento con kanamicina produjo la eliminación total del epitelio receptor del órgano de Corti (rectángulo) así como de las fibras aferentes del ganglio espiral (estrella). b) Cóclea de un animal tratado con kanamicina durante los días 10° al 20° postnatales. El tratamiento con kanamicina produjo los mismos efectos degenerativos que en el caso anterior.

*MT: membrana tectoria.*

## ***DISCUSIÓN***

## **I. NEUROTOXICIDAD EN EL RECEPTOR AUDITIVO**

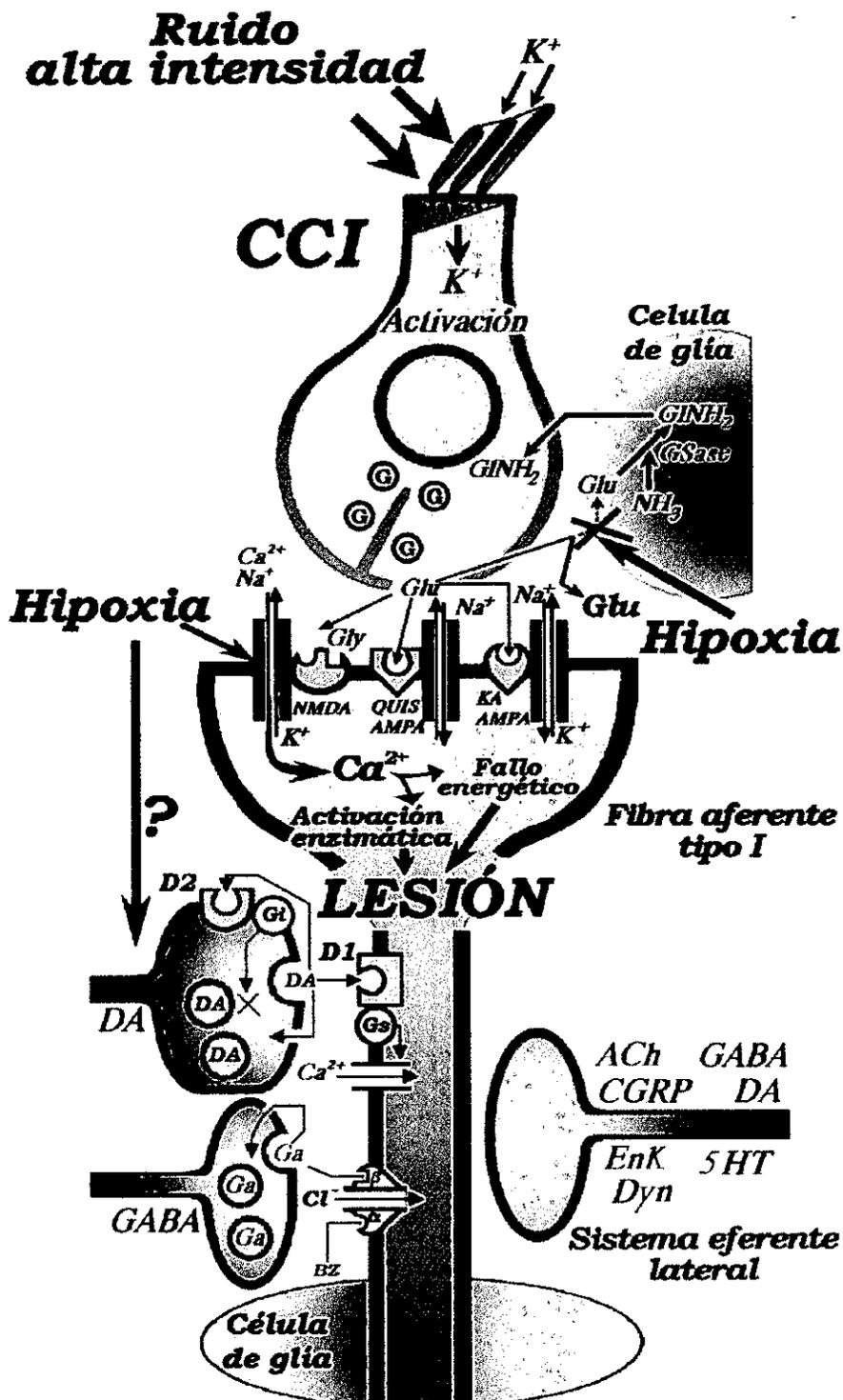
### **a) Análisis de las alteraciones cocleares de etiología neurotóxica.**

Los procesos neurotóxicos que afectan al receptor auditivo están asociados a patologías como la hipoxia-isquemia o a los daños cocleares derivados de la exposición prolongada a sonidos de elevada intensidad, o trauma acústico (Puel y Pujol, 1992). Estas patologías provocan la aparición de edemas dendríticos en los terminales de las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, localizados bajo las CCIs. Estos edemas pueden producir la ruptura de la membrana dendrítica y, conjugado con otros procesos asociados, la consiguiente muerte de la neurona (Eybalin, 1993). Las alteraciones de etiología neurotóxica son muy específicas porque son producidas por un aumento descontrolado de glutamato en las hendiduras de las sinapsis glutamatérgicas, que en el órgano de Corti solo se localizan entre las CCIs y las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear (Fig. 8). Es necesario reseñar que estos mismos procesos neurotóxicos se reproducen, en las mismas condiciones patológicas excepto el trauma acústico, en las vías glutamatérgicas del sistema nervioso central (Olney, 1969, 1983; Olney y cols., 1986; Choi, 1987; Rothman y Olney, 1987), donde fue descrita por primera vez la patología excitotóxica neuronal (Olney, 1969).

Hoy en día se acepta que la liberación excesiva de glutamato es el factor iniciador del proceso neurotóxico y el responsable de la evolución de distintas alteraciones neurodegenerativas ligadas a hipoxia o isquemia (Rothman, 1984; Meldrum, 1985), lesiones cerebrales traumáticas (Faden y cols., 1989) o al envejecimiento (Maragos y cols., 1987; Pujol y cols., 1991). Esta liberación de glutamato desemboca en la acumulación de una gran cantidad de glutamato extracelular que los mecanismos de recaptación normalmente implicados en su regulación, como la recaptación por las células de la glía circundante, no

pueden controlar el proceso (Pujol y cols., 1991). De esta manera, el aumento de glutamato en la sinapsis produce una apertura prolongada de los canales iónicos asociados a los receptores glutamatérgicos postsinápticos, que permite el flujo de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y la entrada pasiva de  $\text{Cl}^-$  al interior de la neurona (Eybalin, 1993). El desequilibrio osmótico resultante causa la entrada de agua en el elemento postsináptico, proceso que desemboca en un edema celular (Rothman, 1985; Olney y cols., 1987). Por un lado, hay un fenómeno de excitotoxicidad de desarrollo rápido que parece ser dependiente de la entrada de  $\text{Cl}^-$ , mientras que la neurotoxicidad de desarrollo lento es dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$ , en la que están implicadas proteasas y lipasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes (Choi, 1985; 1987; Garthwaite y cols., 1986; Murphy y cols., 1988). Consecuentemente, en la cóclea, los edemas dendríticos de las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral que se observan durante o tras el comienzo de las condiciones traumáticas, como los sonidos intensos, hipoxia-isquemia o la acción de aminoácidos excitatorios, implica al primer proceso, mientras que las subsecuentes pérdidas de fibras mielinizadas y las neuronas del ganglio espiral coclear probablemente implican mecanismos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes (Eybalin, 1993).

En la cóclea, los procesos neurotóxicos (Fig. 46) han sido analizados tras la inducción de hipoxia o anoxia (Nadol y Burgess, 1985; Billet y cols., 1989; Puel y Pujol, 1992), bien por hiperestimulación por sonidos mantenidos de elevada intensidad (Robertson, 1983; Cousillas y Rebillard, 1988) o bien mediante la administración de agonistas glutamatérgicos en animales de experimentación (Pujol y cols., 1985; Jensen, 1988; Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Puel y cols., 1991 a; Janssen y cols., 1991; Janssen, 1992; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1999 b).



**Figura 46:** Esquema general de los procesos implicados en la neurotoxicidad del receptor auditivo (Adaptado de Gil-Loyzaga y cols., 1999 a).

La administración de agonistas de los receptores glutamatérgicos, de tipo NMDA o no-NMDA, reproduce las alteraciones observadas en las patologías hipóxico-isquémicas cocleares y en el trauma acústico. Los agonistas glutamatérgicos más utilizados para la evaluación de los efectos en el receptor auditivo de los procesos neurotóxicos han sido los agonistas de receptores ionotrópicos, como el AK, el AMPA o el NMDA, aunque también han sido evaluados los efectos de la administración de glutamato en forma de su sal monosódica (Pujol y cols., 1985; Jensen, 1988; Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Puel y cols., 1991 a; Janssen y cols., 1991; Janssen, 1992; Eybalin, 1993; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1999 b).

El AK es el agonista más potente en su acción neurotóxica, ya que en pequeñas concentraciones es capaz de afectar a un gran número de neuronas glutamatoceptivas (Coyle, 1983). Su administración intracoclear produce rápidamente signos morfológicos y fisiológicos de neurotoxicidad en las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, con la aparición de edemas dendríticos en la práctica totalidad de las fibras y una disminución significativa de la amplitud del PAC del nervio coclear (Pujol y cols., 1985; 1987; Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1998 b; 1999 b). Se ha descrito que aunque las lesiones primarias del proceso neurotóxico, es decir, los edemas dendríticos de las fibras aferentes de tipo I, afectan a la totalidad de dichas dendritas, con el paso del tiempo, solamente desaparece un 34% de las neuronas del ganglio espiral (Juiz y cols., 1989). Este hecho puede reflejar una sensibilidad diferencial a la acción del ácido kaínico, posiblemente debido a una distribución diferencial de los receptores glutamatérgicos en las distintas poblaciones de neuronas aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear (Lefebvre y cols., 1991). Estas diferentes poblaciones se diferencian por sus características morfológicas (diámetro, contenido mitocondrial intradendrítico, complejidad de las sinapsis que forman,

etc.), o por sus características fisiológicas, como la tasa de descarga espontánea de la fibra o su umbral de activación (Lieberman, 1978; 1980; 1982 a y b; Lieberman y Oliver, 1984; Lieberman y cols., 1990).

Por otro lado, la administración del agonista glutamatérgico AMPA produce, prácticamente, los mismos efectos sobre las neuronas del ganglio espiral que el tratamiento con AK, en particular provoca edemas dendríticos en las fibras aferentes de tipo I. Su acción está supeditada al reconocimiento específico de un solo tipo de receptores glutamatérgicos a los cuales da nombre, el receptor AMPA, que al igual que el receptor específico para el AK, es ionotrópico y de tipo no-NMDA (Puel y cols., 1991 b).

El otro gran grupo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos de las neuronas aferentes de tipo I del ganglio espiral es activado por su agonista específico, el NMDA, cuya administración puede inducir, al igual que el resto de agonistas glutamatérgicos, neurotoxicidad coclear bajo unas determinadas condiciones. Se ha descrito que la neurotoxicidad coclear inducida por la administración de NMDA es efectiva cuando se realiza con estimulación sonora, lo cual sugiere que la activación del receptor NMDA requiere una depolarización previa de la membrana postsináptica (Herron y cols., 1986; Collingridge y cols., 1988; Puel y cols., 1990; 1991 a), por parte de los receptores no-NMDA.

Todos estos receptores NMDA y no-NMDA son activados por su neurotransmisor nominal: el glutamato. Los efectos, en el receptor auditivo, de la administración de glutamato monosódico también han sido evaluados, en la rata adulta y en desarrollo (Jensen, 1988; Janssen y cols., 1991; Schweitzer y cols., 1991; Janssen, 1992; Carricondo, 1995), en las que se observan los efectos neurotóxicos habituales, con la producción de edemas dendríticos y pérdida de neuronas aferentes en el ganglio espiral, además de alteraciones

en los núcleos cocleares, como disminuciones de tamaño del núcleo y disminución de su densidad neuronal (Schweitzer y cols., 1991).

Todos estos datos experimentales confirman los resultados generales obtenidos en el protocolo de neurotoxicidad anteriormente descrito. Así, en esta Memoria de Tesis Doctoral se demuestra que la administración intraperitoneal de GMS en ratas produjo alteraciones cocleares susceptibles de ser incluidas dentro de los daños producidos por un proceso neurotóxico. De esta manera se observaron pérdidas neuronales, de distinto grado según el grupo de tratamiento, en el ganglio espiral, además de algunos procesos edematosos en las dendritas aferentes de tipo I. Todos estos efectos sobre la anatomía del receptor auditivo se tradujeron en alteraciones, de mayor o menor calibre, sobre los potenciales de acción compuesto del nervio coclear. Estas alteraciones del PAC del VIII par, tanto en la latencia como en la amplitud de la onda N1 del PAC, son fiel reflejo de la pérdida de unidades de disparo en el ganglio espiral, ya que este PAC se constituye por la descarga sincrónica de las neuronas del ganglio espiral que han sido activadas por un determinado estímulo.

Los dos procesos patológicos que suceden a la exposición al neurotóxico, es decir, la formación de edemas dendríticos en la membrana postsináptica y la posterior muerte neuronal, producen las mismas alteraciones del PAC del VIII par. Así, en experimentos de efectos agudos de la administración de cualquier agonista glutamatérgico, como el ácido kaínico, en los que se realiza una rápida evaluación de sus efectos electrofisiológicos y morfológicos, se observa que la inducción de la formación de edemas dendríticos produce una disminución de la amplitud del PAC y un aumento de su latencia (Gil-Loyzaga y cols., 1999 b). Por otro lado, nuestros resultados sugieren que las alteraciones del potencial coclear registrado son debidas directamente al segundo proceso, es decir, a la pérdida de unidades

neuronales en el ganglio espiral, ya que los procesos edematosos no son frecuentes en estas preparaciones. Este hecho podría estar relacionado con el tiempo transcurrido entre la administración del aminoácido excitotóxico y el registro del PAC del nervio auditivo y el estudio morfológico de las cócleas. Esto nos lleva a sugerir que los efectos iniciales del proceso neurotóxico, es decir, la generación de edemas dendríticos, podrían ser recuperados en el tiempo si el edema no pasa de un cierto nivel que implicase la rotura de la membrana postsináptica y la consiguiente muerte neuronal, que ya sería irreversible. Esto explicaría los resultados obtenidos tras la administración de AK, en los que se observa que tras el tratamiento la mayoría de las dendritas aferentes de tipo I tienen procesos edematosos, mientras que 10 días después de la administración de AK, la pérdida de neuronas en el ganglio espiral solo afecta a un 34% de la población total del ganglio (Juiz y cols., 1989).

