

UCH-FC
MAG-Biof. med.
P337
C-1



**“MODULACIÓN POR RUIDO DEL SISTEMA
EFERENTE OLIVOCOCLEAR MEDIAL SOBRE EL
POTENCIAL MICROFÓNICO COCLEAR Y
POTENCIAL DE ACCIÓN COMPUESTO DEL
NERVIO EN LA CHINCHILLA”**

Tesis

**Entregada a la
Universidad De Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magíster en Biofísica Médica**

Facultad de Ciencias

Por

Elizabeth Andrea Pavez Arce

Mayo, 2007

Director de Tesis Dr. Luis Robles Wobbe

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

ELIZABETH ANDREA PAVEZ ARCE



Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Biofísica Médica, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 08 de Mayo de 2007.

Director de Tesis:
Dr. Luis Robles

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Carlos Letelier

Dr. Jorge Mpodozis

Dr. Ennio Vivaldi

AGRADECIMIENTOS



Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Luis Robles por su compromiso permanente para guiar esta investigación en cada una de sus etapas. Agradezco profundamente a todos los integrantes del Laboratorio de Neurobiología de la Audición de la Facultad de Medicina: Paul Délano por su asesoría constante, Diego Elgueda por cuidar la salud de mis chinchillas y Fernando Vergara por solucionar los pequeños grandes problemas del laboratorio. Agradezco a mis colegas de la Mención de Otorrinolaringología de la Escuela de Tecnología Médica: Corina Farfán, Catalina Rita y Ximena Osorio por reemplazarme en muchas actividades de docencia. No puedo dejar de mencionar a todos los Profesores de la Facultad de Ciencias que me apoyaron en mi formación: José Roberto Morales, Juan Carlos Letelier, José Rogan y Jaime Ressler. Por último, un especial agradecimiento a mi familia: Mario Pavez, Luisa Arce, Mario Pavez (j) y Alex Zelaya por acompañarme durante todo este camino.

ÍNDICE

	Tema	Página
I	Resumen	
II	Introducción.....	1
III	Hipótesis y Objetivos.....	14
IV	Materiales y Métodos.....	16
V	Resultados.....	21
VI	Conclusiones.....	61
VII	Discusión.....	64
VIII	Bibliografía.....	67
IX	Anexo.....	70

I RESUMEN

El sistema auditivo eferente olivococlear medial (MOC) podría ser activado en situaciones específicas para prevenir un daño coclear frente a estímulos de alta intensidad o aumentar la discriminación de señales transitorias en presencia de ruidos enmascarantes. Está compuesto por dos vías, una que se activa con estímulos ipsilaterales y otra con estímulos contralaterales. Para investigar la modulación del MOC a nivel de la cóclea y del nervio auditivo después de ruido, se analizó el efecto de la presentación de un ruido unilateral de alta intensidad (100 dB SPL, por 30 s) sobre los potenciales microfónicos cocleares (CM) y potencial de acción compuesto del nervio auditivo (CAP) de ambas cócleas simultáneamente en 12 chinchillas adultas, sanas, en estado de vigilia y habituadas a permanecer en un restrictor de movimiento. Para verificar si este efecto es generado por el MOC, se administró gentamicina (IP, 150mg/Kg de peso), antibiótico aminoglucósido descrito como bloqueador específico del MOC.

La activación del MOC por exposición al ruido provocó una modulación de las respuestas de ambos oídos. En el CM ipsilateral el ruido provocó una disminución significativamente menor (1dB promedio) posterior a la administración de gentamicina. En el CAP ipsilateral los efectos del ruido tuvieron mayor variabilidad, con una diferencia promedio de 0,7 dB menor post gentamicina. Para los CM y CAP ipsilaterales con mayores efectos de ruido pre gentamicina se observaron los mayores bloqueos por gentamicina, disminuyendo el efecto del ruido en 3,6 y 1,4 dB, respectivamente. Para el

CM contralateral pre gentamicina se encontró un leve efecto de aumento de la amplitud que fue bloqueado por la gentamicina. Para el CAP contralateral no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto de ruido pre y post gentamicina.

Estos resultados demuestran que el sistema eferente olivococlear medial participa modulando la actividad de ambos oídos después de presentar ruido de alta intensidad. En el oído ipsilateral al ruido provoca una disminución de la amplitud del CAP y CM, mientras que en el oído contralateral provoca un leve aumento de la amplitud del CM.

I ABSTRACT

The medial olivocochlear efferent system (MOC) could be activated in specific situations to protect the cochlea from acoustic injury by high intensity stimuli or to increase discrimination of transient sound in presence of masking noise. This system comprises two distinct pathways, one that respond to ipsilateral stimulus and other to contralateral stimulus. To examine a possible MOC modulation on cochlea and auditory nerve after noise, the present study analyze the effect of unilateral high intensity noise (100 dB SPL, for 30 s) on microphonic potentials (CM) and compound action potential of auditory nerve (CAP) recorded simultaneously in the two cochleae of 12 healthy and awake chinchillas. The animals were habituated to remain in a restraining device. To verify whether the effect is produced by MOC, gentamicin was injected (IP, 150mg/Kg of weight), an aminoglycoside antibiotic that has been reported to block MOC activity.

The MOC activation after noise presentation produced a modulation of cochlear and neural responses in both ears. In the ipsilateral CM, the amplitude reduction after noise presentation was significantly smaller (1 dB, mean) than after gentamicin. In the ipsilateral CAP the noise effects had more variability, with a mean difference 0.7 dB smaller than post-gentamicin. Those CM and CAP recordings which had the largest noise effects pre-gentamicin, showed significantly greater gentamicin block, with a reduction of the noise effect in 3.6 and 1.4 dB respectively. For the contralateral CM pre-gentamicin condition, a small amplitude increase was found, which was blocked by gentamicin. No statistical differences were found for contralateral CAP between noise effect pre and post-gentamicin.

These results prove that the MOC system modulates the cochlear and neural activity in both ears after the presentation of unilateral high intensity noise. In the ear ipsilateral to noise presentation, the MOC system produced a decrease in the amplitude of CAP and CM, whereas in the contralateral ear produced a small increase of the CM amplitude.

II INTRODUCCIÓN

Antecedentes bibliográficos

La cóclea es la estructura donde se realiza el primer análisis del sonido, en su interior se encuentra dividida en tres espacios: escala timpánica, vestibular y media. La escala media contiene al órgano de Corti con sus tres corridas de células ciliadas externas (CCE) y una de células ciliadas internas (CCI), donde ocurre la transducción de los estímulos mecánicos en actividad bioeléctrica. Las vibraciones del estapedio se transmiten a la escala vestibular y desde aquí a la escala timpánica, iniciando una onda de desplazamiento de la membrana basilar que viaja apicalmente, esta “onda viajera” alcanza un máximo de amplitud en un punto específico de la membrana basilar y decae abruptamente. La posición específica donde la onda viajera alcanza el máximo de amplitud tiene una distribución ordenada, de esta forma ondas viajeras de frecuencias agudas alcanzan su amplitud máxima en la base de la cóclea, mientras que las graves en el ápice. La frecuencia a la cual una posición coclear responde al menor nivel de presión de sonido corresponde a la frecuencia característica (CF) de esa posición coclear. Además de las características tonotópicas antes mencionadas, en la cóclea se observa un mecanismo no lineal de compresión, el cual aumenta las vibraciones de la membrana basilar en la región de la CF para bajos niveles de estimulación. Además, el grado de compresión es dependiente de la frecuencia, siendo mayor para las frecuencias altas, sobre los 4Khz (6).

Un método para caracterizar la respuesta de un punto específico de la membrana basilar es a través de curvas de sintonización, donde se representa la presión de sonido requerida para una respuesta determinada de la membrana basilar en función de la

frecuencia de estimulación. En estas curvas se observa que repuestas a las menores intensidades ocurren con estímulos a la frecuencia característica de esa posición coclear, por lo que se puede deducir que la respuesta de la membrana basilar es más sensible para su frecuencia característica (21). Además, se puede observar que la agudeza de sintonización es mucho mayor para las frecuencias agudas (21).

Las investigaciones de Robles y Ruggero (24) analizan el comportamiento no lineal compresivo de la respuesta mecánica coclear, a través de mediciones de vibración de la membrana basilar. En la figura 1 se muestra la sensibilidad (desplazamiento por unidad de presión del estímulo) de la membrana basilar en función de la frecuencia y se observa que la máxima sensibilidad se obtiene para estímulos de baja intensidad a la frecuencia característica de la posición de la cóclea estudiada. Además, a medida que se aumenta la intensidad de estimulación disminuye gradualmente la sensibilidad y la agudeza de sintonización (ancho de la curva en un rango de frecuencias).

Posteriormente, esta respuesta no lineal se explicó por un mecanismo biológico activo de amplificación coclear, que para estímulos de baja intensidad provoca una amplificación de las vibraciones en determinada posición coclear. En la actualidad se postula que el mecanismo molecular responsable de este fenómeno radica en las CCE y que esta amplificación estaría dada por la electromotilidad de las CCE. Una proteína de membrana, denominada prestina, ubicada exclusivamente en las CCE, sería el motor molecular cuyos cambios conformacionales hacen que una depolarización produzca un acortamiento y la hiperpolarización un alargamiento de las CCE. Esta proteína se expresa específicamente en las CCE y modifica la longitud y la rigidez axial de la célula (33). Posteriormente se confirmó que la supresión del gen de la prestina en ratones transgénicos,

provoca una pérdida de la electromotilidad de las CCE y una disminución de la sensibilidad coclear de entre 40 y 60 dB, sin alterar el mecanismo de transducción de las CCE (15). Entonces, la depolarización de las CCE conlleva un acortamiento de su cuerpo celular, lo que provocaría un acercamiento de la membrana tectoria a la cual están anclados los cilios de estas células, permitiendo que cilios de células ciliadas internas (CCI) que no estaban siendo estimuladas entren en contacto con la membrana tectoria y se produzca la depolarización de las CCI.

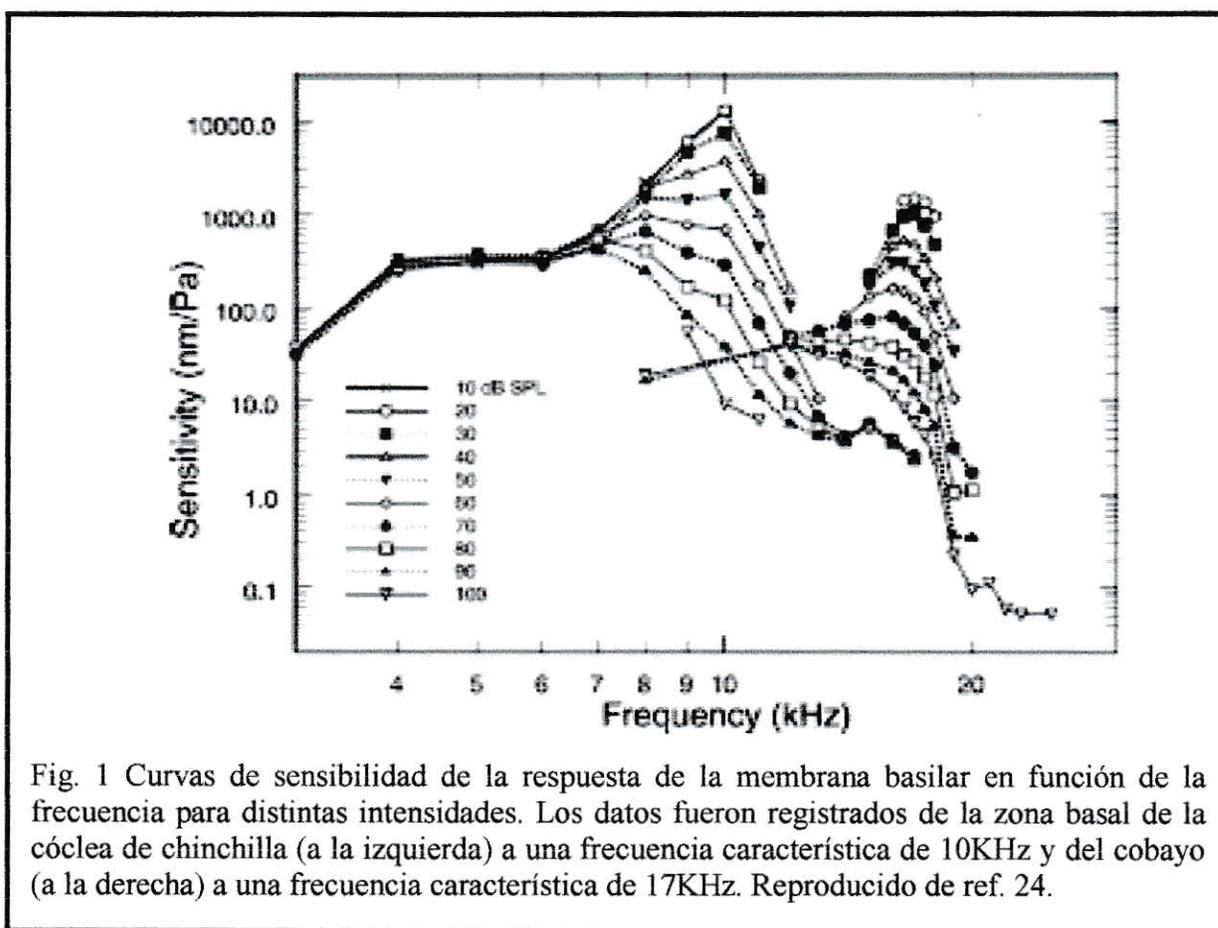


Fig. 1 Curvas de sensibilidad de la respuesta de la membrana basilar en función de la frecuencia para distintas intensidades. Los datos fueron registrados de la zona basal de la cóclea de chinchilla (a la izquierda) a una frecuencia característica de 10KHz y del cobayo (a la derecha) a una frecuencia característica de 17KHz. Reproducido de ref. 24.

Es importante considerar que la electromotilidad está ausente en células ciliadas de otras especies no mamíferos, por lo que además puede existir otro mecanismo de amplificación, probablemente debido a motilidad a nivel de los estereocilios (4). Un

movimiento activo de los cilios, podría incrementar la fuerza de apertura de los canales y con esto, aumentar la sensibilidad de las CCE (4).

Otra característica particular de las CCE es una inervación que difiere completamente de la inervación de las CCI. Las CCI poseen entre un 90 a 95% de la inervación aferente, mientras que las CCE reciben sólo entre el 5 y 10% restante de esta inervación (21). La inervación eferente proyecta indirectamente a las CCI y directamente a las CCE a través de grupos celulares diferentes (22) que se describirán más adelante.

Considerando que la respuesta no lineal de la cóclea se atribuye a las CCE y estas a su vez están inervadas principalmente por fibras eferentes, se postula que la respuesta de la cóclea podría estar modulada por el sistema auditivo eferente.

El sistema eferente auditivo se inicia en la corteza y desciende a través de dos vías, una de estas llega al cuerpo geniculado medial del tálamo, hace sinapsis con fibras aferentes y retorna a la corteza, formando un circuito eferente córtico talámico. Otra vía desciende al colículo inferior y complejo olivar superior (31). Desde el complejo olivar superior, las fibras eferentes inervan las células ciliadas internas y externas de la cóclea formando el sistema eferente olivococlear (10).

Se ha estudiado la distribución neuronal del sistema eferente olivococlear (1, 3, 7, 10, 26, 30), encontrando poblaciones celulares diferentes que permiten dividirlo en dos sub sistemas: lateral (LOC) y medial (MOC). El LOC está formado por pequeñas neuronas ubicadas en la oliva superior lateral, con axones no mielinizados, desde aquí acompaña en su recorrido al nervio vestibular inferior y termina haciendo sinapsis en fibras del nervio auditivo que contactan las CCI. El MOC está formado por neuronas de gran tamaño ubicadas medial, ventral y anterior a la oliva superior medial que tienen axones

mielinizados y terminan en sinapsis directas en las células ciliadas externas del órgano de corti (10). Las diferencias anatómicas entre estos dos sistemas permiten algunos estudios diferenciados, por ejemplo frente a una determinada estimulación eléctrica es posible estimular sólo las fibras del MOC, sin estimular al LOC. Por otra parte, la sinapsis directa del MOC con la base de las CCE sugiere una modulación más directa sobre los procesos que ocurren en la cóclea.

A través de marcación retrógrada se ha encontrado que, en gatos aproximadamente el 73% de las neuronas LOC proyectan ipsilateralmente y el 70% de las neuronas MOC son contralaterales (30). En hámster las neuronas del LOC ipsilaterales alcanzan un 92% y las neuronas MOC contralaterales un 77.4% (26).

La distribución de neuronas del sistema eferente olivococlear de la chinchilla ha sido estudiado por Azeredo y cols (1), quienes inyectaron un marcador neuronal retrógrado en la escala timpánica de cócleas en forma uni y bilateral. Los autores encontraron que las neuronas marcadas tenían una distribución y morfología similares a los patrones generales de las neuronas olivococleares en otras especies de roedores. En el LOC se describen unas neuronas de pequeño tamaño denominadas intrínsecas y unas neuronas grandes que rodean la oliva superior lateral, llamadas Shell. En el MOC se encontraron neuronas de gran tamaño localizadas en el núcleo periolivar dorsomedial. Las neuronas del LOC alcanzan alrededor del 67% del total de neuronas marcadas, las intrínsecas se encontraron casi exclusivamente ipsilaterales a la cóclea inyectada y menos del 1% fueron contralaterales. Las neuronas Shell comprendieron el 9% del total de neuronas, el 6% fue ipsilateral. Las neuronas MOC tanto ipsi como contralaterales constituyen entre el 20 y 25% del total de neuronas olivococleares marcadas. Al considerar sólo las neuronas MOC, el 16-20% son

ipsilaterales, el 79,5-84% son contralaterales y menos del 1% proyectaron bilateralmente. En resumen, Azeredo y cols encuentran que alrededor de un 22% del total de neuronas eferentes son contralaterales: 19% MOC y 3% Shell LOC.