En esta situación, la presencia de edemas dendríticos en algunas cócleas de nuestro estudio, como los que se pueden observar en las figuras 19 b y 23 b, podrían ser signos de la activación de un proceso neurotóxico pero de etiología hipóxico-isquémica, debida a un retraso del procesado coclear para realizar el estudio morfológico. En cualquier caso, no podemos descartar que puedan ser, efectivamente, efectos neurotóxicos debidos al tratamiento con GMS, pero en el caso de que realmente estuvieran inducidos por un pequeño retraso en la fijación del tejido, que implicaría una situación de hipoxia coclear y la formación de estos edemas dendríticos, no habrían afectado a los registros electrofisiológicos ya que los edemas se habrían producido tras la extirpación de las cócleas y, consecuentemente, tras el registro del PAC del nervio coclear. Además, este hipotético pequeño defecto en el procesado de estas muestras morfológicas nos permite demostrar que los efectos de la hipoxia sobre las neuronas glutamatérgicas son totalmente equiparables a los producidos por la administración de agonistas de los receptores

glutamatérgicos y, por ello, constituye un buen modelo para el estudio de la patología neurotóxica en la cóclea.

**b) Análisis comparado de los efectos de la neurotoxicidad inducida por la administración de GMS a lo largo del desarrollo coclear.**

Tras la observación y comparación de las imágenes microscópicas del órgano de Corti y del ganglio espiral coclear de todos los grupos de tratamiento con GMS, resulta evidente que hay al menos dos grupos de edad en los que la administración intraperitoneal de GMS, en sus respectivos períodos de vida postnatal, produjo unas alteraciones de mayor calibre que en el resto de los grupos. Así, los animales que fueron tratados con GMS durante los períodos del 6º al 9º y del 9º al 12º día postnatal, sufrieron grandes pérdidas neuronales en el ganglio espiral (Figs. 23 y 27), aunque también los animales tratados del 15º al 18º día postnatal con GMS presentaron también una disminución significativa en el número de neuronas en el ganglio espiral (Fig. 31).

En el estudio de los efectos electrofisiológicos de la administración de GMS sobre el PAC en todos los grupos por separado, no se aprecian bien el grado de afectación neurotóxica de cada grupo de edad respecto de los demás. En un análisis comparado de estos efectos inducido por el tratamiento con GMS en los distintos períodos de desarrollo (Figs. 47 y 48), se observa que el PAC del nervio coclear se ve afectado de distinta manera en los diferentes períodos de tratamiento de GMS a lo largo del desarrollo del receptor auditivo. Esta variabilidad de las alteraciones electrofisiológicas cocleares frente a la neurotoxicidad inducida por la administración intraperitoneal de GMS en los diferentes grupos de tratamiento permitió el estudio de los períodos de máxima sensibilidad a la patología neurotóxica.

# Análisis comparado de los efectos neurotóxicos de GMS a lo largo del desarrollo. Latencia N1 del PAC

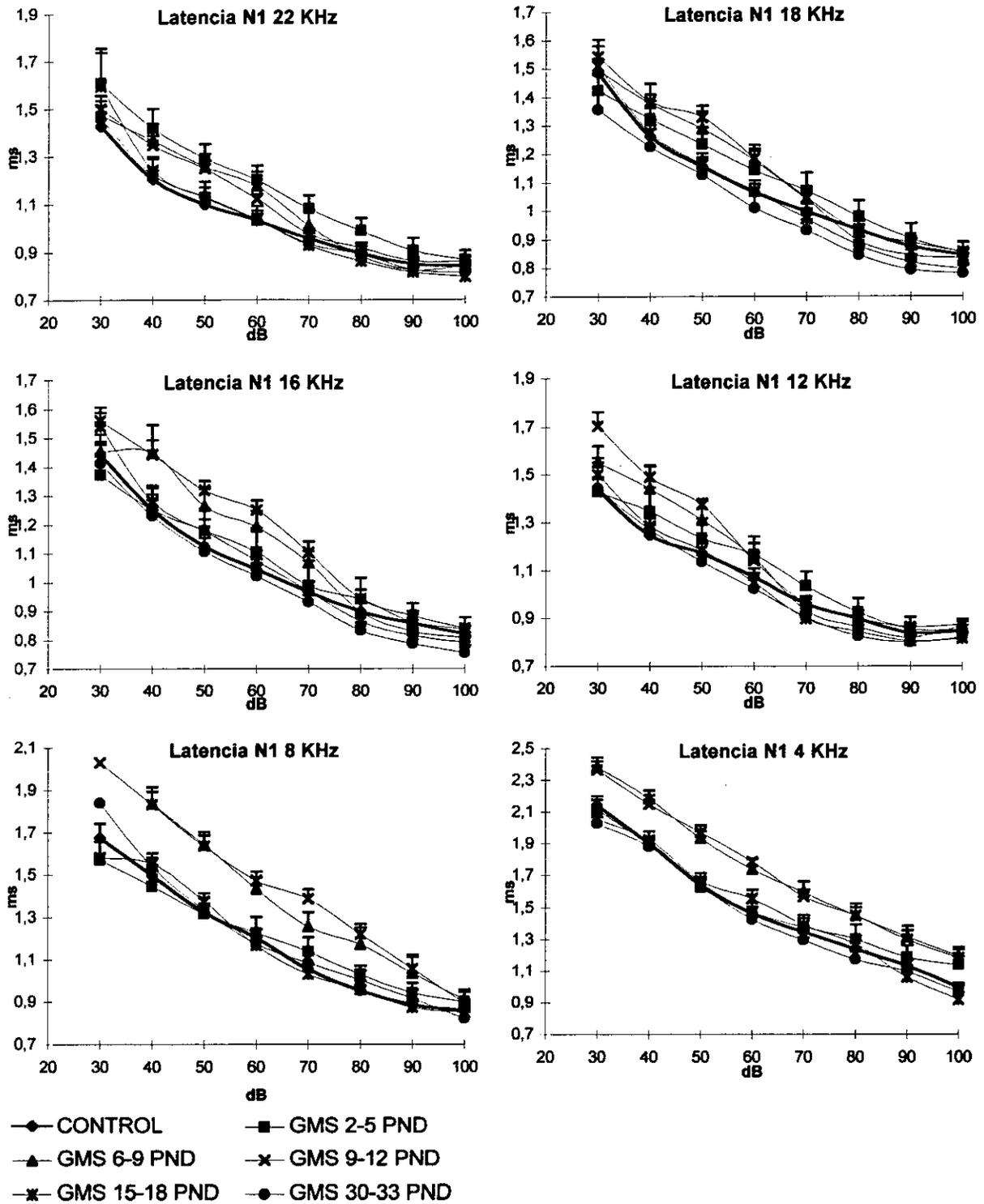


Figura 47

# Análisis comparado de los efectos neurotóxicos de GMS a lo largo del desarrollo. Amplitud N1 del PAC

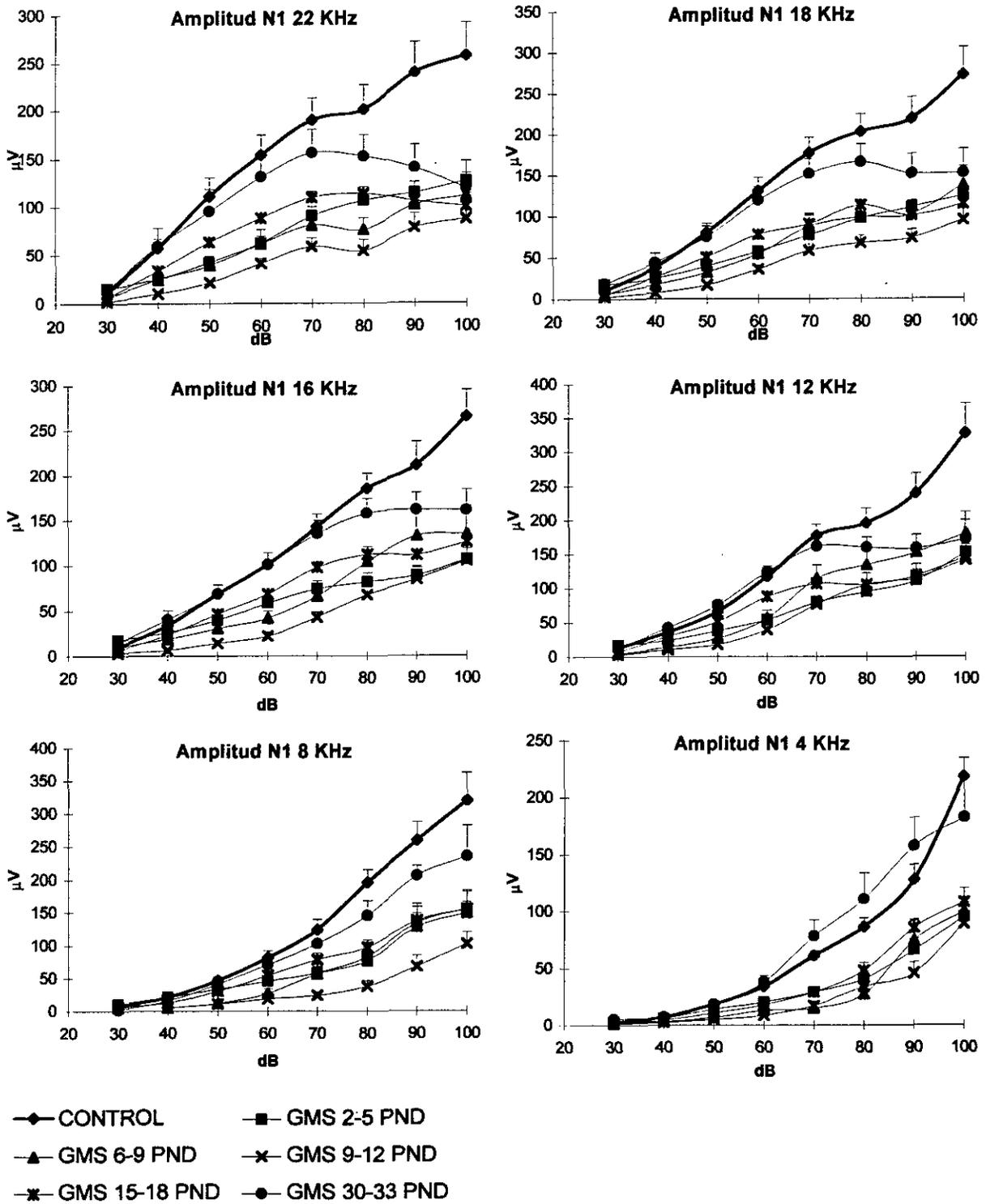


Figura 48

En general, los valores de la latencia (Fig. 47) de los distintos grupos se aproximaron mucho a los valores obtenidos en el grupo control, pero en el caso de los grupos de administración de GMS en los días 6° al 9° día postnatal y durante el 9° y el 12° día postnatal los aumentos de latencia de la onda N1 del PAC encontrados con respecto al grupo control fueron mayores que en otros grupos, sobre todo en las frecuencias 8 y 4 KHz. También el grupo de administración durante los días 15° al 18° mostró una latencia incrementada bajo estimulación de 16 KHz.

En cuanto al análisis comparado de los valores de la amplitud de la onda N1 del PAC del nervio coclear (Fig. 48), los datos obtenidos muestran una mayor afectación al tratamiento con GMS en los períodos del 6° al 9° día postnatal y del 9° al 12° día postnatal, mostrando una gran disminución de dicha amplitud de la onda N1 del PAC frente a los valores obtenidos en el grupo control. También se observaron disminuciones variables en magnitud en los grupos de tratamiento del 2° al 5° día postnatal y del 15° al 18° día postnatal. El grupo menos afectado por la administración intraperitoneal de GMS, para estos valores de amplitud, fue el de tratamiento durante los días postnatales 30° al 33°.

Estos resultados parecen indicar que las alteraciones registradas en el PAC del nervio coclear se correlacionan perfectamente con la magnitud los daños neurotóxicos inducidos en el receptor auditivo y que, como ya hemos comentado anteriormente, el PAC del VIII par refleja el número de neuronas que disparan sus respectivos potenciales sincrónicamente tras la estimulación sonora. Además, también queda demostrada la existencia de un período, entre el 6° y 12° día postnatal y que podría alargarse hasta el 18° día postnatal, en el que el receptor auditivo de la rata es muy sensible a los procesos neurotóxicos, que en este caso fueron inducidos por la administración de GMS

pero que pueden ser perfectamente extrapolables a procesos patológicos cocleares de origen hipóxico-isquémico.

La existencia de este período de máxima sensibilidad de las fibras aferentes del ganglio espiral coclear a la neurotoxicidad puede estar relacionada con un incremento, durante este período de desarrollo del receptor auditivo, de la expresión de los receptores glutamatérgicos en dichas fibras, previo a su reorganización definitiva en las fibras aferentes de la cóclea madura.

La presencia de los receptores glutamatérgicos en las fibras aferentes de la cóclea en desarrollo ha sido demostrada mediante el análisis de los efectos de la administración de distintos agonistas glutamatérgicos durante la ontogenia en animales de laboratorio. Así, la administración intracoclear de AK en ratas de 6 días de vida induce la aparición de lesiones edematosas en las dendritas aferentes del ganglio espiral. Estas lesiones pudieron ser observadas en la base de las CCI y de las CCEs (Pujol y cols., 1985; 1987; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Simmons y cols., 1990). De hecho, la sensibilidad de las fibras aferentes cocleares al AK se ha demostrado en neuronas en cultivo procedentes de cócleas de embriones de rata de 18 días de gestación (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 b), así como en embriones de 17 días de edad gestacional y en ratas de 1 día de edad postnatal (Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 b), lo cual indica que la expresión de receptores glutamatérgicos está presente en períodos muy tempranos del desarrollo ontogénico de la cóclea y que las CCEs están inervadas, al menos en un corto período del desarrollo, por fibras glutamatérgicas. Respecto a este último punto, se especula sobre si las fibras aferentes de tipo II, que inervan a las CCEs, pudieran expresar receptores glutamatérgicos en algún momento del desarrollo o si las fibras aferentes de tipo I pudieran lanzar colaterales, en este período ontogénico, a las CCEs para inervarlas. Los datos disponibles al

respecto sitúan la segunda hipótesis como la más acertada, de manera que al avanzar la sinaptogénesis coclear estas colaterales se retraerían (Pujol y cols., 1985; Pujol y cols., 1987; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b).

La hipótesis de posibles sobreexpresiones, durante el desarrollo, de los receptores glutamatérgicos en las fibras aferentes cocleares viene apoyada por datos en los que se describen fluctuaciones del número de receptores glutamatérgicos, en concreto los receptores NMDA, en determinadas regiones del sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo (Garthwaite y cols., 1987; Bode-Greuel y Singer, 1989; McDonald y cols., 1988; 1989; Tremblay y cols., 1988; Represa y cols., 1989).

En el presente estudio se observa una coincidencia temporal entre el periodo en que las fibras aferentes son más sensibles a la neurotoxicidad, con datos preliminares sobre una reorganización significativa de la población neuronal del ganglio espiral coclear, que incluye la muerte fisiológica de un elevado número de neuronas (Sobkowicz, 1992). En la rata, el ganglio espiral pierde en este período, 5º y 6º día postnatal, aproximadamente de un 22% a un 25% de la población neuronal del ganglio (Rueda y cols., 1987), mientras que en el embrión de pollo de 8 a 14 días se pierden alrededor de un 25% de la población neuronal del ganglio coclear (Ard y Morest, 1984). En ambas especies, esta pérdida de unidades neuronales del ganglio espiral coincide con el final de la sinaptogénesis coclear (Sobkowicz, 1992).

La hipotética sobreexpresión de receptores glutamatérgicos de las fibras aferentes durante el período comprendido entre el 6º y el 12º día postnatal, período en el que hemos observado la mayor sensibilidad de las fibras a la neurotoxicidad inducida por el GMS, podría estar relacionada, además, con el proceso de maduración de las células ciliadas del órgano de Corti. Es en este período cuando se completa la diferenciación y la maduración de las células ciliadas (Lenoir y cols., 1980 a; 1987; Gil-Loyzaga y Brownell, 1988; Gil-

Loyzaga y cols., 1989) y no es hasta el 3º día postnatal, en la rata, en el que las células ciliadas empiezan a diferenciarse del resto del epitelio que forma el órgano de Kölliker expresando determinadas sustancias como los antígenos B y H (Gil-Loyzaga y cols., 1989). Este comienzo de la diferenciación de las células ciliadas es importante para la culminación de su inervación. En cultivos organotípicos de cócleas fetales se ha observado que el crecimiento de los procesos periféricos de las fibras aferentes del ganglio espiral estaría regulado por las células sensoriales (Sobkowicz y Rose, 1983; Sobkowicz, 1992). Estos datos podrían sugerir que el proceso de interacción entre las células ciliadas y las fibras aferentes empezaría en el 3<sup>er</sup> día de desarrollo postnatal de la rata. Esta interacción implicaría el aumento de receptores glutamatérgicos en la fibra, debido a una acción neurotrófica por parte del glutamato (Janssen y cols., 1991). Así, se podría explicar que el máximo daño neurotóxico lo encontremos a partir del 6º día postnatal. Por otro lado, explicaría también que en el grupo de administración de GMS en el período del 2º al 5º día postnatal la disminución del número de neuronas no sea tan evidente, aunque electrofisiológicamente queda demostrada la acción neurotóxica del glutamato, ya que esta fluctuación de receptores glutamatérgicos no habría alcanzado su máximo.

Estos resultados demuestran la presencia de receptores glutamatérgicos en períodos tempranos del desarrollo de la cóclea. Asimismo, podemos sugerir la existencia de posibles variaciones en el número de receptores de las fibras y su posible reorganización durante la ontogenia coclear. A estos procesos se añade el papel jugado en la sinaptogénesis coclear por los factores de crecimiento neurotróficos, como el BDNF o las neurotrofinas (Fritsch y cols., 1997). Todos estos resultados parecen indicar que probablemente este período de formación del receptor auditivo puede ser el más crítico y sensible a la patología neurotóxica y que, por ello, el daño inducido por la

administración de GMS en este período, del 6° al 12° día postnatal de la rata, es mayor que el producido en otras etapas del desarrollo.

Finalmente, los animales tratados con GMS durante el 30° al 33° día postnatal, que se consideran adultos, presentaron alteraciones en el registro del PAC del nervio coclear, pero de menor intensidad que las encontradas en los estadios de mayor sensibilidad a la neurotoxicidad antes comentados. Asimismo, no se observaron grandes alteraciones en el número de neuronas del ganglio espiral, en comparación con los animales del grupo control. Estos datos parecen indicar que, en el estadio adulto, el receptor auditivo presenta mayor resistencia a la neurotoxicidad, probablemente debida a la maduración de los mecanismos que impiden que el glutamato se acumule en exceso en las sinapsis glutamatérgicas. Se debe considerar que el neurotóxico utilizado en este estudio es el mismo glutamato, para el cual se han diseñado, a lo largo de la evolución filogénica, numerosos mecanismos de aclaramiento. De hecho, la utilización de agonistas glutamatérgicos que no se presentan en los organismos vivos como el AK produce lesiones mucho mayores que el GMS, aun cuando se utiliza en menores concentraciones, ya que los mecanismos de defensa, como la recaptación por parte de las células gliales, no son capaces de reconocerlo y eliminarlo de la sinapsis (Gil-Loyzaga y cols., 1999 b).

### **c) Análisis de los efectos protectores del tratamiento con diltiazem frente a la neurotoxicidad inducida por GMS en el desarrollo coclear.**

La culminación del proceso neurotóxico es la muerte de la neurona glutamatérgica. De hecho, en los resultados presentados en este trabajo se puede observar que cuando se realiza un estudio a medio plazo de los efectos de la neurotoxicidad en el receptor auditivo, las únicas alteraciones realmente achacables a la neurotoxicidad inducida por la administración del GMS son la pérdida de unidades neuronales en el ganglio espiral coclear, ya que los

edemas dendríticos que se producen en las primeras fases de la patología neurotóxica pueden ser recuperados, siempre y cuando éstos no impliquen la rotura de la membrana postsináptica.

El responsable final de la muerte de la fibra, aún cuando no se ha producido la rotura de la membrana neuronal, es el incremento incontrolado de la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma celular tras la activación y la consiguiente depolarización de la membrana que sucede al incremento patológico de glutamato en la sinapsis glutamatérgica (Choi, 1987; Goldberg y cols., 1987; Weiss y cols., 1990).

En estas condiciones de neurotoxicidad, los mecanismos que habitualmente regulan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , la ATP-asa  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente y la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en orgánulos citoplásmicos, quedan totalmente desfasados y no pueden controlar el exceso del ión. El proceso se agrava con la disminución de ATP intracelular debido a la hipoxia que desencadena el proceso neurotóxico, que impedirá que las proteínas ATP-dependientes saquen al exterior de la célula el  $\text{Ca}^{2+}$  (Matías-Guiu, 1990).

Como ya se ha mencionado, existen varios caminos que permiten la entrada, en determinadas condiciones, del  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, el ión podrá entrar en la célula a través de los canales voltage-dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , el canal iónico asociado a los receptores NMDA, el intercambiador intramembrana de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , además de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma por parte de los depósitos del ión en el retículo endoplásmico, en respuesta de la activación de receptores del inositol trifosfato por segundos mensajeros intracitoplásmicos, liberados por receptores metabotrópicos (Weiss y cols., 1990; Stys y cols., 1991).

Por lo tanto, parece lógico pensar que el bloqueo específico de uno o varios de estos caminos de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  en la fibra podría redundar en la

posible protección de la fibra frente al proceso neurotóxico. Esta hipótesis ha sido investigada por numerosos grupos de investigación, centrándose la mayoría de estas investigaciones en el uso de antagonistas de los receptores NMDA para bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de su canal asociado (Rothman, 1984; Simon y cols., 1984; Clark y Rothman, 1987; Gill y cols., 1987; Goldberg y cols., 1987; Faden y cols., 1989; Olney y cols., 1989; Puel y cols., 1991 b; Siegel, 1991; Janssen, 1992; Pujol y cols., 1992 a).

En el receptor auditivo, se ha evaluado también la capacidad de protección de los antagonistas de los canales volt-dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  frente a los efectos neurotóxicos derivados de la administración de agonistas glutamatérgicos. De hecho, el bloqueo específico de estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido el objetivo de investigación para la búsqueda de un método eficaz de neuroprotección del receptor auditivo en desarrollo frente a la neurotoxicidad de esta memoria de Tesis Doctoral. En experimentos preliminares de nuestro laboratorio, la administración de diltiazem previa a la de AK o de GMS, en ratas adultas, produjo a disminución significativa del número de dendritas con procesos edematosos que se hallaron tras el tratamiento con estos neurotóxicos (Gil-Loyzaga y cols., 1993 b), así como una recuperación de los valores normales de la latencia y la amplitud de la onda N1 del PAC del nervio coclear (Carricondo, 1995). Prácticamente los mismos efectos protectores los encontramos utilizando el nimodipino, una dihidropiridina, frente a la neurotoxicidad coclear inducida por la administración inducida por AK (Hernández, 1993).

En los resultados electrofisiológicos presentados en esta memoria, se observa una tendencia general a la recuperación, en mayor o menor medida, de los valores de latencia y de amplitud de la onda N1 del PAC del nervio coclear que fueron alterados por los efectos neurotóxicos inducidos por la administración en distintos periodos del desarrollo de GMS. De todos modos

este grado de protección frente a la neurotoxicidad varió dependiendo del período de desarrollo postnatal en que se inyectó el GMS. Así, la administración previa de diltiazem previa a la GMS, produjo los mejores resultados electrofisiológicos en los grupos de tratamiento del 2° al 5° (Figs. 17 y 18), del 15° al 18° (Figs. 29 y 30) y del 30° al 33° día postnatal (Figs. 33 y 34). En estos grupos se observó que los valores de amplitud de la onda N1 del PAC del VIII par, que se vieron más afectados por el tratamiento con GMS que los de la latencia, recuperaron en gran medida las mediciones obtenidas en el grupo control. En el grupo de tratamiento del 6° al 9° día postnatal, se observó que la administración de diltiazem, si bien produjo pequeños incrementos de la amplitud de la onda N1 del PAC, respecto a los valores obtenidos en el grupo tratado con GMS, no produjo ningún efecto significativo de recuperación de los valores de la latencia de dicha onda (Figs. 21 y 22). Este mismo comportamiento lo encontramos en los registros de los animales tratados con diltiazem y GMS durante el 9° y el 12° día postnatal. En este caso, la amplitud de la onda N1 del PAC se recupera bien frente a los valores alcanzados por el grupo de tratamiento con GMS, pero los valores de latencia siguen siendo elevados.

Estos resultados electrofisiológicos han sido corroborados por los estudios morfológicos de las cócleas de estos animales. Así, podemos indicar que la recuperación de unidades neuronales en el ganglio espiral debida a la administración de diltiazem es evidente sobre todo en el grupo de tratamiento del 15° al 18° día postnatal (Fig. 32). En los grupos que respondieron peor electrofisiológicamente al tratamiento con diltiazem, esto es, los grupos de tratamiento del 6° al 9° (Fig. 24) y del 9° al 12° día postnatal (Fig. 28), presentaron todavía pérdidas, si bien algo menores que las del grupo de tratamiento con GMS, de neuronas en el ganglio espiral.

Estos resultados demuestran la existencia de un período especialmente sensible a la actuación de los procesos neurotóxicos en el desarrollo coclear de la rata. Este período, que ya fue descrito en el análisis de los efectos de la administración de GMS en el desarrollo, sería el que incluye el período comprendido entre el 6° y el 12° día postnatal.

La diferente actuación protectora del antagonista del calcio frente a los efectos de la neurotoxicidad en el PAC, es decir actuación de mejora de la amplitud pero no de la latencia del PAC del nervio coclear, en este período de máxima sensibilidad neurotóxica podría estar relacionada con el desarrollo de las distintas subpoblaciones de fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear descritas según su tasa de descarga espontánea (Liberman, 1978; 1980; 1982 a y b; Liberman y Oliver, 1984; Liberman y cols., 1990). Estas diferencias son, probablemente debidas a la distribución diferencial de los receptores glutamatérgicos de tipo no-NMDA, de bajo umbral de activación, y los NMDA, de alto umbral de activación. Esta hipótesis nos induce a pensar que las fibras de alta frecuencia de descarga espontánea deberían tener una elevada cantidad de receptores glutamatérgicos de bajo umbral de activación, es decir, de tipo no-NMDA, en la membrana postsináptica, mientras que las de media y baja frecuencia de descarga espontánea podrían tener en su superficie postsináptica mayor cantidad de receptores de alto umbral de activación. La consecuencia de esta hipótesis en la generación del PAC del nervio coclear sería que la latencia del PAC estaría definida por aquellas fibras que respondiesen antes al estímulo sonoro, es decir, las de alta frecuencia de descarga espontánea y bajo umbral de activación, mientras que la amplitud sería el reflejo de todo el tren de fibras de media o baja frecuencia de descarga espontánea y de alto umbral de activación que dispararían en sincronía tras el estímulo sonoro. Este diferente comportamiento fisiológico de las fibras de tipo I del ganglio espiral coclear, podría tener sus consecuencias para la

funcionalidad protectora del antagonista del  $\text{Ca}^{2+}$  en situaciones neurotóxicas, pudiendo, como en nuestro caso, predominar de alguna manera la protección sobre aquellas fibras de media y baja frecuencia de descarga en comparación con las de alta frecuencia de descarga cuya fisiología de activación las haría más sensibles a la neurotoxicidad.

Estos resultados sugieren que el uso de bloqueantes de los canales voltodependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser un buen método para la protección de las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral frente a los procesos neurotóxicos derivados de la administración de GMS. Los resultados obtenidos en el grupo de administración de animales adultos, del 30° al 33° día postnatal, son corroborados por los experimentos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio (Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; Hernández, 1993; Carricondo, 1995), mientras que la capacidad protectora de estas sustancias en los procesos neurotóxicos inducidos durante el desarrollo del receptor auditivo parece depender de una sensibilidad variable del sistema a la neurotoxicidad a lo largo del desarrollo ontogénico. Basándonos en la capacidad neuroprotectora de estos bloqueantes del calcio demostrada con anterioridad, podemos pensar que la disminución de la capacidad de protección del sistema exhibida en los animales de este período de máxima sensibilidad no es debida en sí misma al diltiazem, sino que tal vez las concentraciones utilizadas para inducir la neuroprotección deberían ser adecuadas al momento de desarrollo coclear en el que se instaure el tratamiento protector frente a la neurotoxicidad, es decir, a mayor sensibilidad del sistema, tal vez mayor debería ser la administración del antagonista del  $\text{Ca}^{2+}$ , para proteger a la fibra.

## **II. OTOTOXICIDAD EN EL RECEPTOR AUDITIVO**

El protocolo de ototoxicidad fue diseñado para la evaluación de las aptitudes de registro del potencial microfónico coclear (PMC), de un nuevo equipo de registro de dichos potenciales diseñado y desarrollado por el Dr. Julio Sanjuán Juaristi, del servicio de Fonoaudiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. La aplicación experimental de este nuevo equipo nos permitió, además, analizar los efectos sobre la generación del PMC de los procesos neurotóxicos y ototóxicos. Así, este protocolo se diseñó en tres fases de manera que en un primer momento se evaluaron los efectos de la administración de un neurotóxico, el AK, en animales adultos sobre el PMC y a continuación se estudiaron las alteraciones funcionales auditivas de animales adultos y en fases de desarrollo postnatal frente a la ototoxicidad inducida por la administración de un antibiótico aminoglucósido, la kanamicina.

### **a) Análisis de los efectos de la neurotoxicidad sobre el PMC y el PAC del nervio auditivo en ratas adultas.**

El análisis de los resultados obtenidos en esta fase del estudio nos permitió realizar la determinación del lugar de producción del potencial que se registró con el nuevo equipo de registro.