En términos generales, las neuronas del LOC proyectan predominantemente a las células ciliadas internas de la cóclea ipsilateral y las del MOC lo hacen principalmente a las células ciliadas externas de la cóclea contralateral, lo que varía en las diferentes especies es la proporción de esta distribución, sobre todo en el MOC. En base a estos antecedentes, se puede esperar que el grado de modulación que ejerce el MOC sobre la cóclea ipsi y contralateral puede ser diferente, dependiendo, del número de fibras que lo componen y de su distribución.

Las primeras investigaciones para esclarecer la modulación que ejerce el MOC fueron realizadas por Galambos (9) y Fex (8). Galambos describe que la activación del sistema eferente olivococlear provoca una disminución en la amplitud de la respuesta del nervio auditivo (9). Por otra parte, Fex describe que la activación del MOC provoca un aumento de la amplitud del potencial microfónico coclear (8). Estos hallazgos muestran que el MOC simultáneamente provoca una disminución de las respuestas a nivel del nervio auditivo y un aumento de las respuestas a nivel del receptor coclear.

El potencial microfónico coclear (CM), también llamado potencial de receptor, es la actividad eléctrica registrada desde la ventana redonda o promontorio y representa la suma de las corrientes extracelulares generadas por toda la zona de la rampa coclear excitada por un estímulo acústico (31). Esto incluye las corrientes generadas por las células ciliadas internas como externas y por la proporción de estos grupos celulares, el potencial microfónico coclear se atribuye a las células ciliadas externas. Esto ha sido demostrado al

eliminar selectivamente las células ciliadas internas, sin obtener diferencias significativas de la amplitud del CM (5).

Más recientemente (7, 10) también se ha estudiado la modulación del MOC usando la activación por estimulación eléctrica a nivel del piso del IV ventrículo. Al estimular localmente el MOC con pulsos eléctricos en el tronco encefálico, cerca del lugar de origen de las fibras eferentes mediales, se observa una inhibición del potencial de acción del nervio auditivo ipsi y contralateral, siendo 2,6 veces mayor el efecto sobre el lado contralateral: 14,4 dB de inhibición contralateral versus 5,6 dB ipsilateral (10). Al estimular de forma similar el sistema eferente lateral no se observan efectos significativos sobre el potencial de acción del nervio auditivo (10).

Utilizando estimulación eléctrica del MOC a nivel del piso del IV ventrículo, Cooper y Guinan (7) describen dos efectos supresores del MOC sobre la vibración de la membrana basilar, uno rápido que se presenta entre los 30 a 60 mseg y uno lento presente entre los 10 y 50 seg después de la estimulación. Estos efectos fueron mayores para tonos de frecuencia cercana a la característica y de intensidad baja a moderada, por otra parte, ambos efectos fueron irrelevantes para tonos con frecuencias más de una octava por debajo de la frecuencia característica. Para tonos cercanos a la frecuencia característica ambos efectos producen una inhibición similar, disminuyendo el movimiento de la membrana basilar a un nivel que alcanza hasta 13 dB. El CAP registrado entregó información sobre el comportamiento del efecto lento y su inhibición estaría determinada por la mecánica de la membrana basilar. La ganancia del amplificador coclear, es decir, la amplificación de la respuesta mecánica disminuye durante ambos efectos (rápido y lento) de estimulación eferente. El origen de estos efectos estaría en las células ciliadas externas (CCE) e

inhibirían el movimiento de la membrana basilar a través de dos vías distintas. La inhibición lenta sería causada por una disminución en la rigidez de la porción coclear estudiada, inducida por las CCE, mientras que la inhibición rápida sería causada por una disminución de la amortiguación (-) que provee la motilidad normal de las CCE.

Otra forma más fisiológica de activar el MOC es a través de la estimulación acústica, usando su vía ipsi y contralateral (3). Una estimulación acústica ipsilateral llega a la cóclea en estudio, vía aferente sinapta con fibras del nervio auditivo tipo I, continúa por fibras de neuronas “Chopper” del núcleo coclear postero ventral y desde aquí fibras aferentes cruzan la línea media a nivel del complejo olivar superior donde hace sinapsis con las neuronas del MOC y retorna vía eferente a la misma cóclea en estudio (3). Una estimulación acústica contralateral activa la vía aferente hasta los cuerpos neuronales del complejo olivar superior ipsilateral, hace sinapsis con neuronas del MOC y va a inervar las CCE de la cóclea ipsilateral en estudio (ver fig. 2).

Según la vía neuronal antes descrita, un ruido unilateral puede influir en la respuesta de ambas cócleas, provocando una disminución o supresión de la respuesta de las CCE y, por ende, en el CAP. En esta línea hay una serie de investigaciones donde se activa el MOC presentando ruido (13, 19, 20, 27, 30).

Warren y Liberman (30) investigaron el efecto del sonido contralateral en las respuestas unitarias a nivel del nervio auditivo con y sin sección del haz olivococlear (OCB) a nivel de la anastomosis vestibulococlear, lo que produce un corte total de las fibras del OCB y con una sección a nivel del piso del IV ventrículo, es decir, un corte sólo de las fibras eferentes que se activan por estimulación acústica ipsilateral. En la muestra sin la interrupción del OCB, encontraron que el sonido contralateral, ya sea tonos o ruido, a

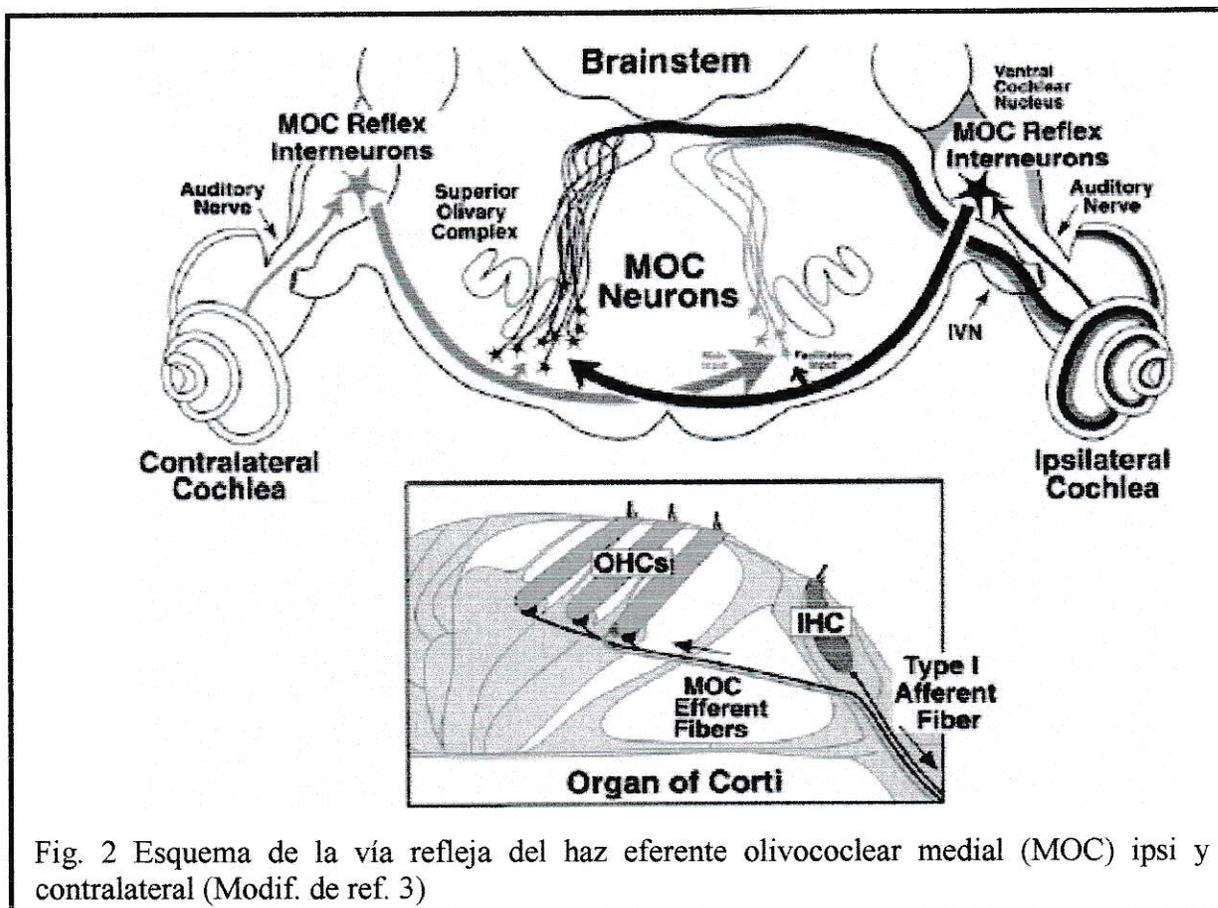


Fig. 2 Esquema de la vía refleja del haz eferente olivococlear medial (MOC) ipsi y contralateral (Modif. de ref. 3)

niveles moderados pueden suprimir las respuestas de fibras del nervio auditivo. Esta supresión es máxima para estímulos ipsilaterales cercanos a la frecuencia característica (CF) de las fibras nerviosas estudiadas y casi nula para estímulos diferentes a la CF. Cuando la frecuencia del supresor contralateral fue cercana a la CF, se obtuvieron los umbrales más bajos, entre los 30 y 50 dB SPL y el efecto fue aumentando su magnitud proporcionalmente con el aumento del nivel del sonido contralateral. En la muestra con interrupción completa del OCB no se observó ninguno de los efectos antes mencionados. En la muestra donde se interrumpieron sólo las fibras eferentes cruzadas se mantuvieron los efectos de supresión por sonido contralateral. Por las características del efecto de supresión

y las similitudes de estos resultados con otros donde se realizó estimulación eléctrica del IV ventrículo, esta modulación se atribuye al sistema eferente medial.