El tratamiento con AK, que fue el neurotóxico seleccionado para la inducción de la neurotoxicidad coclear, produjo los resultados esperados tras este tipo de tratamiento y que ya han sido analizados en el apartado anterior. Así, la neurotoxicidad producida por el AK se manifestó en los registros del PAC del nervio coclear, como un aumento significativo de la latencia y una elevada disminución de la amplitud de la onda N1 del PAC, en comparación con los valores obtenidos en el grupo control (Fig. 37). En este caso, las alteraciones en el PAC son un fiel reflejo del proceso neurotóxico desencadenado por el AK, que afectó específicamente a las fibras aferentes

de tipo I del ganglio espiral coclear, produciendo los típicos edemas dendríticos en la zona basal de las CCI del órgano de Corti (Fig. 39), de manera que se redujo el número de unidades de disparo en el ganglio espiral tras la estimulación sonora y por lo tanto el PAC, así formado, pierde sus atribuciones.

Por otro lado, los registros realizados con el nuevo equipo de registro de PMC, no presentaron diferencias significativas de umbral del PMC entre los registros realizados antes y después del tratamiento con AK (Fig. 38).

Ya ha sido descrito que el PMC se origina en la actividad fisiológica de las CCEs (Davis, 1958; Russell y Sellick, 1991). El neurotransmisor implicado en las sinapsis entre las CCEs y las fibras aferentes de tipo II del ganglio espiral que las inervan permanece desconocido (Eybalin, 1993), pero los datos científicos disponibles apuntan a que el glutamato no estaría implicado en estas sinapsis (Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Janssen, 1992; Puel y Pujol, 1992; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1998 b; 1999 b; Simón y cols., 1994; Puel, 1995). Por lo tanto, la neurotoxicidad, que solo afectaría, como ya hemos visto, a las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, fue seleccionada para este experimento para eliminar la posibilidad de que el potencial registrado por el nuevo equipo estuviera generado por la activación de dichas fibras.

Como ya se expuso en el apartado anterior, la administración del AK, que es un agonista de los receptores glutamatérgicos de tipo no-NMDA, induce un proceso excitotóxico en neuronas glutamatérgicas del sistema nervioso central (Rothman y Olney, 1987; Choi, 1988) y del receptor auditivo (Juiz y cols., 1989; Gil-Loyzaga y Pujol, 1990 a y b; Gil-Loyzaga y cols., 1993 b; 1998 b; 1999 b). Esta afectación neurotóxica se concreta en la producción de edemas dendríticos en las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear, mientras que no se observan daños en las células ciliadas ni en las fibras

aferentes de tipo II. En nuestros resultados, la administración de AK no produjo cambios significativos en los umbrales de audición para el PMC. Estos resultados son corroborados por estudios previos (Jenison y cols., 1986; Puel y cols., 1991 a y b) que describen la ausencia de efectos de la administración de agonistas glutamatérgicos en la producción del PMC. Este hecho demuestra claramente que el potencial registrado con el nuevo equipo no se genera en el conjunto formado por las CCI y las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral.

Un efecto que se observa en los registros del PMC es el aumento del umbral auditivo en las frecuencias de estimulación más graves, 500 y 250 Hz. Este efecto puede ser debido a que las frecuencias de estos sonidos son demasiado graves para el receptor auditivo de la rata y están en el límite de su espectro audible.

#### **b) Análisis de los efectos sobre el PMC del tratamiento con kanamicina en el receptor auditivo de la rata adulta.**

El análisis de la ototoxicidad inducida por el tratamiento con antibióticos aminoglucósidos en la rata adulta fue el objetivo de esta segunda fase de estudio. Las propiedades ototóxicas de estas sustancias han sido profusamente estudiadas y son bien conocidas (Eybalin, 1993). Su administración produce cambios significativos en el PMC (Nuttall y cols., 1977; Dumas y Charachon, 1982), así como lesiones en las CCEs y en otras estructuras del órgano de Corti (Bartolomé y cols., 1999 a).

La administración diaria de kanamicina (KANA) en las ratas adultas de nuestro experimento, produjo un incremento de los umbrales auditivos para el PMC a partir del tercer día de tratamiento (Fig. 40). El desarrollo de la afección ototóxica fue posible gracias a la capacidad del nuevo equipo de registro de PMC de registrar el potencial con electrodos de superficie, sin necesidad de

ninguna intervención quirúrgica. El incremento progresivo de los umbrales auditivos para el PMC indica la gran especificidad y agudeza de este PMC registrado. Las alteraciones producidas por este tratamiento crónico con KANA sobre el PMC fueron corroboradas por las imágenes de microscopía de las cócleas de estos animales, en las que se observan claramente las afectaciones en el órgano de Corti de la ototoxicidad (Fig. 41). Dichas alteraciones se concretaron en la eliminación de las células ciliadas del epitelio sensorial del órgano de Corti, de manera que la porción coclear más afectada por el proceso ototóxico fue la espira basal, aunque el daño en el epitelio sensorial fue también evidente en las espiras más apicales. Esta gradación en el daño ototóxico desde la base hacia el ápex coclear, concuerda con el comportamiento típico descrito en estudios previos (Eybalin, 1993).

En este caso, en el registro previo al tratamiento crónico con KANA, se observa, al igual que en el estudio de neurotoxicidad anterior, que los valores de umbral para el PMC se incrementan en las frecuencias graves, lo que concuerda con la idea de que la rata no puede codificar correctamente estos sonidos tan graves.

En resumen, esta fase de estudio nos permitió concluir que, efectivamente, el potencial registrado por el nuevo equipo se producía en las CCEs y que por lo tanto se trataba realmente del PMC.

### **c) Análisis de los efectos de la administración de KANA en el desarrollo del receptor auditivo.**

Como complemento al estudio de la ototoxicidad en animales adultos y al estudio de los efectos de la neurotoxicidad en el desarrollo del receptor auditivo, se propuso esta tercera fase de este protocolo, el estudio de los efectos a largo plazo de la administración del antibiótico aminoglucósido KANA en un período del desarrollo del receptor auditivo. Los dos tratamientos

descritos en el apartado de material y métodos comienzan la administración de KANA en el 10º día postnatal y se alarga hasta el 13º y el 20º día postnatal. Este periodo de administración fue seleccionado por ser el descrito en la literatura científica como periodo de máxima sensibilidad a la acción ototóxica de los antibióticos aminoglucósidos (Pujol, 1986), periodo en el cual la administración de antibióticos aminoglucósidos en bajas dosis, que no afectarían a la cóclea madura de un individuo adulto, produce grandes daños en la cóclea en desarrollo (Eybalin, 1993).

Así, el tratamiento en este periodo de desarrollo produjo los efectos esperados. Las alteraciones de la onda N1 del PAC del nervio coclear resultaron significativas en ambos grupos de tratamiento, y consistieron en incrementos significativos de la latencia y una importante reducción de la amplitud del PAC del nervio coclear (Figs. 42 y 43). Estas alteraciones electrofisiológicas fueron producidas por el tratamiento ototóxico que indujo la eliminación de todo el epitelio sensorial del órgano de Corti, así como la degeneración de las fibras del ganglio espiral (Fig. 45). La degeneración ototóxica fue mayor en las espiras basales, efecto que ya hemos mencionado como típico de esta afectación, ya que la inmunoreactividad a la amikacina, otro antibiótico aminoglucósido, se localiza principalmente en las CCEs de la espira basal coclear (Hayashida, 1989). Por otro lado, los umbrales auditivos para el PMC también se vieron afectados por el tratamiento con KANA (Fig. 50 b) al igual que los del PAC del nervio coclear (Fig. 50 a). De nuevo se observa en los umbrales del PMC el aumento de umbral que tienen los animales del grupo control en las frecuencias graves de estudio, corroborando que estas frecuencias utilizadas son demasiado graves y que quedan fuera del espectro auditivo de la rata.

Resumiendo, los resultados obtenidos en las tres fases de este protocolo de ototoxicidad están de acuerdo con trabajos previos (Eybalin, 1993). La nueva técnica de registro de PMC demostró una gran especificidad en la exploración tonal de la cóclea, gracias a calidad de sus filtros de banda y su sistema de amplificación. El tono puro utilizado como estímulo permitió una exploración tonotópica fiable, necesaria, por otro lado, para el registro de PMC fiables. Este nuevo equipo de registro de PMC, diseñado como método de exploración para humanos, con estímulos de tonos entre 4000 y 250 Hz, para la exploración de la zona conversacional humana (Fig. 1), fue capaz de detectar una hipoacusia sensorial de la cóclea de la rata para las frecuencias de estimulación más graves, 500 y 250 Hz, lo que demuestra la capacidad del sistema para explorar el estado fisiológico del receptor auditivo en la búsqueda de hipoacusias sensoriales que puedan ser debidas a un malfuncionamiento o a una alteración de las CCEs en cualquier zona de la cóclea. Por otro lado, este método de registro ha sido probado en la exploración y el despistaje de sordera en recién nacidos (De los Santos y cols., 1998; 1999; Sanjuán, 1998) con resultados interesantes y prometedores como posible método de *screening* para la detección precoz de sorderas y como prueba audiológica, cuyos resultados combinados con los de otras pruebas (Fig. 13) pueden aportar datos importantes en el diagnóstico de las sorderas.

### **III. NEUROTOXICIDAD Y OTOTOXICIDAD**

La comparación entre ambas patologías es compleja y hay que tener en cuenta que la etiología no es común y, por lo tanto, debemos ser cautelosos a la hora de realizar esta comparación.

En cuanto a la etiología, en capítulos anteriores de esta memoria se han explicado los factores desencadenantes de ambas patologías, de manera que la neurotoxicidad afecta básicamente a las fibras aferentes de tipo I del ganglio *espiral* mientras que la ototoxicidad afecta, en sus primeras fases, a las células sensoriales del órgano de Corti. Por otro lado, es interesante la comparación de los efectos a largo plazo de ambas patologías presentados en esta memoria. Así, cuando ambos procesos se desencadenaron en los periodos más sensibles del desarrollo ontogénico del receptor auditivo, se observaron pérdidas significativas de las neuronas del ganglio espiral coclear. Por el contrario, la neurotoxicidad no afectó al órgano de Corti mientras que la ototoxicidad eliminó todo rastro del epitelio sensorial.

Es interesante el dato de la determinación de los periodos de máxima sensibilidad de las dos afectaciones. Ambos coinciden en el tiempo, aunque el periodo de sensibilidad neurotóxica se presenta unos días antes que el determinado para la ototoxicidad. El hecho de que cuando sucede una pérdida de células ciliadas, causado por un tratamiento con antibióticos aminoglucósidos, acaece una degeneración de las fibras aferentes del ganglio espiral, sugiere que las células ciliadas deben producir sustancias que sean reconocidas por las fibras aferentes para que puedan alcanzarlas. Estas sustancias, entre las que podría encontrarse el glutamato, haría que las neuronas aumentasen la expresión de los receptores para detectarlas y crecer hacia las células ciliadas e inervarlas. Esta sobreexpresión de receptores glutamatérgicos justificaría la existencia del periodo de sensibilidad neurotóxica definido en esta Tesis Doctoral.

El hecho común de la pérdida del número de neuronas del ganglio espiral es importante, ya no por la comparación entre ambas patologías, sino por la comparación de esta alteración con la presbiacusia, o sordera por envejecimiento del receptor auditivo, afección que en el ser humano tiene una prevalencia muy importante (Schuknecht, 1993). En esta denominación se incluyen un gran número de patologías degenerativas que se originan durante el envejecimiento natural o fisiológico del organismo, en los que intervienen una gran serie de factores aparte del determinante fundamental de la edad, como son el ambiente urbano ruidoso, antecedentes familiares de hipoacusia, la utilización subtóxica de medicamentos lesivos para el oído, las enfermedades vasculares que someten a hipoxia al oído interno, alteraciones metabólicas, etc.

En estudios *postmortem* de pacientes que habían sufrido de presbiacusia severa se demostraron pérdidas de células sensoriales y degeneración retrógrada de las fibras del ganglio espiral coclear (Johnsson y Hawkins, 1972; Nomura y Kawabata, 1979; Gleeson y Felix, 1987; Suzuka y Schuknecht, 1988; Johnsson y cols., 1990; Felix y cols., 1990). Estos mismos hechos se han descrito en animales de experimentación, de entre los cuales destacan los estudios con ratones de la cepa C57/BL/6, que presentan la característica de presentar un envejecimiento neurosensorial precoz, que les ha convertido en objeto de estudio de modelos de presbiacusia (Willott y cols., 1987; 1988; Henry y McGinn, 1992; Bartolomé y cols., 1999 b; Carricondo y cols., 1999 a).

Es por todo ello que las patologías neurotóxicas y ototóxicas, exploradas en esta Memoria de Tesis Doctoral, pueden tener relaciones interesantes y puntos comunes, en el diagnóstico y tratamiento, con la presbiacusia.

## ***CONCLUSIONES***

1. La administración intraperitoneal de glutamato monosódico produce lesiones en el receptor auditivo superponibles a las obtenidas con otros neurotóxicos. Electrofisiológicamente se aprecia un aumento de la latencia y una reducción de la amplitud de la onda N1 del potencial de acción compuesto del nervio auditivo. Morfológicamente se observa la formación de edemas dendríticos en las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral coclear. Por todo ello podemos concluir que la administración de agonistas glutamatérgicos, en particular el glutamato monosódico administrado intraperitonealmente, es un buen modelo para el estudio de las patologías neurotóxicas, ya que las alteraciones que produce son totalmente equiparables a las observadas en procesos patológicos de tipo hipóxico-isquémico o en otros tratamientos con neurotóxicos.

2. En el desarrollo ontogénico del receptor auditivo existe un período de máxima sensibilidad a los daños producidos por la neurotoxicidad inducida por la administración intraperitoneal de glutamato monosódico. En este periodo, que estaría comprendido entre el 6º y el 12º día de vida postnatal, el tratamiento con el agonista glutamatérgico produce grandes pérdidas de unidades neuronales en el ganglio espiral coclear, con los consiguientes efectos sobre la formación del potencial de acción compuesto del nervio auditivo.

3. La neurotoxicidad inducida por la administración de glutamato monosódico en distintas etapas del desarrollo puede ser antagonizada mediante el tratamiento con el antagonista de los canales volt-dependientes de  $Ca^{2+}$  diltiazem. Esto sugiere que dicho catión juega un papel fundamental en la fisiopatología de este proceso. No obstante, se han observado variaciones en la actividad de diltiazem a lo largo del desarrollo postnatal.

4. La neurotoxicidad inducida por ácido kaínico produjo alteraciones en el potencial de acción compuesto del nervio auditivo, mientras que no produjo efectos significativos en el potencial microfónico coclear, lo que corrobora que los potenciales microfónicos cocleares no se generan en el conjunto formado por las células ciliadas internas y las fibras aferentes de tipo I del ganglio espiral, y que el neurotransmisor implicado en las sinapsis entra las fibras aferentes de tipo II y las células ciliadas externas no es el glutamato.

5. Los procesos ototóxicos inducidos por el tratamiento con antibióticos aminoglucósidos afectan a las células sensoriales del órgano de Corti en una primera fase, e inducen una degeneración retrógrada de las fibras nerviosas del ganglio espiral coclear. Estos daños afectan significativamente al potencial de acción compuesto del nervio auditivo y al potencial microfónico coclear lo que demuestra que la génesis del potencial microfónico coclear se enclava en las células ciliadas externas del órgano de Corti.