El efecto de supresión por sonido contralateral también ha sido estudiado en humanos (13) a través de emisiones otoacústicas transientes, encontrando efectos similares a los de Warren y Liberman (30). La amplitud del efecto supresor incrementó proporcionalmente con el aumento del nivel del ruido contralateral. La mayor amplitud de la supresión de las emisiones otoacústicas transientes se obtuvo con bajos niveles de intensidad del estímulo click, con una intensidad del ruido contralateral a 60 dB SPL.

Otro método para confirmar la modulación que ejerce el MOC, menos invasivo que la sección de fibras, es por bloqueo específico con una alta dosis de gentamicina. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido usado ampliamente en el tratamiento de infecciones del abdomen y del tracto urinario, con gran eficacia y bajo costo, sin embargo tiene efectos secundarios no deseados como nefrotoxicidad y ototoxicidad, dependientes de la dosis y duración del tratamiento (11, 18). Una dosis única de gentamicina no tiene efectos ototóxicos y puede bloquear rápida y reversiblemente el MOC. El mecanismo molecular de este bloqueo aún no es completamente conocido, pero es probable que actúe alterando el influjo de Ca^{++} necesario para la activación de las corrientes de K^+ , por inhibición directa de los receptores colinérgicos de las células ciliadas externas. Otra posibilidad es un bloqueo directo de los canales de K^+ activados por Ca^{++} en las fibras terminales eferentes cocleares (2).

En cobayos, una inyección de gentamicina a dosis de 150mg/Kg i.m. es capaz de disminuir significativamente el efecto supresor del CAP por ruido contralateral a partir de los 30 minutos y de eliminar por completo este efecto dos horas posterior a la inyección,

por lo que si el efecto supresor es mediado por el MOC, la gentamicina efectivamente lo bloquea de forma selectiva (27).

Lima da Costa y cols (16), estudiaron la acción de diferentes dosis de gentamicina en el efecto de la activación acústica contralateral del MOC de cobayo despierto, en ausencia de estimulación acústica ipsilateral y registraron la disminución de la actividad basal del conjunto de fibras del nervio auditivo con un electrodo colocado en la ventana redonda. Distinguen un efecto supresor rápido del orden de 5 a 10ms posterior a la presentación del ruido, y uno lento de alrededor de 30s. Los autores encuentran que la gentamicina bloquea sólo el componente rápido.

Usando estimulación eléctrica del MOC y registrando el potencial de acción compuesto del nervio auditivo (32) se han obtenido resultados similares a los descritos por Lima da Costa (16), antes y después de la inyección de gentamicina.

Como se expuso anteriormente, el MOC tiene proyecciones a las CCE de ambas cócleas. Entonces, el efecto de supresión ocurre en ambos oídos por distintos grupos neuronales. Estos efectos de supresión por ruido han sido estudiados por Philibert y cols (20), quienes cuantificaron este efecto con ruido ipsi, contra y binaural sobre las emisiones otoacústicas transientes en humanos, encontrando un efecto de 2,3 dB, 1,8 dB y 1,5 dB con ruido binaural, ipsi y contralateral, respectivamente.

Una de las más recientes investigaciones de la modulación del MOC sobre el potencial microfónico coclear fue realizada por Pedemonte y cols (19) que estudiaron el efecto de la exposición a ruido y de la gentamicina en los potenciales microfónicos cocleares ipsilaterales del cobayo despierto, obteniendo una disminución de la amplitud del potencial microfónico coclear después de la presentación de ruido. Este efecto no fue

significativo después de la inyección de gentamicina. Estos resultados indican que la activación del MOC provocaría una disminución del potencial microfónico coclear ipsilateral, a diferencia de los resultados descritos inicialmente por Fex para el oído contralateral (8).

Otro fenómeno a considerar es que la cóclea al estar expuesta a un ruido de alta intensidad provoca un aumento del umbral auditivo que puede ser temporal o permanente, dependiendo de una serie de variables como la intensidad del ruido, tiempo de exposición y labilidad individual al trauma acústico. Una sobre estimulación disminuye la sensibilidad mecánica y la selectividad de frecuencias de la cóclea, reduciendo la ganancia de la respuesta coclear para estímulos de baja intensidad (25). A nivel del nervio auditivo se observa que la sobre estimulación aumenta los umbrales de respuesta en las frecuencias relacionadas directamente con la frecuencia del estímulo al cual es expuesto (25). La exposición a ruido de alta intensidad también disminuye la amplitud de las emisiones otoacústicas transientes y de producto de distorsión (28, 29).

En esta situación de sobre estimulación la activación del MOC puede tener un efecto de protección del oído, disminuyendo su sensibilidad y la amplitud de las respuestas. Diversas investigaciones que apoyan esta hipótesis, activan el OCB con estimulación eléctrica a nivel del piso del IV ventrículo simultáneamente con la exposición a ruido y con estimulación por la vía acústica contralateral, encontrando una disminución de la amplitud de las respuestas del nervio (23).

El efecto de supresión por exposición a ruido permite estudiar el MOC de una forma más fisiológica que por sección de las fibras o estimulación eléctrica (16) y específicamente en chinchilla despierta no existen estudios del efecto de supresión contra o ipsilateral,

tampoco del efecto de la gentamicina en el bloqueo del MOC, por lo que este trabajo será un valioso aporte. Además es importante considerar que la chinchilla se ha usado como modelo para investigar el sistema auditivo en numerosos estudios, ya que posee una audición con un rango de sensibilidad similar al ser humano (12) y posee un oído medio y cóclea fácil de abordar. Por último, el registro simultáneo del potencial de acción compuesto del nervio auditivo y potencial microfónico coclear puede contribuir a esclarecer el tipo de modulación que ejerce el MOC y en un futuro encontrar aplicaciones clínicas como predecir el daño producido por ruido y disminuir la posibilidad de una pérdida auditiva irreversible.



III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: El ruido de alta intensidad activa el sistema eferente olivococlear medial modulando el potencial microfónico coclear y el potencial de acción compuesto del nervio auditivo de ambos oídos en la chinchilla. Este efecto no se observa al bloquear el MOC con una dosis única de gentamicina.

Objetivo general: Analizar el efecto modulador del sistema eferente olivococlear medial (ipsi y contralateral) producido por ruido monoaural a alta intensidad, sobre el potencial microfónico coclear y el potencial de acción compuesto del nervio auditivo de la chinchilla, antes y después de bloquear el MOC con gentamicina.

Objetivos específicos:

1. Calibrar la presión de sonido efectiva que se aplicará frente a la membrana timpánica.
2. Realizar una curva de sintonización para el potencial microfónico coclear y seleccionar la frecuencia para la cual se obtiene la mayor amplitud.
3. Realizar una curva de variación de intensidades (input/output) para el potencial microfónico coclear y una para el potencial de acción compuesto del nervio auditivo y seleccionar la intensidad a la cual la respuesta presenta un amplio rango dinámico.
4. Registrar el potencial microfónico coclear (CM) de ambos oídos, en respuesta a un tono de frecuencia e intensidad previamente seleccionadas y el potencial de acción compuesto (CAP) de ambos oídos, antes y después de presentar ruido unilateral.

5. Bloquear el sistema eferente con una dosis única de gentamicina.
6. Comparar los efectos del ruido sobre la amplitud del CAP y de la CM en ambos oídos, antes y después de la administración de gentamicina.
7. Analizar el efecto de la administración de gentamicina sobre el CAP y CM, independiente del efecto por ruido.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra estuvo constituida por 12 chinchillas adultas sanas, manipuladas en conformidad a los principios orientadores en el cuidado y uso de animales de laboratorio. En una primera etapa el animal fue habituado a mantenerse en un restrictor de movimiento en estado de vigilia, durante 2 a 4 sesiones de 30 min cada una. En una segunda etapa se le implantaron electrodos en la ventana redonda de ambas cócleas. Para esto, se abordó el oído medio a través de la bulla y se colocó un electrodo de tungsteno (100 μ m de diámetro) en la ventana redonda. Se mantuvo indemne la cadena de huesecillos del oído medio para preservar la conducción fisiológica del sonido hasta la cóclea. En la tercera etapa, dos semanas después de la cirugía, se colocó a la chinchilla en el restrictor de movimientos y se realizó el protocolo en estudio que será descrito más adelante.

El estímulo fue presentado a través de un tubo cuyo extremo enfrenta a la membrana timpánica. El tubo se fijó a un molde de silicona que sella el conducto auditivo externo y parte del pabellón auricular, dejando una cavidad de 1cc, aproximadamente entre el tubo y la membrana timpánica.