6. El nuevo equipo de registro de potenciales microfónicos cocleares constituye una buena herramienta que, combinada con el resto de pruebas audiológicas ya establecidas, puede aportar valiosos datos sobre la fisiología coclear y colaborar en las pruebas de despistaje y de detección precoz de la sordera en la clínica otorrinolaringológica.

7. Las patologías neurotóxicas y ototóxicas producen efectos distintos pero también comunes entre ellas y comparándolas con las alteraciones encontradas en la presbiacusia, enfermedad degenerativa del receptor auditivo que presenta signos comunes a ambas. El conocimiento de estas patologías puede aportar datos interesantes para la comprensión de la evolución de la presbiacusia en el ser humano y en la búsqueda de posibles patrones de tratamiento o prevención.

## ***BIBLIOGRAFIA***

- Abou-Madi L, Pontarotti P, Tramu G, Cupo A y Eybalin M (1987). Coexistence of putative neuroactive substances in lateral olivocochlear neurons of rat and guinea pig. *Hear Res* 30: 135-146.
- Adams JC, Mroz EA, Sewell WF (1987). A possible neurotransmitter role for CGRP in a hair-cell sensory organ. *Brain Res* 419: 347-351.
- Allen AR y Starr A (1978). Auditory brain stem potentials in monkey (*M. mulata*) and man. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 45: 55-63.
- Altschuler RA, Sheridan CE, Horn JE y Wenthold RJ (1989). Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 42: 167-174.
- Altschuler RA, Kachar B, Rubio JA, Parakkal MA y Fex J (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Brain Res* 338: 1-11.
- Andrea M (1992). Anatomía de la caja timpánica y del sistema tímpano-oscicular. En: *Otorrinolaringología*. Abello P y Traserra J. Ed. Doyma. pp: 17-24.
- Aran JM (1981). Electrophysiology of cochlear toxicity. En: *Aminoglycoside Ototoxicity*. Lerner SA, Matz GJ y Hawkins JE Eds. Boston: Little Brown, pp: 31-50.
- Ard MD y Morest DK (1984). Cell death during development of the cochlear and vestibular ganglia of the chick. *Int J Dev Neurosci* 2: 535-547.
- Aschoff A y Ostwald J (1987). Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats and guinea pigs. *J Comp Neurol* 264: 56-72.
- Ashmore JF y Ohmori H (1990). Control of intracellular calcium by ATP in isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *J Physiol Lond* 428: 109-131.
- Avellaneda R (1992). Bloque mastoideo. Neumatización del temporal. En: *Otorrinolaringología*. Abello P y Traserra J. Ed. Doyma. pp: 24-28.

- Baird IL (1974). Some aspects of the comparative anatomy and evolution of the inner ear in submammalian vertebrates. *Brain Behav Evol* 10: 11-36.
- Baird IL (1976). Anatomical features of the inner ear in submammalian vertebrates. *En: Handbook of Sensory Physiology of the Auditory System. Kendel D & Neff WD. Anatomy & Physiology of the Ear, vol 1. Ed. Springer Verlaag. pp: 159-212.*
- Bartolami S, Guimarand J, Lenoir M, Pujol R y Recasens M (1990). Inhibition of inositol phosphates formation by ototoxic drugs in the rat cochlea. *Hear Res* 47: 229-234.
- Bartolomé MV, Vago P, Gil-Loyzaga P, Humbert G, Joubert-Caron R, Pujol R y Lenoir M (1999 a). Sequential changes in anti-GAL-1 staining of the rat organ of Corti following amikacin exposure. *Brain Res* 822: 43-51.
- Bartolomé MV, Ibáñez MA, Vicente-Torres MA, Carricondo F y Gil-Loyzaga P (1999 b). Expression of galectine-1 shows a similar pattern of distribution in cochlear aminoglycoside neurotoxicity or presbycusis. *International Meeting on Neurotoxicology, Degeneration and Protection in Brain Disease States. Mojácar (Almería). p: 60.*
- Berrill NJ (1955). The origin of vertebrates. *Ed: Oxford University Press, London.*
- Billet TE, Thorne P y Gavin JB (1989). The nature and progression of injury in the organ of Corti during ischemia. *Hear Res* 41: 189-198.
- Bledsoe SC Jr y Bobbin RP (1982). Effects of D-a-aminoacidipate on excitation of afferent fibers in the lateral line of *Xenopus laevis*. *Neurosci lett* 32: 315-320.
- Bledsoe SC Jr, Bobbin RP y Puel JL (1988). Neurotransmission in the inner ear. *En: Physiology of the ear. Ed Raven Press (New York). pp: 385-406.*
- Bobbin RP, Ceasar G y Fallon M (1990). Potassium induced release of GABA and other substances from the guinea pig cochlea. *Hear Res* 46: 83-94.

- Bode-Greuel KM y Siger W (1989). The development of N-methyl-D-aspartate receptors in cat visual cortex. *Dev Brain Res* 46: 197-204.
- Bosher SK y Warren RL (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 MC, Berlung AM, Kiang NYS y Ryugo DK (1988). The central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *J Comp Neurol* 278: 581-590.
- Brownell WE (1983). Observations on a motile response in isolated outer hair cells. *En: Mechanisms of Hearing*. pp: 5-10.
- Brownell WE (1984). Microscopic observation of cochlear hair cell motility. *Scann Electron Microsc* 3: 1401-1406.
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D y De Ribaupierre Y (1985). Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227: 194-196.
- Canlon B, Cartaud J y Changeux JP (1989). Localization of  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites on outer hair cells from the guinea pig cochlea. *Acta Physiol Scand* 137: 549-550.
- Carlier E y Pujol R (1978). Early effects of efferent stimulation on the kitten cochlea. *Neurosci Lett* 3: 21-27.
- Carlier E, Abonnenc M y Pujol R (1975). Maturation des responses unitaires a la stimulation tonel dans le ferf cochleaire du chaton. *J Physiol (Paris)* 70: 129-138.
- Carlier E, Lenoir M y Pujol R (1979). Development of cochlear frequency selectivity tested by compound action potential tuning curves. *Hear Res* 1: 197-201.

- Carrasco VN, Prazma J, Faber JE, Triana RJ y Pillsbury HC (1990). Cochlear microcirculation. Effect of adrenergic agonists on arteriole diameter. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116: 411-417.
- Carricondo F (1995). Neurotoxicidad inducida por glutamato monosódico en la cóclea de la rata. Efectos protectores de diltiazem. *Tesina de Licenciatura. Facultad de CC Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.*
- Carricondo F, Gil-Loyzaga P, Sanjuán-Juaristi J y Poch-Broto J (2000). Cochlear microphonics potentials: A new recording technique. *Ann Otol Rhinol Laryngol (aceptado).*
- Carricondo F, Bartolomé MV, Ibáñez MA, Vicente-Torres MA y Gil-Loyzaga P (1999 a). Cochlear neurotoxicity induced by glutamate agonist and presbycusis: two different pathologies with some similar damages. *International Meeting on Neurotoxicology, Degeneration and Protection in Brain Disease States. Mojácar (Almería). p: 61.*
- Carricondo F, San Román J, del Castillo E, Sanjuán-Juaristi J, Poch-Broto J y Gil-Loyzaga P (1999 b). Potenciales microfónicos cocleares. Nuevos datos experimentales. *Congreso extraordinario del 50º aniversario de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial. Madrid. p: 140.*
- Charachon G y Eybalin M (1990). Putative dopaminergic efferents (olivocochlear) innervation of the cochlea: immunoelectron microscopy and effects of 6-OHDA. *13th Ann Meet Eur Neurosci Assoc. Estocolmo, Suecia.*
- Charachon G, Eybalin M y Pujol R (1991). Dopamine, another lateral efferent neurotransmitter? (Abstract). *Proc Annu Meet Assoc Res Otolaryngol* 14th. p: 115.

- Choi DW (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 58: 293-297.
- Choi DW (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7: 369-379.
- Ciges M (1992 a). Bosquejo histórico de los potenciales evocados auditivos. *En: Potenciales Evocados Somatosensoriales, Visuales y Auditivos*. Ciges M, Artieda J, Sainz M, Stingl de Méndez M. Ciges M Ed. pp: 313-319.
- Ciges M (1992 b). Potenciales evocados auditivos. Correlaciones morfofuncionales. *En: Potenciales Evocados Somatosensoriales, Visuales y Auditivos*. Ciges M, Artieda J, Sainz M, Stingl de Méndez M. Ciges M Ed. pp: 321-338.
- Clarck GD y Rothman SM (1987). Blockade of excitatory amino acid receptors protects anoxic hippocampal slices. *Neurosci* 21: 665-671.
- Collingridge GI, Herron CE y Lester RAJ (1988). Frequency-dependent N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *J Physiol Lond* 399: 301-312.
- Coro F y Pérez J (1987). Estructura del órgano timpánico de *Empyreuma pugione* (Lepidoptera: Arctiidae). *Ciencias Biológicas* 17: 31-41.
- Corti A (1851). Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères. *Z Wis Zool* 109-169.
- Corwin JT y Warchol ME (1991). Auditory hair cells: Structure, function, development and regeneration. *Annu Rev Neurosci* 14: 301-333.
- Counter SA y Tsao P (1986). Morphology of the seagull's inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 101: 34-42.
- Cousillas H y Rebillard G (1988). Morphological transformation of hair cells in the chick basilar papilla following an acoustic overstimulation. *Hear Res* 32: 117-122.
- Coyle JT (1983). Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 41: 1-11.

- Crowley DE y Hepp-Reymond MC (1966). Development of cochlear function in the ear of the infant rat. *J Comp Physiol Psychol* 62: 427-432.
- Dannhof BJ y Bruns V (1993). The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear Res* 66: 8-22.
- Davis H (1958). A mechano-electrical theory of cochlear action. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 67: 789-801.
- Davis H (1983). An active process in cochlear mechanics. *Hear Res* 9: 79-90.
- De los Santos G, Sanjuán J y Gavilán L (1998). New method for recording cochlear microphonic potentials in human beings. *Acta Otorrinolaringol Esp* 49: 341-345.
- De los Santos G, Sanjuán J y Gavilán L (1999). Cochlear microphonic potentials with surface electrodes in the diagnosis of neurosensorial hearing defects. *Acta Otorrinolaringol Esp* 50: 359-365.
- Delgado C, Valenzuela C, Delpón E y Tamargo J (1990). Antagonistas del Calcio: mecanismo de acción y clasificación. *En: Antagonistas del calcio. Medicine. Tratado de Medicina Interna. Ed. Internacional de Ediciones y Publicaciones. Madrid. nº extraordinario, pp: 9-15.*
- Diamond IT, Jones EG y Powell TPS (1969). The projection of the auditory cortex upon the diencephalon and brain stem in the cat. *Brain Res* 15: 305-340.
- Dijkgraaf S (1963). The functioning and significance of the lateral line organs. *Biol Rev* 38: 51-105.
- Domènech JM y Vilas J (1992). Filogenia y embriología del oído. *En: Otorrinolaringología. Abello P y Traserra J. Ed. Doyma. pp: 3-9.*
- Drescher MJ, Drescher DG y Medina JE (1983). Effects of sound stimulation at several levels on concentrations of primary amines, including neurotransmitter candidates in perilymph of the guinea pig inner ear. *J Neurochem* 41: 309-320.

- Dumas G y Charanchon R (1982). Ototoxicity of kanamycin in developing guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 49: 93-98.
- Durrant JD y Lovrinic JH (1995). Bases of hearing science. *Williams and Wilkins Eds. (Baltimore)*. 3<sup>rd</sup> edition. pp: 138-255.
- Ehrenberger K y Felix D (1991). Glutamate receptors in the afferent cochlear neurotransmission in guinea pigs. *Hear Res* 52: 73-80.
- Eybalin M (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73/2: 309-373.
- Eybalin M y Pujol R (1983). A radioautographic study of [<sup>3</sup>H]L-glutamate and [<sup>3</sup>H]L-glutamine uptake in the guinea pig cochlea. *Neurosci* 9: 863-871.
- Eybalin M y Pujol R (1984). Immunofluorescence with Met-enkephalin and Leu-enkephalin antibodies in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 13: 135-140.
- Eybalin M y Pujol R (1985). Immunolocalization de la choline acetyl-transferase dans deux types de synapses efferentes de l'organe de Corti. *C R Acad Sci (III)* 301: 679-684.
- Eybalin M y Pujol R (1987). Choline acetyltransferase (ChAT) immunoelectron microscopy distinguishes at least three types of efferent synapses in the organ of Corti. *Exp Brain Res* 65: 261-270.
- Eybalin M y Pujol R (1989). Cochlear neuroactive substances. *Arch Otorhinolaryngol* 246: 228-234.
- Eybalin M, Calas A y Pujol R (1983). Radioautographic study of the sympathetic fibers in the cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 96: 69-74.
- Eybalin M, Cupo A y Pujol R (1984). Met-enkephalin characterization in the cochlea: high performance liquid chromatography and immunoelectron microscopy. *Brain Res* 305: 313-322.
- Eybalin M, Parnaud C, Geffard M y Pujol R (1988). Immunoelectron microscopy identifies several types of GABA containing efferent synapses in the guinea pig organ of Corti. *Neurosci* 24: 29-38.

- Faden AI, Demediuk P, Panter SS y Vink R (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science (Wash DC)* 244: 798-800.
- Felix D y Ehrenberger K (1990). A microiontophoretic study of the role of excitatory amino acids at the afferent synapses of mammalian inner hair cells. *Eur Arch Oto-rhino-laryngol* 248: 1-3.
- Felix D, Ambühl P y Ehrenberger K (1991). The efferent modulation of inner hair cell afferents (Abstract). *Proc Workshop on Inner Ear Biology 28th.* p: 42.
- Felix H, Johnsson LG y Gleeson M (1990). *Acta Otolaryngol (Stockh)* 470: 71-79.
- Feng AS, Narins PM y Capranica RR (1975). Three populations of primary auditory fibers in the bullfrog (*Rana catesbeiana*): their peripheral origins and frequency sensitivities. *J Comp Physiol* 100: 221-229.
- Fernández C e Hinojosa R (1974). Postnatal development of endocochlear potential and stria vascularis in the cat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 78: 173-186.
- Fex J y Altschuler RA (1981). Enkephalin-like immunoreactivity of olivocochlear nerve fibers in the cochlea of guinea pig and cat. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1255-1259.
- Fex J, Altschuler RA, Kachar B, Wenthold RJ y Zempel JM (1986). GABA visualized by immunocytochemistry in guinea pig cochlea in axons and endings of efferent neurons. *Brain Res* 366: 106-117.
- Fischer FP, Köppl C y Manley GA (1988). The basilar papilla of the barn owl *Tyto alba*: A quantitative morphological SEM analysis. *Hear Res* 34: 87-102.
- Flock A, Flock B y Murray E (1977). Studies on the sensory hairs of the receptor cells in the inner ear. *Acta Otolaryngol* 83: 85-91.

- 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.
- Fox AP, Nowycky MC y Tsien RW (1987). Kinetics and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *J Physiol (Lond)* 394: 149-172.
- Fritsch B, Silos-Santiago I, Bianchi LM y Farinas I (1997). The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends Neurosci* 20: 159-164.
- Furness DN y Hackney CM (1986). High-resolution scanning-electron microscopy of stereocilia using the osmium-thiocarbohydrazide coating technique. *Hear Res* 21: 243-249.
- Garthwaite G, Hajos F y Garthwaite J (1986). Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neurosci* 18: 437-447.
- Garthwaite G, Yamini B y Garthwaite J (1987). Selective loss of Purkinje and granule cell responsiveness to N-methyl-D-aspartate in rat cerebellum during development. *Dev Brain Res* 36: 288-292.
- Gavilán C y Sanjuán J (1961). Variations in guinea pig cochlear potentials caused by experimental alterations in the middle ear. *Acta Otorrinolaringol Iberoam* 1: 19-25.
- Gavilán C y Sanjuán J (1964). Microphonic potential picked up from the human tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 73: 101-109.
- Gibson WPR (1978). Electrocochleography. Essentials of clinics response audiometry. Ed. Churchill Livingstone Edimburg. pp: 59-106.
- Gil-Carcedo LM (1995). Otología. Ed. Menarini Area Científica.
- Gil-Loyzaga P (1995). Neurotransmitters of the olivo-cochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 115: 222-226.

- Gil-Loyzaga P (1997 a). Histochemistry of glycoconjugates of the auditory receptor. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. Ed. Gustav Fisher Verlag, vol 32/1. pp: 1-78.
- Gil-Loyzaga P (1997 b). Inervación del receptor auditivo y los núcleos cocleares. *Anales de la Real Academia de Medicina* 114: 1063-1087.
- Gil-Loyzaga P y Brownell W (1988). Wheat germ agglutinin and *Helix pomatia* agglutinin lectin binding on cochlear hair cells. *Hear Res* 34: 149-156.
- Gil-Loyzaga P y Parés-Herbuté N (1986). Presence of noradrenaline and dopamine in the adult and developing rat cochlea. *Neurosci Lett Suppl* 26: S134.
- Gil-Loyzaga P y Parés-Herbuté 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 Poch-Broto J (2000 a). El oído interno: El laberinto óseo. Anatomía e histología de la cóclea. En: *Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. (en prensa).
- Gil-Loyzaga P y Poch-Broto J (2000 b). Fisiología del sistema auditivo periférico. En: *Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*. (en prensa).
- Gil-Loyzaga P y Pujol R (1990 a). Neurotoxicity of kainic acid in the rat cochlea during early developmental stages. *Eur Arch Oto-rhino-laryngol* 248: 40-48.
- Gil-Loyzaga P y Pujol R (1990 b). Kainic acid toxicity on cochlear type I neurons. *Proceedings of the 14th World Congress of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery, Madrid 1989*. pp: 37-39.
- Gil-Loyzaga P y Pujol R (1992). Fisiología de la audición. En: *Fisiología Humana*. J.A.F. Tresguerres. Ed. Interamericana McGraw-Hill. pp: 294-314.

- Gil-Loyzaga P y Pujol R (1999). Fisiología del receptor y de la vía auditiva. *En: Fisiología Humana. J.A.F. Tresguerres. 2ª Edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill. pp: 231-244.*
- Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV y Vicente-Torres MA (1997 a). Serotonergic innervation of the cat cochlea. *NeuroReport 8: 3519-3522.*
- Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV y Vicente-Torres MA (1997 b). Immunocytochemical distribution of serotonergic fibers within the cochlea of the cat. *34th Workshop on Inner Ear Biology, Bari, Italia, O-44.*
- Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV y Vicente-Torres MA (1999 c). Serotonergic innervation of the organ of Corti. *Collegium Oto-rhino-laryngologicum Amicitiae Sacrum, Lyon, Francia.*
- Gil-Loyzaga P, Cupo A y Eybalin M (1988). Met-enkephalin and Met-enkephalin-Arg<sub>6</sub>-Gly<sub>7</sub>-Leu<sub>8</sub> immunofluorescence in the developing guinea pig organ of Corti. *Devl Brain Res 42: 142-145.*
- Gil-Loyzaga P, Gabrion J y Uziel A (1985 a). Lectins demonstrate the presence of carbohydrates in the tectorial membrane of the mammalian cochlea. *Hear Res 20: 1-8.*
- Gil-Loyzaga P, Merchán-Pérez A y Remezal M (1994 a). Selective <sup>3</sup>H-GABA uptake by olivocochlear efferent fibers of the developing rat cochlea. *Proc Workshop on Inner Ear Biology 31st, Montpellier, Francia.*
- Gil-Loyzaga P, Raymond J y Gabrion J (1985 b). Carbohydrates detected by lectins in the vestibular organ. *Hear Res 18: 269-272.*
- Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV, Vicente-Torres MA y Carricondo F (2000). Serotonergic innervation of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol (Stockh) 119 (en prensa).*

- Gil-Loyzaga P, Hernández-Ortiz MJ, Rodríguez-Benito T y Lasso de la Vega M (1993 b). Diltiazem protects against neurotoxicity induced by neurotoxic aminoacids on cochlear afferent fibers. A morphological study. *ORL* 55: 211-215.
- Gil-Loyzaga P, Menoyo A, Poch-Broto J y Merchán-Pérez A (1990). Effects of perinatal hypothyroidism in the carbohydrate composition of cochlear tectorial membrane. *Hear Res* 45: 151-156.
- Gil-Loyzaga P, Gabrion J, Remezal M, Nguyen-Thao-Dao B y Uziel A (1991). Incorporation of D-<sup>3</sup>H-glucosamine and L-<sup>3</sup>H-fucose into the developing rat cochlea. *Hear Res* 57: 38-44.
- Gil-Loyzaga P, Hernández E, Carricondo F, Simón F y Poch-Broto J (1999 b). Trimetazidine prevents cochlear lesions induced by intraperitoneal and perilymphatic administration of kainic acid. *Brain Res* 826: 95-103.
- Gil-Loyzaga P, Pujol R, Mollicone R, Dalix AM y Oriol R (1989). Appearance of B and H blood group antigens in the developing cochlear hair cells. *Cell Tissue Res* 257: 17-21.
- Gil-Loyzaga P, San Román J, Carricondo F, Vicente-Torres MA y Bartolomé MV (1998 b). Effects of dopamine agonists on the compound action potential of the auditory nerve. *Proc 36th Workshop on Inner Ear Biology, Innsbruck, Austria*.
- Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres A, Arce A, Cardinali DP y Esquifino A (1998 a). Effect of superior gangliectomy on catecholamine concentration in rat cochlea. *Brain Res* 779: 53-57.
- Gil-Loyzaga P, Vicente-Torres MA, Fernández-Mateos P, Arce A y Esquifino A (1994 b). Piribedil affects dopamine turnover in cochleas stimulated by white noise. *Hear Res* 79: 178-182.

- Gil-Loyzaga P, Fernández-Mateos P, Vicente-Torres MA, Remezal M, Cousillas H, Arce A y Esquifino A (1993 a). Effects of noise stimulation on cochlear dopamine metabolism. *Brain Res* 623: 177-180.
- Gil-Loyzaga P, Poch-Broto J, Vicente-Torres A, Bartolomé V, Carricondo F, San Román J y Jiménez L (1999 a). GABA, dopamine and serotonin in cochlear innervation: Models of protection against neurotoxicity. *En: Cochlear pharmacology and noise trauma. Prasher D y Canlon B Eds. NRN Publications. pp: 23-40.*
- Gill R, Foster AC y Woodruff GN (1987). Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J Neurosci* 7: 3343-3349.
- Ginzberg RD y Morest DK (1984). Fine structure of cochlear innervation in the cat. *Hear Res* 14: 109-127.
- Gleeson M y Felix H (1987). *Acta Otolaryngol (Stockh)* 436: 103-109.
- Godfrey DA y Ross CD (1985). Enzymes of acetylcholine metabolism in the rat cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 94: 409-414.
- Godfrey DA, Carter JA, Berger SJ y Matschinsky A (1976). Levels of putative transmitters amino acids in the guinea pigs cochlea. *J Histochem Cytochem* 24: 468-470.
- Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC y Choi DW (1987). N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 784-791.
- Guimarand J, Mayat E, Bartolami S, Lenoir, Rumigny JF, Pujol R y Recasens M (1990). A M<sub>3</sub> muscarinic receptor coupled to inositol phosphate formation in the rat cochlea?. *Biochem Pharmacol* 39: 1913-1919.
- Guinan JJ, Warr WB Jr y Norris BE (1984). Topographic organization of the olivocochlear projections from the lateral and medial zones of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 226: 21-27.

- Harrison JM y Howe ME (1974). Anatomy of the descending auditory systems (Mammalian). *En: Handbook of sensory physiology. Keidel WD y Neff WD Eds. Springer-Verlag Berlin. Vol. V/I. pp: 363-388.*
- Hawkins JE y Johnsson LG (1981). Histopatology of cochlear and vestibular ototoxicity in laboratory animals. *En: Aminoglycoside Ototoxicity. Lerner SA, Matz GJ y Hawkins JE Eds. Boston: Little Brown, pp: 175-196.*
- Hayashida T (1989). An immunohistochemical method for the study of aminoglycoside ototoxicity in the guinea pig cochlea using decalcified frozen sections. *Arch Oto-rhino-laryngol 246: 161-164.*
- Henley CM y Rybak LP (1995). Ototoxicity in developing mammals. *Brain Res Rev 20: 68-90.*
- Henry KR y McGinn MD (1992). *Audiology 31: 181-189.*
- Hernández E (1993). Efecto protector de los antagonistas del calcio frente a las lesiones cocleares inducidas por ácido kaínico. *Tesina de Licenciatura. Facultad de CC Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.*
- Herron CE, Lester RAJ, Coan EJ y Collingridge GL (1986). Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: a novel synaptic mechanism. *Nature Lond 322: 265-268.*
- Hess P, Lasman J y Tsien R (1984). Different models of  $Ca^{2+}$  channels gating behaviour favoured by dihydropyridine  $Ca^{2+}$  agonists and antagonists. *Nature 311: 538-544.*
- Hoffman DW (1986). Opioid mechanisms in the inner ear. *En: Neurobiology of Hearing: The cochlea. Raven Press (New York). pp: 371-382.*
- Hoffman DW y Jones KL (1988). Cochlear perfusion *in situ* to study neurochemical mechanisms at a multitransmitter synapse (Abstract). *Proc Annu Meet Assoc Res Otolaryngol 11th, pp: 37-38.*

- Hoffman DW, Edkins RD y Jones-King KL (1989). Release of enkephalins and dynorphins at the olivocochlear synapses in the cochlea (Abstract). *Proc Annu Meet Assoc Res Otolaryngol 12th*, p: 344.
- Hoffman DW, Jones-King KL y Altschuler (1988). Putative neurotransmitters in the rat cochlea at several ages. *Brain Res 460*: 366-368.
- Hoffman DW, Zamir N, Rubio J, Altschuler RA y Fex J (1985). Proenkephalin and prodynorphin-related neuropeptides in the cochlea. *Hear Res 17*: 47-50.
- Howe HA (1935). The relation of the organ of Corti to audioelectric phenomena in deaf albino cats. *Am J Physiol 111*: 187-191.
- Hudspeth AJ (1986). The ionic channels of a vertebrate hair cell. *Hear Res 22*: 21-27.
- Hudspeth AJ y Lewis RS (1988). A model for electrical resonance and frequency tuning in saccular hair cells of the bull frog, *Rana catesbeiana*. *J Physiol 400*: 275-297.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz MW, Fothergill LA, Morgan BA y Morris HR (1975). Identification of two related pentapéptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature Lond 258*: 577-579.
- Janis AR y Scriabine A (1983). Sites of action of Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors. *Biochem Pharmacol 32*: 3499-3507.
- Janssen R (1992). Glutamate neurotoxicity in the developing rat cochlea is antagonized by kynurenic acid and MK-801. *Brain Res 590*: 201-206.
- Janssen R, Schweitzer L y Jensen KF (1991). Glutamate neurotoxicity in the developing rat cochlea: physiological and morphological approaches. *Brain Res 552*: 255-264.
- Jenison GL, Winbery S y Bobbin RP (1986). Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-aspartate, excitatory amino acids agonists, on guinea pig cochlear potentials. *Comp Biochem Physiol 84*: 385-389.

- Jensen KT (1988). Glutamate excitotoxicity in rat inner ear. *11th Assoc Res Otolaryngol Midwinter Meet, Florida, USA.*
- Jiménez-Ferreres L (1996). Efecto protector de dos benzodiazepinas, clonazepam y flunitracepam, frente a la hipoacusia neurosensorial inducida experimentalmente por ácido kaínico en la rata. *Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.*
- Jiménez-Ferreres L, Poch-Broto J y Gil-Loyzaga P (1999). Efecto Protector de las benzodiazepinas en la hipoacusia neurosensorial experimental. *Congreso extraordinario del 50º aniversario de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial. Madrid. p: 269.*
- Johnson JW y Ascher P (1987). Glicine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature 325: 529-531.*
- Johnsson LG y Hawkins JE (1972). *Ann Otolaryngol 81: 179-193.*
- Johnsson LG, Felix H, Gleeson M y Pollack A (1990). *Acta Otolaryngol (Stockh) 470: 88-96.*
- Jones DG 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.*
- Jones DR, Casseday JH y Diamond IT (1976). Further study of parallel auditory pathways in the tree shrew *Tupaia glis*. *Anat Rec 184: 704-705.*
- Jones N, Fex J y Altschuler RA (1987). Tyrosine hydroxylase immunoreactivity identifies possible catecholaminergic fibers in the organ of Corti. *Hear Res 30: 33-38.*
- Juiz JM, Rueda J, Merchán JA y Sala MA (1989). The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear Res 40: 65-74.*
- Kanner BI (1983). Bioenergetics of neurotransmitters transport. *Acta Biochem Biophys 726: 293-316.*

- Kemp JT (1978). Stimulated acoustic emissions from the human auditory system. *J Acoustic Soc Am* 64: 1386-1391.
- Khalkhali-Ellis Z, Hemming FW y Steel KP (1987). Glycoconjugates of the tectorial membrane. *Hear Res* 25: 185-191.
- Kiang NYS, Watanabe T, Thomas EC y Clarck LF (1965). Discharge patterns of single fibers in the cat's auditory nerve. *En: MIT Research Monograph* 35. Cambridge. MIT Press. pp: 1-165.
- Kitajiri M, Yamashita T, Tohyama Y, Kumazawa T, Takeda N, Kawasaki Y, Matsunaga T, Girgis S, Hillyard CJ, Mac Intyre, Emson P, Shiosaka S y Tohyama M (1985). Localization of calcitonin gene-related peptide in the organ of Corti of the rat: An immunohistochemical study. *Brain Res* 358: 394-397.
- Kusakary J, Arakawa E, Rokugo M, Ohyama K y Inamura N (1984). Effect of kainic acid upon N1 latency. *Laryngoscope* 94: 1365-1369.
- Lefebvre PP, Weber T, Leprince P, Rigo JM, Delree 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 y Puel JL (1987). Dose-dependent changes in the rat cochlea following aminoglycoside intoxication. II. Histological study. *Hear Res* 26: 199-209.
- Lenoir M, Puel JL y Pujol R (1987). Stereocilia and tectorial membrane development in the rat cochlea: A SEM study. *Anat Embriol* 175: 477-487.
- Lenoir M, Shnerson A y Pujol R (1980 a). Cochlear receptor development in the rat with emphasis on synaptogenesis. *Anat Embryol* 160: 253-262.
- Lenoir M, Shnerson A y Pujol R (1980 b). Cochlear receptor development in the rat. *Hear Res* 29: 265-271.