Para obtener las respuestas de CM y CAP se estimuló con tonos y pulsos cuadrados (click) respectivamente, que fueron entregados por un generador (sistema TDT III) a 2 fonos, conectados uno a cada tubo frente al tímpano del animal. Para estudiar el efecto supresor contra e ipsilateral, se usó un ruido de banda ancha calibrado a 100 y 110 dB SPL en un volumen de 1cc, que fue presentado a través de un parlante a un sólo oído. El oído contralateral se mantuvo ocluido con el molde de silicona para evitar su exposición al ruido. Este molde provoca una atenuación entre 40 y 45 dB.

Para la adquisición de las señales, cada electrodo fue conectado a un preamplificador cercano al animal con un filtro pasa banda entre 100 y 10000 Hz y amplificación por 100, luego se usó un segundo amplificador (Kron-Hite), con filtro pasa banda en el mismo rango de frecuencias y amplificación de 100, por lo tanto, la amplificación total fue de 10000. La salida de este segundo amplificador se conectó a la tarjeta análogo-digital y la señal fue digitalizada y almacenada en el computador con un programa desarrollado en el laboratorio con LabWindows. La figura 3 A muestra un esquema del método de estimulación y adquisición de las señales.

Se registró el CAP y CM de ambos oídos simultáneamente con el siguiente protocolo (fig. 3 B):

- 1 Curva de sintonización de CM. Para esto se usó una intensidad de estimulación constante y se varió la frecuencia del tono desde 500 a 8000 Hz a intervalos de una octava, y de media octava, cuando la frecuencia de estimulación se encontraba cercana a la frecuencia de sintonización del CM.
- 2 Curva de input/output. Variando la intensidad de estimulación desde 0 dB de atenuación hasta la intensidad donde se observe el umbral de la respuesta, en pasos de 10 dB. Se seleccionó la intensidad a la que las respuestas presentaron un amplio rango dinámico, sin saturación.
- 3 Estado basal. Primer control: 10 a 15 ensayos a intervalos de un minuto cada uno. A su vez, en cada ensayo se promedió 32 respuestas a un estímulo click seguido de un tono (seleccionado de la curva de sintonización).
- 4 Presentación de ruido unilateral a 100 o 110 dB SPL por 30 seg.

- 5 Control inmediatamente posterior al ruido, con 15 ensayos a intervalos de un minuto.
- 6 Administración de una dosis de gentamicina de 150 mg/Kg de peso, vía intraperitoneal.
- 7 Control 3 horas después de la inyección: registro del estado basal con 15 ensayos a intervalos de un minuto.
- 8 Presentación del mismo ruido unilateral por 30 seg.
- 9 Control inmediatamente posterior al ruido, con 15 ensayos a intervalos de un minuto.

Como variable para cuantificar el CAP se consideró la amplitud peak a peak en el período entre 1 y 10ms posteriores a la presentación de un click de polaridad alternada. Esta estrategia permitió eliminar el potencial microfónico coclear generado en respuesta al click. Para cuantificar la amplitud del CM se aplicó la transformada rápida de Fourier (FFT) a los 25mseg de duración de la respuesta y se obtuvo la potencia de la frecuencia estudiada (μV^2). Esta estrategia permitió eliminar la contaminación de la respuesta por ruidos no deseados, ya sea externos o provenientes del animal en estado de vigilia. En la figura 4 se muestra un ejemplo del CAP y CM obtenidos simultáneamente en ambos oídos. Debido a que un buen registro de CM se obtiene a intensidades más elevadas que el CAP, el tono fue generado 20 dB por sobre la intensidad del click.

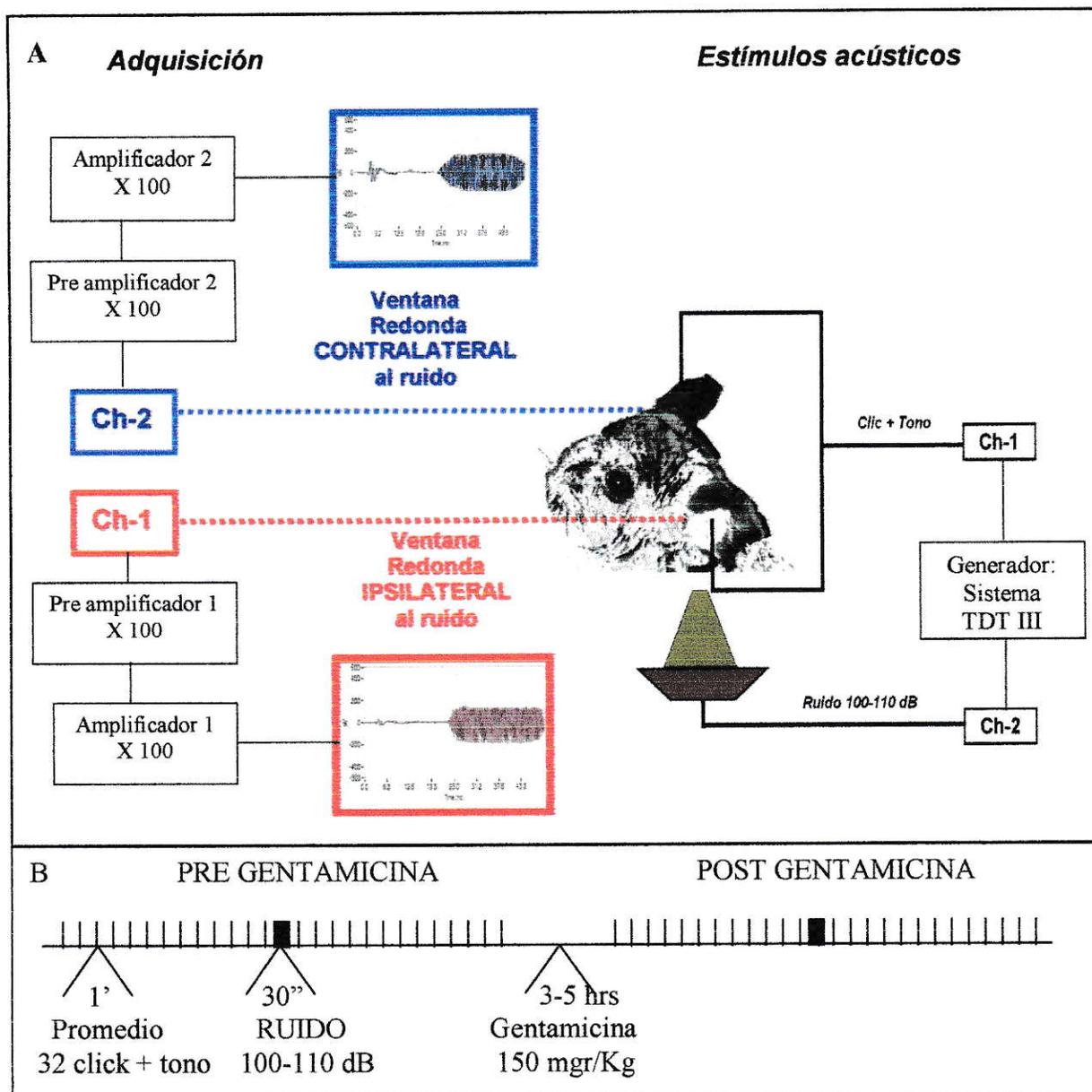


Figura 3: En el panel A muestra el esquema de estimulación y registro del animal. Se estimuló simultáneamente ambos oídos a través del canal 1 del sistema TDT III. El ruido se presentó a un sólo oído, definido como el oído ipsilateral. Para la adquisición de las señales del canal 1 y 2 se usaron pre amplificadores y amplificadores de iguales características. En el panel B se muestra un esquema del protocolo de registro en el tiempo. La secuencia temporal pre gentamicina se repite 3 a 5 hrs posterior a la presentación de gentamicina.

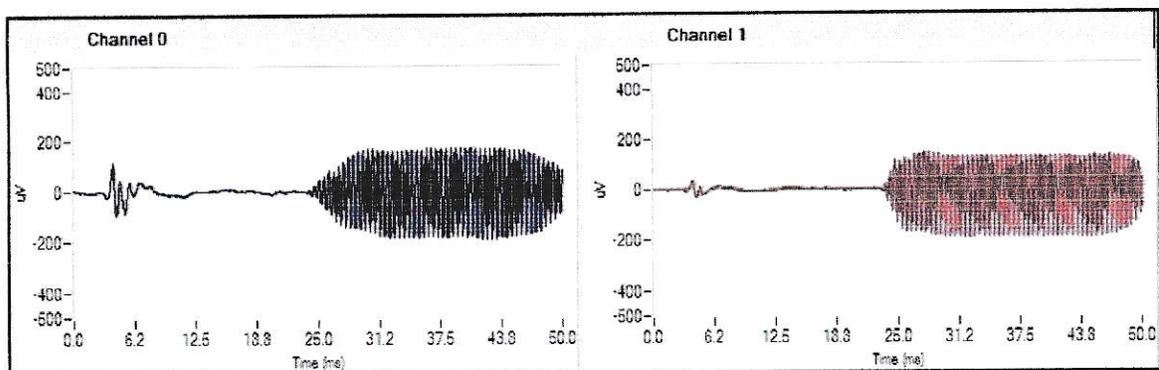


Figura 4: Registros obtenidos simultáneamente en ambos oídos. Se muestra el CAP en respuesta al estímulo click en los primeros 10ms y el CM en respuesta a un tono de 2KHz entre los 25 y 50 ms.