- Lewis ER (1981). Evolution of inner ear auditory apparatus in the frog. *Brain Res* 219: 149-155.
- Liberman MC (1978). Auditory-nerve responses from cats raised in low noise chamber. *J Acoust Soc Am* 63: 442-445.
- Liberman MC (1980). Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3: 45-63.
- Liberman MC (1982 a). The cochlear frequency map for the cat: labelling auditory-nerve fibers of known characteristic frequency. *J Acoust Soc Am* 72: 1441-1449.
- Liberman MC (1982 b). Single-neuron labelling in the cat auditory nerve. *Science Wash DC* 216: 1239-1241.
- Liberman MC y Oliver ME (1984). Morphometry of intracellularly labeled neurons of auditory nerve: Correlation with functional properties. *J Comp Neurol* 223: 163-176.
- Liberman MC, Dodds LW y Pierce S (1990). Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301: 443-460.
- Lim DJ (1986). Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear Res* 22: 117-146.
- Lippe W y Rubel EW (1983). Development of the place principle: Tonotopic organization. *Science* 219: 514-516.
- Liberman MC (1978). Auditory-nerve responses from cats raised in low noise chamber. *J Acoust Soc Am* 63: 442-445.
- Liberman MC (1980 a). Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea. An electron microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3: 45-63.

- Liberman MC (1980 b). Efferent sinapses in the inner hair cell area of the cat cochlea: An electron microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3: 189-204.
- Liberman MC (1982 a). Single-neuron labelling in the cat auditory nerve. *Science* 216: 1239-1241.
- Liberman MC (1982 b). The cochlear frequency map for the cat: labelling auditory-nerve fibers of known characteristic frequency. *J Acoust Soc Am* 72: 1441-1449.
- Liberman MC y Oliver ME (1984). Morphometry of intracellularly labeled neurons of the auditory nerve: correlations with functional properties. *J Comp Neurol* 223: 163-176.
- Liberman MC, Dodds LW y Pierce S (1990). Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301: 443-460.
- Llave Correas, C (1999). Análisis molecular de los mecanismos de transmisión de potyvirus por pulgones. *Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.*
- López Moya JJ (1992). *Potenciales evocados auditivos. Introducción a su conocimiento y valoración clínica. Ed. Ciencia 3, S.A.*
- Lorente de No R (1933 a). Anatomy of the eighth nerve. The central projection of the nerve endings of the internal ear. *Laryngoscope* 43: 1-38.
- Lorente de No R (1933 b). Anatomy of the eighth nerve. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope* 43: 327-350.
- Lorente de No R (1981). The primary acoustic nuclei. *Ed. Raven Press (New York), pp: 165-188.*
- Lowenstein O y Roberts TDM (1951). The localization and analysis of the responses to vibration from the isolated elasmobranch labyrinth. *J Physiol (Lond.)* 114: 471-489.

- Lowenstein O, Osborne MP y Thornhill RA (1968). The anatomy and ultrastructure of the labyrinth of the lamprey (*Lampetra fluviatilis*, L.). *Proc Roy Soc B* 170: 113-134.
- Manley GA, Brix J y Kaiser A (1987). Developmental stability of the tonotopic organization of the chick's basilar papilla. *Science* 237: 655-656.
- Maragos WF, Greenamyre JT, Penney JB y Young AB (1987). Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: a hypothesis. *Trends Neurosci* 10: 65-68.
- Matías-Guiu J (1990). Antagonistas del calcio en neurobiología: isquemia cerebral. *En: Antagonistas del calcio. Medicine. Tratado de Medicina Interna. Ed. Internacional de Ediciones y Publicaciones. Madrid. nº extraordinario, pp: 26-33.*
- Matsunaga T, Doi K, Takeda N, Mori N y Tohyama M (1986). Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on compound action potential of the auditory nerve of guinea pigs (Abstract). *Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum. Hakone. Japan. p: 30.*
- Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW y Jahn R (1988). Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. *J Biol Chem* 263: 15423-15428.
- Mayer ML y Westbrook GL (1987). Cellular mechanisms underlying excitotoxicity. *Trends Neurosci* 10: 59-61.
- Mayer ML, Westbrook GL y Guthrie PB (1984). Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spiral cord neurones. *Nature* 309: 261-263.
- Meldrum B (1985). Excitatory amino acids and anoxic/ischaemic brain damage. *Trends Neurosci* 8: 47-48.
- Meldrum B y Garthwaite J (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TIPS* 11: 379-387.

- Merchán-Pérez A (1992). Identificación de neurotransmisores durante el desarrollo del receptor acústico. *Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.*
- Merchán-Pérez A, Gil-Loyzaga P y Eybalin M (1990 a). Immunocytochemical detection of calcitonin gene-related peptide in the postnatal developing rat cochlea. *Int J Dev Neurosci 8/5: 603-612.*
- Merchán-Pérez A, Gil-Loyzaga P y Eybalin M (1990 b). Immunocytochemical detection of glutamate decarboxilase in the postnatal developing rat organ of Corti. *Int J Dev Neurosci 8/5: 613-620.*
- Merchán-Pérez A, Gil-Loyzaga P y Eybalin M (1990 c). Ontogeny of glutamate decarboxilase and g-aminobutyric acid immunoreactivities in the rat cochlea. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol 248/1: 4-7.*
- Merchán-Pérez A, Gil-Loyzaga P, Eybalin M, Fernández-Mateos P y Bartolomé MV (1994). Choline-acetyltransferase-like immunoreactivity in the organ of Corti of the rat during postnatal development. *Dev Brain Res 82: 29-34.*
- Merchán-Pérez A, Gil-Loyzaga P, Eybalin M, López-Sánchez J y Valderrama F (1993). Ontogeny of GABA immunoreactive nerve fibers in the rat cochlea. *Dev Brain Res 76: 33-41.*
- McDonald JW, Johnston MV y Young AB (1989). Ontogeny of the receptors comprising the NMDA receptor complex. *Soc Neurosci Abstr 15: 198.*
- McDonald JW, Silverstein FS y Johnston MV (1988). Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res 459: 200-203.*
- Monaghan DT, Bridges RJ y Cotman CW (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.*

- Moriyoshi K, Ishii T, Shigemoto R, Mizunu N y Nakanishi S (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-57.
- Murphy TH, Malouf AT, Sastre A, Schnaar RL y Coyle JT (1988). Calcium-dependent glutamate cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res* 444: 325-332.
- Nadol JB y Burgess B (1985). A study of postmortem autolysis in the human organ of Corti. *J Comp Neurol* 237: 333-342.
- Nicholls DG (1993). The glutamatergic nerve terminal. *Eur J Biochem* 212: 613-631.
- Nomura Y y Kawabata I (1979). *Arch Otorhinolaryngol* 222: 181-185.
- Nowak LP, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A y Prochiantz A (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.
- Nuttall AL, Marques DM y Lawrence M (1977). Effects of perilymphatic perfusion with neomycin on the cochlear microphonic potential in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 83: 393-400.
- Okamoto A, Tamura T, Yokoyama K, Kobayashi N y Hasegawa M (1990). Effect of loud sound exposure on the cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 109: 378-382.
- Oliver DL y Hall WC (1978 a). The medial geniculate body of the tree shrew *Tupaia glis*.I. Cytoarchitecture and midbrain connections. *J Comp Neurol* 182: 423-458.
- Oliver DL y Hall WC (1978 b). The medial geniculate body of the tree shrew *Tupaia glis*.II. Connections with the neocortex. *J Comp Neurol* 182: 459-494.
- Olney JW (1969). Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.

- Olney JW (1983). Excitotoxin: an overview. *En: Excitotoxins. Fuxe K, Roberts P y Schwartz R (Eds.). MacMillan (London). pp: 82-96.*
- Olney JW, Price MT, Samson L y Labruyere J (1986). The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett 65: 65-71.*
- Olney JW, Ikonomidou C, Mosinger JL y Fierdich G (1989). MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain. *J Neurosci 9: 1701-1704.*
- Palomar V (1992 a). Anatomía de la trompa de Eustaquio. *En: Otorrinolaringología. Abello P y Traserra J. Ed. Doyma. pp: 29-31.*
- Palomar V (1992 b). Fisiología del oído externo y del oído medio. *En: Otorrinolaringología. Abello P y Traserra J. Ed. Doyma. pp: 49-52.*
- Pérez M y Coro F (1984). Physiological characteristics of the tympanic organ in noctuid moths. I. Responses to brief acoustic pulses. *J Comp Physiol 154: 441-447.*
- Pérez M y Coro F (1985). Physiological characteristics of the tympanic organ in noctuid moths. II. Responses to 45 ms and 5 s acoustic stimuli. *J Comp Physiol 156: 689-696.*
- Pérez M y Coro F (1986). Physiological characteristics of the tympanic organ in noctuid moths. III. Post-stimulus phenomena. *J Comp Physiol 159: 115-122.*
- Pérez Carretero M, Gil-Loyzaga P y Poch-Broto J (1996). Atlas de diagnóstico en O.R.L. *Iatros Edicions SL.*
- Plinkert PK, Möhler H y Zenner HP (1989). A subpopulation of outer hair cells possessing GABA receptors with tonotopic organization. *Arch Oto-rhino-laringol 246: 417-422.*
- Plinkert PK, Gitter AH, Zimmermann U, Kirchner T, Tzartos S y Zenner HP (1990). Visualization and functional testing of acetylcholine receptor-like molecules in cochlear outer hair cells. *Hear Res 44: 25-34.*

- Popper AN (1977). A scanning electron microscopic study of the sacculus and lagena in the ears of fifteen species of teleost fishes. *J Morph* 153: 397-418.
- Popper AN y Hoxter B (1981). The fine structure of the sacculus and lagena of a teleost fish. *Hear Res* 5: 245-263.
- Prieto J, Merchán J, Gil-Loyzaga P y Rueda J (1986). Subsurface material in outer hair cells. *Hear Res* 21: 277-280.
- Puel JL (1995). Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Progress in Neurobiology* 47: 449-476.
- Puel JL y Pujol R (1992). Selective glutamate antagonist block the excitotoxicity caused either by glutamate agonists or by ischemia. *Advances in Biosciences: Auditory Physiology and Perception*. Cazals Y, Demany L y Horner KC (Eds.). Pergamon Press. pp: 589-598.
- Puel JL, Lenoir M y Uziel A (1987). Dose-dependent changes in the rat cochlea following aminoglycoside intoxication. I. Physiological study. *Hear Res* 26: 191-197.
- Puel JL, Rebillard G y Pujol R (1990). Active mechanisms and cochlear efferents. En: *Advances in audiology. Cochlear mechanisms and otoacoustic emissions*. Grandori F, Cianfroni G y Kemp DT Eds. Basel: Karger vol 7, pp: 156-163.
- Puel JL, Pujol R, Ladrech S y Eybalin M (1991 b). a-amino-3-methyl-4-isoxazole propionic acid electrophysiological and neurotoxic effects in the guinea pig cochlea. *Neurosci* 45: 63-72.
- Puel JL, Ladrech S, Chabert R, Pujol R y Eybalin M (1991 a). Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 51: 255-264.
- Pujol R (1986). Periods of sensitivity to antibiotic treatment. *Acta Otolaryngol Suppl* 429: 29-33.

- Pujol R (1990). Cochlear physiology and pathophysiology: Recent data. *Drugs of Today* 26 (Suppl. 13): 43-57.
- Pujol R y Lenoir M (1986). Selective glutamate antagonists block the excitotoxicity caused by either glutamate agonists or by ischemia. *En: Advances in Bioscience, Auditory Physiology and Perception*. Cazals Y, Demany L y Horner KC (Eds.). Pergamon Press. pp: 559-598.
- Pujol R, Carlier E y Devigne C (1978). Different patterns of cochlear innervation during the development of the kitten. *J Comp Neurol* 177: 529-536.
- Pujol R, Carlier E y Devigne C (1979). Significance of presynaptic formations in early stages of cochlear synaptogenesis. *Neurosci Lett* 15: 97-102.
- Pujol R, Gil-Loyzaga P y Lenoir M (1987). Distribution of the two types of afferent dendrites in the developing cochlea: a kainic acid study. *Proc Annu Meet Assoc Res Otolaryngol 10th Clearwater Beach, Florida, USA*. p: 122 (Abstract).
- Pujol R, Puel JL y Eybalin M (1992 a). Implication of non-NMDA and NMDA receptors in cochlear ischemia. *NeuroReport* 3: 299-302.
- Pujol R, Lenoir M, Ladrech S, Tribillac F y Rebillard G (1992 b). 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 KC Eds. Pergamon Press. pp: 45-52.
- Pujol R, Lenoir M, Robertson D, Eybalin M y Johnstone BM (1985). Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. *Hear Res* 18: 145-151.
- Pujol R, Rebillard G, Puel JL, Lenoir M, Eybalin M y Recasens M (1991). Glutamate neurotoxicity in the cochlea: a possible consequence of ischaemic or anoxic conditions occurring in ageing. *Acta Otolaryngol (Stockh); Suppl.* 476: 32-36.

- Ramón y Cajal, S (1909). *Histologie du systeme nerveux de l'homme y des vertébrés. Maloine, Paris.*
- Rasmussen GL (1946). The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 84: 141-219.
- Rasmussen GL (1960). Efferent fibers of the cochlear nerve and cochlear nucleus. *En: Neural mechanisms of the auditory and vestibular systems. Rasmussen GL y Windle W Eds. CC Thomas Springfield Ill. pp: 105-115.*
- Rasmussen GL (1964). Anatomic relationships of the ascending and descending auditory systems. *En: Neurological aspects of auditory and vestibular disorders. Fields WS y Alford BR Eds. CC Thomas Springfield Ill. pp: 5-23.*
- Rasmussen GL (1967). Efferent connections of the coclear nerve. *En: Sensorineural hearing processes and disorders. Henry Ford Hospital International Symposium. Grahamed AB Ed. Little Brown Boston. pp: 61-75.*
- Rebillard G y Pujol R (1983). Innervation of the chicken basilar papilla during its development. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 96: 379-388.
- Recasens M, Mayat E y Guiramand J. Excitatory amino acid receptors and phosphoinositide breakdown: facts and perspectives. *En: Current aspects of the neurosciences. Osborne NN ed. Macmillan (London). 3: 103-176.*
- Remezal M, Gil-Loyzaga P y Oriol R (1993). Ultrastructural localization of H human-blood group immunoreactivity in rat cochlear hair cells. *ORL* 55: 205-207.
- Represa A, Tremblay E y Ben-Ari Y (1989). Transient increase of NMDA-binding sites in human hippocampus during development. *Neurosci Lett* 99: 61-66.

- Retzius G (1881). Das Gehörorgan der Wirbeltiere. I. Das Gehörorgan der Fische und Amphibien. II. Das Gehörorgan der Reptilien, der Vögel und der Säugetiere. *Samson and Wallin. Stockholm.*
- Roberts WM, Howard J y Hudspeth AJ (1988). Hair cells: transduction, tuning and transmission in the inner ear. *Annu Rev Cell Biol* 4: 63-92.
- Robertson D (1983). Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 9: 263-278.
- Robertson D, Cole KS y Harvey AR (1987). Brainstem organization of efferent projections to the guinea pig cochlea studied using the fluorescent tracers fast blue and diamidino yellow. *Exp Brain Res* 66: 449-457.
- Romand R y Romand MR (1984). The ontogenesis of pseudomonopolar cells in spiral ganglion of cat and rat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 97: 239-249.
- Romand R, Romand MR, Mülle C y Marty R (1980). Early stages of myelination in the spiral ganglion cells of kittens during development. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 90: 391-397.
- Romand R, Sans A, Romand MR, y Marty R (1976). The structural maturation of the statoacoustic nerve in the cat. *J Comp Neurol* 170: 1-16.
- Rothman SM (1984). Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 4: 1884-1891.
- Rothman SM (1985). The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 5: 1483-1489.
- Rothman SM y Olney JW (1987). Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 10: 299-302.
- Rubel EW y Ryals BM (1983). Development of the place principle: Acoustic trauma. *Science* 219: 512-514.
- Rueda J, De la Sen C, Juiz JM y Merchán JA (1987). Neuronal loss in the spiral ganglion of young rats. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 104: 417-421.

- Russell IJ (1987). The physiology of the organ of Corti. *British Med Bull* 43: 802-820.
- Russell IJ y Sellick PM (1991). Low frequency characteristics of intracellularly recorded receptor potentials in guinea pig cochlear hair cells. *J Physiol* 338: 179-206.
- Sabater-Mata (1992). Anatomía del oído externo. *En: Otorrinolaringología. Abello P y Traserra J. Ed. Doyma. pp: 15-16.*
- Saldaña E (1989). Proyecciones del colículo inferior de la rata albina. Estudio morfológico con el trazador anterógrado leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-1). *Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.*
- Sánchez-Prieto J y González P (1988). Occurrence of a large  $Ca^{2+}$ -independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals. *J Neurochem* 50: 1322-1324.
- Sanjuán J (1998). Study of hearing in premature infants. Evoked cochlear microphonics. *Acta Otorrinolaringol Esp* 49: 525-531.
- Scarpa A (1789). *Anatomicae disquisitiones de auditu et olfactu. Ticini.*
- Schacht J (1986). Molecular mechanisms of drug-induced hearing loss. *Hear Res* 22: 297-304.
- Schacht J y Zenner HP (1987). Evidence that phosphoinositides mediate motility in cochlear outer hair cells. *Hear Res* 31: 155-160.
- Schuknecht (1993). *En. Pathology of the ear. 2ª Edición. pp: 415-446.*
- Schwartz AM, Parakkai M y Gulley RL (1983). Postnatal development of spiral ganglion cells in the rat. *Am J Anat* 167: 33-41.
- Schwartz IR y Ryan AF (1986). Amino acid labelling patterns in the efferent innervation of the cochlea: An electron microscopic autoradiographic study. *J Comp Neurol* 246: 500-512.

- Schweitzer L, Jensen KF y Janssen R (1991). Glutamate neurotoxicity in rat auditory system: cochlear nuclear complex. *Neurotoxicol Teratol* 13: 189-193.
- Shaw NA (1987). The auditory evoked potential in the rat. A review. *Prog Neurobiol* 31: 19-45.
- Shepherd GM (1985). El oído. En: *Neurobiología*. Gordon M. Shepherd. Ed. Labor S.A. pp: 285-304.
- Shibamori Y, Tamamaki N, Saito H y Nojyo Y (1994). The trajectory of the sympathetic nerve fibers to the rat cochlea is revealed by anterograde and retrograde WGA-HRP tracing. *Brain Res* 646: 223-229.
- 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.
- Siegel JH (1991). Activation of NMDA receptors causes swelling of radial afferent dendrites in isolated cochleas. *Proc Annu Meet Assoc Res Otolaryngol* 14th. St Petersburg Beach FL. p: 110.
- Simmons DD, Manson-Gieseke L y Ham D (1990). Differential effects of kainic acid on the developing postnatal cochlea. *Proc Annu Meet Assoc Res Otolaryngol* 13th, St Petersburg Beach, Florida, USA. p: 51.
- Simón F (1995). Neurotoxicidad inducida por glutamato monosódico en la cóclea de la rata en desarrollo. *Tesis Doctoral. Facultad de CC Biológicas. Universidad Complutense de Madrid*.
- Simón F, Gil-Loyzaga P, Hernández E y Carricondo F (1994). Monosodium glutamate affects cochlear function in adult rats. *31st Workshop on Inner Ear Biology, Montpellier, Francia*, p: 7.
- Simon RP, Swan JH, Griffiths T y Meldrum BS (1984). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science Wash DC* 226: 850-853.

- Slepecky N (1997). Outer hair cell morphology related to function. *ENT Journal* 76/3.
- Sobkowicz HM (1992). The development of innervation in the organ of Corti. *En: Development of auditory and vestibular systems 2. Romand R Ed. Elsevier Science Publishers BV. Chapter 3. pp: 59-100.*
- Sobkowicz HM y Rose JE (1983). Innervation of the organ of Corti of the fetal mouse in culture. *En: Development of auditory and vestibular systems. Romand R Ed. Academic Press NY. pp: 27-45.*
- Sobkowicz HM, Emmerling MR y Whitlon DS (1988). Development of cochlear efferents in the postnatal mouse (Abstract). *Midwinter Meet Assoc Res Otolaryngol 11th. pp: 131-132.*
- Sohmer H y Pratt H (1976). Recording of the cochlear microphonic potential with surface electrodes. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 40: 253-260.
- Spoendlin H (1973). Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol* 73: 235-248.
- Spoendlin H (1981). Autonomic innervation of the inner ear. *Adv Oto-Rhino-Laryngol* 27: 1-13.
- Spoendlin H (1984). Primary neurons and sinapses. *En: Ultrastructural atlas of the inner ear. Friedmann I y Ballantyne J Eds. Butterworths (London). pp: 133-164.*
- Spoendlin H y Baumgartner H (1977). Electrocochleography and cochlear pathology. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 83: 130-135.
- Spoendlin H y Lichtensteiger W (1967). The sympathetic nerve supply to the inner ear. *Arch Klin Exp Ohren-Nasen-Kehlkopfheilk* 189: 346-359.
- Stensiö EA (1927). The Downtonian and Devonian vertebrates of Spitzbergen. I. Family Cephalaspidae. *Skr om Svalbard og Nordishavet, n° 12 (2 vols).*

- Stys PK, Waxman SG y Ransom BR (1991).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger mediates  $\text{Ca}^{2+}$  influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter. *Ann Neurol* 30: 375-380.
- Suzuka Y y Schuknecht HF (1988). *Acta Otolaryngol* 450: 3-20.
- Tasaki I (1954). Nerve impulse in individual auditory nerve fibers in guinea pig. *J Neurophysiol* 17: 97-105.
- Tellería JL (1991). Zoología evolutiva de los vertebrados. Ed. Síntesis.
- Terayama Y, Yamamoto K y Sakamoto T (1968). Electron microscopic observations on the postganglionic sympathetic fibers in the guinea pig cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 77: 1152-1170.
- Thompson GC (1978). Afferent auditory projections to the inferior colliculus of the bush baby (*Galago senegalensis*). *Abstr Soc Neurosci* 4: 11.
- Thorne PR y Nuttall AL (1987). Laser doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear Res* 27: 1-10.
- Tremblay E, Roisin MP, Represa A, Charriault-Marlangue C y Ben-Ari Y (1988). Transient increased density of NMDA binding sites indeveloping rat hippocampus. *Brain Res* 461: 393-396.
- Usami S, Igarashi M y Thompson GC (1988). Light- and electron-microscopic study of g-aminobutiric-acid-like immunoreactivity in the guinea pig organ of Corti. *ORL* 50: 162-169.
- Uziel A (1985 a). Estructura del oído interno. En: *Fisiología Neurosensorial en O.R.L. Guerrier Y, Uziel A. Ed. Masson. pp: 55-66.*
- Uziel A (1985 b). El oído externo y el oído medio. En: *Fisiología Neurosensorial en O.R.L. Guerrier Y, Uziel A. Ed. Masson. pp: 66-74.*
- Uziel A, Romand R y Marot M (1981). Development of cochlear potentials in rats. *Audiology* 20: 89-100.
- van Bergeijk WA (1967). The evolution of vertebrate hearing. En: *Contributions to Sensory Physiology, vol 2. Academic Press, New-York - London.*

- van Netten SM (1991). Hydrodynamics of the excitation of the cupula in the fish canal lateral line. *J Acoust Soc Am* 89: 310-319.
- van Netten SM, Karlsson KK, Khanna SM y Flock A (1994). Effects of quinine on the mechanical frequency response of the cupula in the fish lateral line. *Hear Res* 73: 223-230.
- van Noort J (1969). The structure and connections of the inferior colliculus. An investigation of the lower auditory system. *En: Studies in Neuro-Anatomy. Dortuyn JD y Kupers HJGM eds. Van Gorcum and Comp. Amsterdam. pp: 1-115.*
- Vicente-Torres MA (1998). Estudio de sistemas monoaminérgicos en el receptor auditivo. *Tesis Doctoral. Facultad de CC Químicas. Universidad Complutense de Madrid.*
- Vicente-Torres MA y Gil-Loyzaga P (1997). Age effects on serotonin turnover in the rat cochlea. *34th Workshop on Inner Ear Biology, Bari, Italia, P-32.*
- Vicente-Torres MA y Gil-Loyzaga P (1999). Noise stimulation decreases the concentration of norepinephrine in the cochlea. *Neurosci Letters* 266: 217-219.
- Vicente-Torres MA, Bartolomé MV y Gil-Loyzaga P (1998 b). Effects of noise on norepinephrine and serotonin cochlear concentrations. *35th Workshop on Inner Ear Biology. Innsbruck, Austria, O-37.*
- Vicente-Torres MA, Bartolomé MV, Carricondo F, Esquifino A y Gil-Loyzaga P (1998 a). HPLC detection of serotonin within the rat cochlea. *NeuroReport* 9: 3699-3701.
- Vicente-Torres MA, Carricondo F, Martín-Serrano S, Poch-Broto J y Gil-Loyzaga P (1999 b). Modulatory and protector systems of the inner ear: catecholamines and serotonin. *Congreso extraordinario del 50º aniversario de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y Patología Cérvico-Facial. Madrid. p: 140.*

- Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV, Carricondo F y Esquifino A (1996). HPLC-ED detection of serotonin within the rat cochlea. *33rd Workshop on Inner Ear Biology, Utrecht, Holanda, P-44.*
- Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P, Fernández-Mateos P, Arce A y Esquifino A (1993). Piribedil could modify dopamine turnover in cochleas under noise stimulation. *ORL 55: 322-324.*
- Vicente-Torres MA, Carricondo F, Bartolomé MV, Ibáñez MA, San Román J, Poch-Broto J y Gil-Loyzaga P (1999 a). Dopamine and GABA agonists protect de primary neurons of the cochlea against kainic acid neurotoxicity. *International Meeting on Neurotoxicology, Degeneration and Protection in Brain Disease States. Mojácar (Almería). p:77.*
- Wada R (1923). Anatomical and physiological studies on the rowdy of the inner ear of the albino rat. *En: The American Anatomical Memories. Huntington GS, Stockard CR y Evans JM (Eds.). The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, USA.*
- Walsh EJ y McGee JA (1986). Development of function in the auditory periphery. *En: Neurobiology of Hearing: The cochlea. Altschuler RA, Hoffmann DW y Bobbin RP Eds. Raven Press (New York). pp: 247-269.*
- Warr WB (1969). Fiber degeneration following lesions in the posteroventral cochlear nucleus of the cat. *Exp Neurol 23: 140-155.*
- Warr WB (1975). Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brainstem: Their localization, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J Comp Neurol 161: 159-182.*
- Warr WB y Guinan JJ (1979). Efferent innervation of the organ of Corti. Two separate systems. *Brain Res 173: 152-155.*

- Warr WB, Guinan JJ y White JS (1986). Organization of the efferent fibers: the lateral and medial olivocochlear systems. *En: Neurobiology of hearing: the cochlea*. Altschuler RA, Hoffman DW y Bobbin RP (Eds.), Raven Press (New York), pp: 333-348.
- Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P y Honore T (1990). Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 11: 25-33.
- Weber EG y Bray CW (1930 a). Action currents in the auditory nerve in response to acoustical stimulation. *Proc Nat Acad Sci USA* 16: 344-350.
- Weber EG y Bray CW (1930 b). The nature of acoustic response: the relation between sound frequency of impulses in the auditory nerve. *J Exp Physiol* 13: 373-380.
- Weber EH (1820). De aure et auditu hominis et animalium. Pars I. De aure animalium aquatiliu. *Lipsiae*.
- Weiss JH, Hartley DM, Koh J y Choi DW (1990). The calcium channel blocker nifedipine attenuates slow excitatory amino acid neurotoxicity. *Science* 24: 1474-1477.
- Wersäll J (1981). Structural damage of the organ of Corti and the vestibular epithelia caused by aminoglycoside antibiotics in the guinea pig. *En: Aminoglycoside Ototoxicity*. Lerner SA, Matz GJ y Hawkins JE Eds. Boston: Little Brown, pp: 197-214.
- White JS y Warr WB (1983). The dual origin of the olivo-cochlear bundle in the albino rat. *J Comp Neurol* 219: 203-214.
- Whilton DS y Sobkowicz HM (1989). GABA-like immunoreactivity in the cochlea of the developing mouse. *J Neurocytol* 18: 505-508.
- Willott JF, Jackson LM y Hunter KP (1987). *J Comp Neurol* 260: 472-480.
- Willott JF, Hunter KP y Coleman JR (1988). *Exp Neurol* 99: 615-621.

Wilson HV y Mattocks JE (1897). The lateral sensory anlage in the salmon.

*Anat Anz* 13: 658-660.

Young AB y Fagg GE (1990). Excitatory amino acid receptors in the brain:

membrane binding and receptor autorradiographic approaches. *Trends*

*Pharmacol Sci* 11: 126-133.

Zenner HP (1986). Motile responses in outer hair cells. *Hear Res* 22: 83-90.

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

169.