Se compararon las siguientes respuestas:

- 1 Primera respuesta control y posterior a la presentación de ruido unilateral, para conocer el efecto del ruido en cada una de las respuestas estudiadas cuando el MOC está activo.
- 2 Respuesta control y posterior a la presentación de ruido unilateral, después de la administración de gentamicina, es decir, con bloqueo del MOC, para conocer el efecto del ruido sin la activación del MOC.
- 3 Respuesta control antes y después de la administración de gentamicina, para establecer si la gentamicina tiene un efecto ototóxico que disminuye la amplitud de las respuestas.

V RESULTADOS

V.I Medición de los potenciales microfónico coclear (CM) y de acción compuesto del nervio auditivo (CAP) para obtener el estado basal de cada animal

Para el CM se obtuvieron los umbrales por frecuencia, en ambos oídos, para diferentes intensidades de estimulación y se seleccionó la frecuencia de mayor potencia (de mejor sintonización), para posteriormente realizar el protocolo del efecto de ruido. En la figura 5 se muestra un ejemplo donde la mayor potencia del CM (μV^2) se obtiene para la frecuencia de 2000 Hz en las diferentes intensidades, excepto a 0 dB de atenuación donde la potencia mayor fue para 500 Hz, probablemente porque la respuesta ya está saturada. Con esta información se seleccionó la frecuencia para la cual se obtiene la mayor amplitud a diferentes intensidades y en esta frecuencia se realizó el protocolo de efecto de ruido pre y post gentamicina. En el ejemplo, la frecuencia seleccionada fue de 2000 Hz.

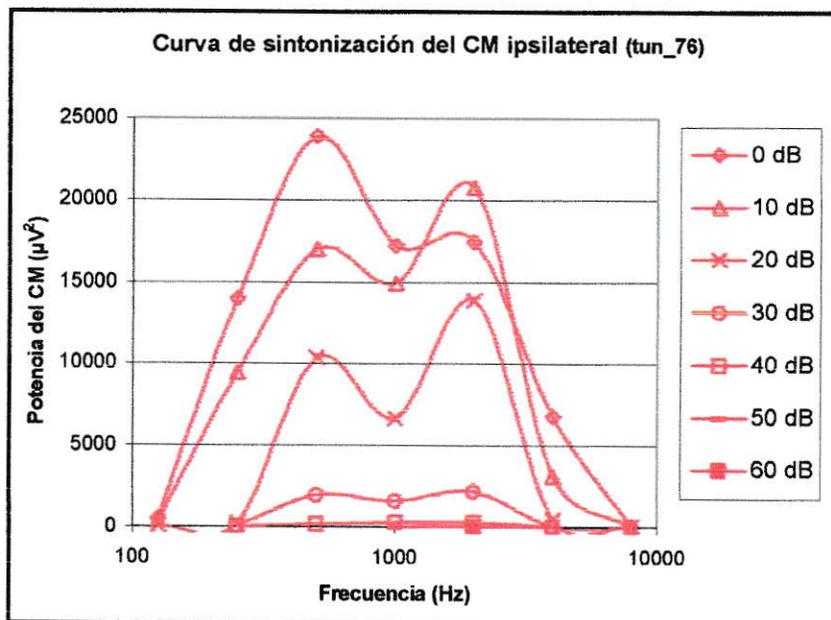


Figura 5: Curva de sintonización del potencial microfónico coclear. Se muestra la variación de la amplitud del CM en función de la frecuencia (Hz) e intensidad de estimulación (dB de atenuación).

Para obtener la curva de input/output se graficó la amplitud de las respuestas del CAP y CM, ipsi y contralateral en función de la intensidad de estimulación (dB de atenuación, fig.6), la cual entregó información respecto al umbral para cada respuesta (flechas), el punto de saturación de las respuestas (asteriscos) donde un aumento de la intensidad de estimulación no provoca aumento de la amplitud y el rango dinámico donde se pueden evidenciar cambios en la amplitud de las respuestas (rango de intensidad entre el umbral de respuesta y punto de saturación). En la figura 6 se muestran curvas de input/output para las respuestas ipsilaterales (en color rojo), con símbolos rellenos para el CAP y vacíos para el CM y las respuestas contralaterales (en color azul), con símbolos rellenos para el CAP y vacíos para el CM. Estas curvas muestran que el CAP y CM tienen un crecimiento lineal con el aumento de la intensidad de estimulación hasta alcanzar la saturación. El umbral del CM en todos los casos se obtuvo a una intensidad entre 20 y 30 dB mayor que el umbral del CAP. Se observa que todas las respuestas del CM se obtienen a intensidades mayores que el CAP.

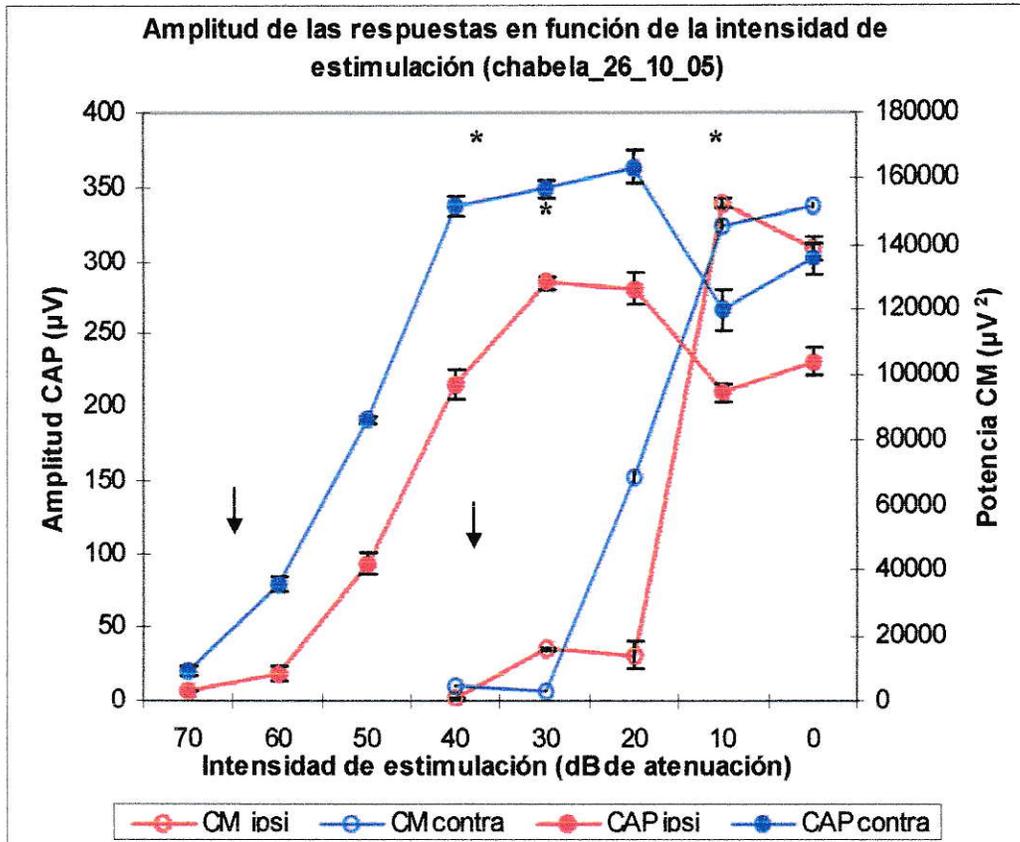


Figura 6: Curva de input/output donde se observa la amplitud del CAP (μV) y CM (μV^2) de ambos oídos en función de la intensidad de estimulación (dB de atenuación). Para el CM se muestra la frecuencia para la cual se obtuvo la mayor amplitud en la curva de sintonización. El umbral del CM y sus siguientes respuestas se obtiene sólo a altas intensidades. Las barras negras representan la desviación estándar para cada promedio de respuestas.

Para analizar los resultados del CAP y CM se ajustó la intensidad de estimulación en toda la muestra, considerando el nivel de sonoridad (dB SL) del estímulo por sobre el umbral de respuesta, donde 0 dB SL corresponde a la intensidad a la cual se obtuvo el umbral de respuesta. Se encontró una alta correlación positiva entre la intensidad de estimulación (dB SL) y la potencia del CM (fig. 7).

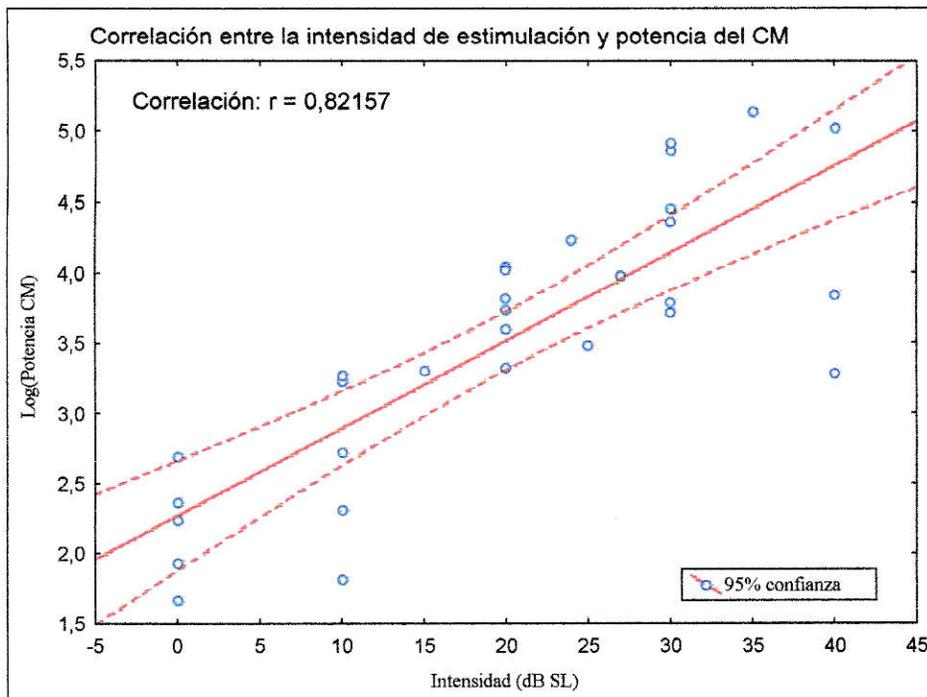


Figura 7: Correlación positiva entre la intensidad de estimulación (dB SL) y la potencia del CM ipsilateral ($n=30$). Al aumentar la intensidad de estimulación la amplitud del CM aumenta. La línea continua corresponde al ajuste y las líneas segmentadas indican las bandas de confianza ($p<0,05$).

De los 12 animales implantados se obtuvo un registro de ambos oídos en 9 casos y una frecuencia de sintonización del CM de 2000 Hz en 9 casos (Tabla 1). Las variaciones en esta frecuencia se atribuyen a la ubicación del electrodo en cuanto a posición y profundidad de penetración en la ventana redonda.

Luego, se analizó el efecto del ruido para más de una intensidad de estimulación, con un promedio de 2,5 mediciones para cada animal (Tabla 1, D. E. ± 1 , moda =3). Cada medición se hizo resguardando que la siguiente presentación de ruido se realizara a no

menos de 45 min posteriores a la exposición, tiempo suficiente para la recuperación de cualquier efecto previo, ya sea mecánico por la presentación de ruido o por efecto eferente.

Tabla 1: Descripción de los 12 animales implantados indicando para cada uno el número de oídos exitosamente implantados, número de intensidades donde se analizó el efecto del ruido, frecuencia de sintonización del CM ipsilateral al ruido y la intensidad del ruido utilizado para obtener un efecto (+) en el CAP ipsilateral.

Nº	Nº de oídos implantados	Nº de intensidades evalaudas	Frecuencia de sintonización de CM ipsilateral (Hz)	Intensidad del ruido (dB SPL)
1	2	1	2000	100
2	2	1	2000	100
3	2	1	2000	100
4	2	3	500	100
5	2	2	2000	110
6	1	2	2000	110
7	2	3	2000	110
8	2	4	2000	100
9	2	3	1000	100
10	1	4	3000	110
11	1	3	2000	110
12	2	3	2000	110



V.II Efecto del ruido en CAP y CM

Para cada sesión experimental se analizó el efecto de la presentación de ruido ipsi y contralateral en la amplitud de las respuestas del CAP y CM, antes y después de la inyección de gentamicina. En 6 chinchillas se usó ruido a una intensidad de 100 dB y en otras 6 fue necesario aumentar la intensidad a 110 dB para lograr un efecto de ruido en el CAP ipsilateral (Tabla 1). Se consideró que hubo efecto del ruido cuando la amplitud del CAP ipsi disminuyó por lo menos en los 2 primeros minutos posteriores a la presentación del ruido, independiente de la magnitud de disminución, ya que la exposición a un ruido de 100 dB por 30 s provoca una disminución transitoria de las respuestas ipsilaterales por un periodo de segundos a minutos, que depende de la labilidad individual al trauma acústico. En la figura 8 se muestra una sesión de registro de ambas cócleas antes y después de la presentación de ruido en el oído ipsi (símbolos rojos), pre y post gentamicina. En este caso, previo a la administración de gentamicina el ruido provocó una disminución del CAP ipsi de 42 % y del CM ipsi del 77%, mientras que en las respuestas contralaterales el CAP disminuyó un 11% y el CM aumentó un 11,3% en los primeros 2 min posteriores a la presentación del ruido. Todos estos efectos fueron significativamente menores post gentamicina donde el CAP y CM ipsi disminuyeron un 10,9 % y 34 %, respectivamente. Para las respuestas contralaterales el CAP disminuyó un 0,6% y el CM aumentó un 5,7%. En este caso además, se observó que las respuestas ipsilaterales 5 horas posterior a la gentamicina disminuyeron su potencia inicial, probablemente por efecto de la gentamicina.

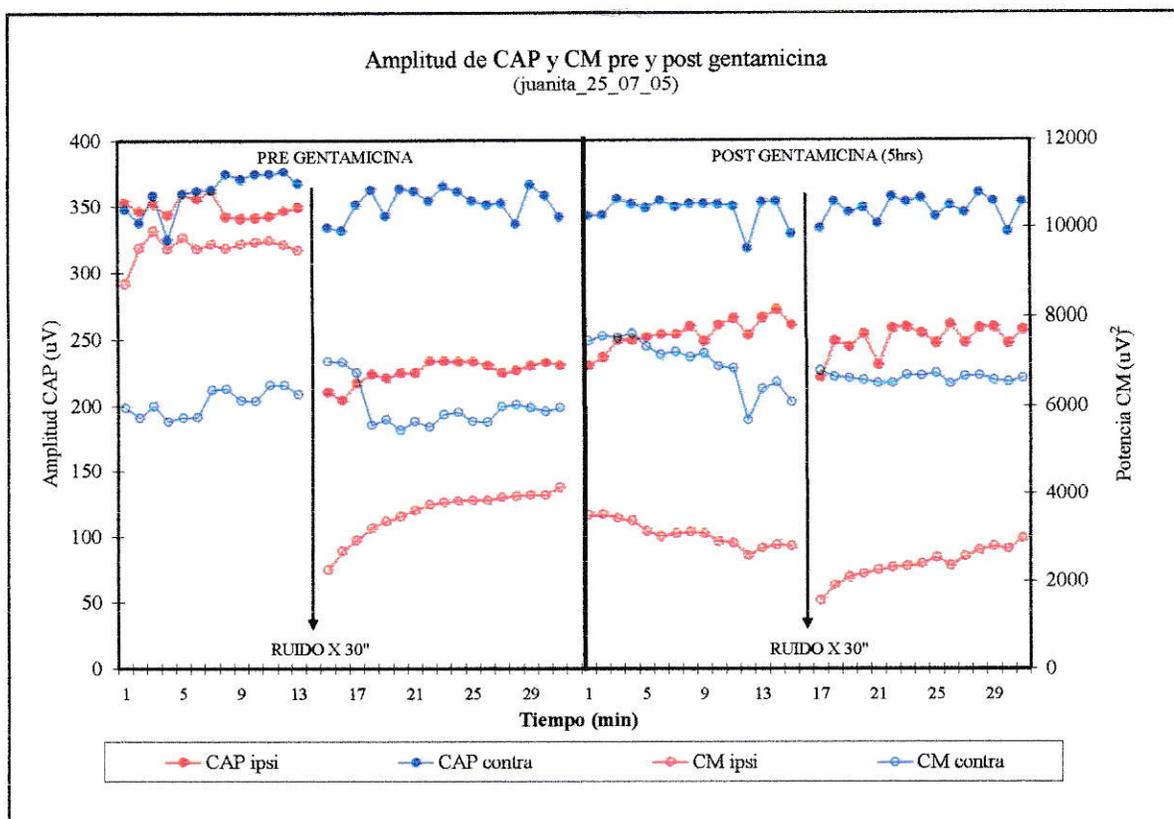


Figura 8: Protocolo de registro de las respuestas ipsi y contralaterales. Cada punto corresponde al promedio de 32 respuestas (obtenidas 1 por seg), con un minuto de diferencia entre cada punto. Se registró el CAP y CM base entre 10 a 15 min, dependiendo de la estabilidad de la respuesta, luego se presentó ruido unilateral (oído ipsi) y se registró por otros 10 a 15 min. Se repitió el registro posterior a la administración de gentamicina (150mgrs/K IP). En este caso se observa que los efectos del ruido fueron significativamente menores post gentamicina .

V.II.1 Efecto del ruido en CM y CAP sin bloqueo del Sistema Eferente Olivococlear Medial (previo a gentamicina)

V.II.1.1 Potencial microfónico coclear (CM) ipsilateral

En el CM ipsilateral la presentación de ruido provocó una disminución de la potencia (amplitud) de la respuesta, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre la potencia previa a la presentación del ruido y la inmediatamente después de éste ($p < 0,05$, prueba $t=3,23$ para muestras dependientes). El efecto del ruido se cuantificó en dB de disminución (valores negativos) o dB de aumento (valores positivos) de la potencia del CM, referido a la potencia previa a la exposición. Los CM de potencia menor a $100 \mu V^2$ fueron eliminados del análisis por estar en los niveles de ruido del registro. Considerando los primeros 2 minutos posteriores a la exposición ($t=0$ y $1'$), se observa que para potencias de CM entre 100 y $1000 \mu V^2$ el ruido provocó una disminución entre los 3,7 y 7,3 dB, mientras que para amplitudes mayores, entre 10000 y $100000 \mu V^2$, el ruido provocó una disminución de 0,2 a 3,2 dB (fig. 9). Para amplitudes entre 1000 y 10000 se observa una amplia variabilidad del efecto con disminuciones entre 1,2 y 12.6 dB y un caso donde se observó un aumento del CM (fig.9). El menor efecto del ruido para amplitudes mayores, se debe probablemente a que el CM se encuentra en su punto de saturación.

Para analizar el efecto del ruido se agrupó el CM según categorías de acuerdo a su potencia, donde la categoría 1 corresponde a todos los casos con una potencia base entre 100 y $10000 \mu V^2$ y la categoría 2 corresponde a los casos con potencia mayor a $10000 \mu V^2$. De esta forma se observa que el efecto del ruido es significativamente mayor ($p < 0,05$)

para la categoría 1 con respecto a la 2, considerando la potencia del CM inmediatamente posterior a la presentación del ruido ($t=0$), 1 y 2 minutos después (fig. 10). Además, al comparar el $t=0$ con el $t=2'$ se observa la disminución del efecto del ruido en el tiempo, por ejemplo, para la categoría 1 el efecto promedio a $t=0$ fue de $-5,5$ dB y a $t=2'$ fue de -4 dB, lo que muestra la rápida recuperación y para el $t=5'$ (no se muestra en la figura) ya no se observa el efecto del ruido.

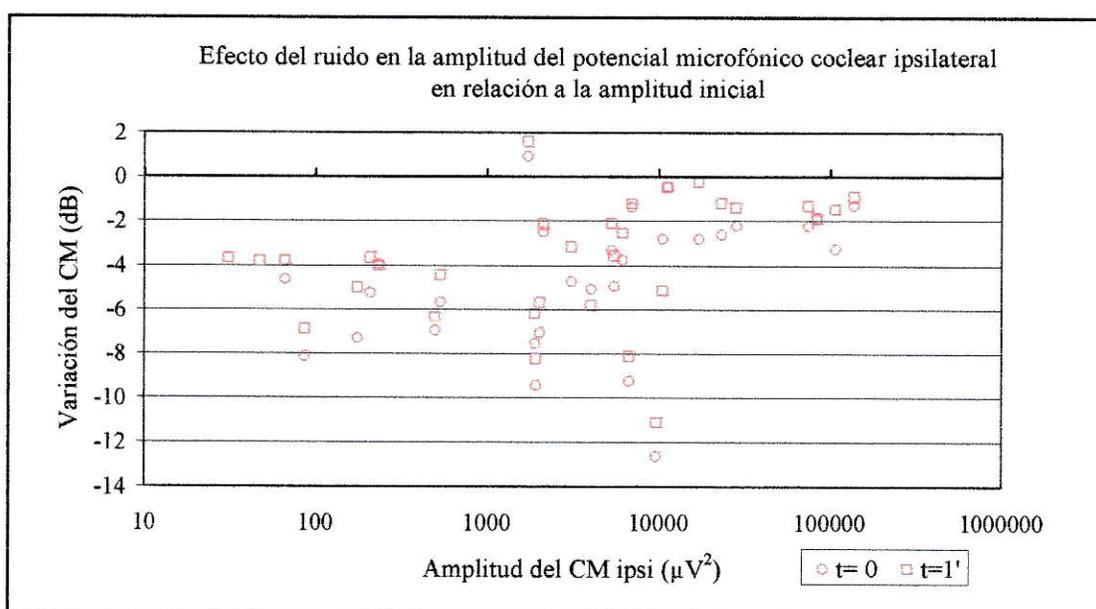


Figura 9: Variación de la amplitud del potencial microfónico coclear ipsilateral (dB), posterior a la presentación de ruido en función de la amplitud de la respuesta previa (potencia del CM en μV^2). Los valores negativos corresponden a una disminución de la respuesta y los positivos a un aumento. Los círculos corresponden al tiempo inmediatamente después de la presentación del ruido ($t=0$) y los cuadrados a 1 minuto después ($t=1'$). Para CM de hasta $1000 \mu V^2$ de amplitud el efecto del ruido es similar, mientras que para CM entre 10000 y $100000 \mu V^2$ de amplitud el efecto del ruido fue menor; el rango entre 1000 y $10000 \mu V^2$ parece ser crítico, con una amplia variabilidad del efecto del ruido ($n=30$).

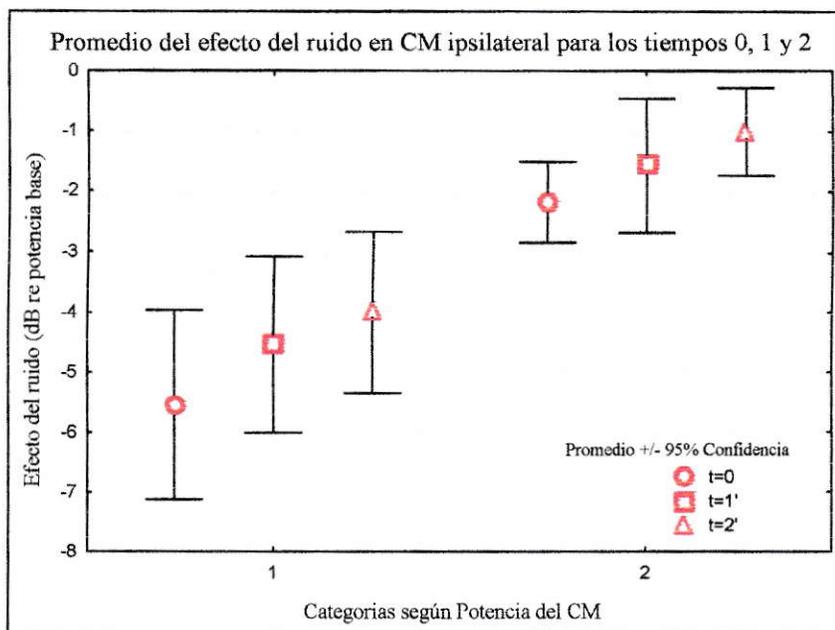


Figura 10: Promedio del efecto del ruido en el CM ipsilateral (símbolos rojos) para los tiempos 0, 1 y 2 minutos posteriores a la presentación del ruido. Las barras indican los intervalos de confianza para cada tiempo. CM menores a $10000 \mu V^2$ (categoría 1) presentan efectos de ruido significativamente mayor ($p < 0,05$) que CM de mayor amplitud. Al comparar los $t=0$ y $t=2'$ de cada categoría se observa la disminución del efecto del ruido en el tiempo.

En el CM ipsilateral el ruido provocó una disminución de la amplitud de la respuesta, que se mantuvo durante 5 a 15 minutos posteriores a la presentación del ruido. El mayor efecto fue al tiempo inmediatamente después de presentar el ruido ($t=0$) y se observó una recuperación a partir de los 3 a 4 minutos, con gran variabilidad entre los casos.

En general, se observó una alta variabilidad del efecto del ruido en la muestra estudiada. Si bien en todos los casos se obtuvo un efecto de ruido, la magnitud de éste fue muy variable, probablemente debido a diferencias individuales en la labilidad del daño por exposición a ruido. El menor efecto del ruido para CM mayores a $10000 \mu V^2$ se debe a que se encuentran en el nivel de saturación de su curva de input/output.

V.II.1.2. Potencial de acción compuesto del nervio auditivo (CAP) ipsilateral

En el CAP ipsilateral, la presentación de ruido provocó una disminución de la amplitud de las respuestas en todos los casos, con una diferencia estadísticamente significativa entre la amplitud antes del ruido y la amplitud inmediatamente después de este ($p < 0,05$, prueba $t = 6,3$ para muestras dependientes).

La magnitud de este efecto fue muy variable, entre los 0,1 y 4,9 dB de disminución de la respuesta con respecto a la amplitud base, donde los mayores efectos fueron para intensidades de estimulación entre 20 y 40 dB SL (dB sobre el umbral de la respuesta), como se muestra en la figura 11 para respuestas a tiempo 0 y 1' posterior al ruido ($n = 30$).

Si bien las respuestas para intensidades de 45 a 50 dB SL se encontraban en el rango de saturación en la curva de input/output para cada caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas saturadas versus las no saturadas, esto debido a la amplia variabilidad de la magnitud del efecto en toda la muestra.

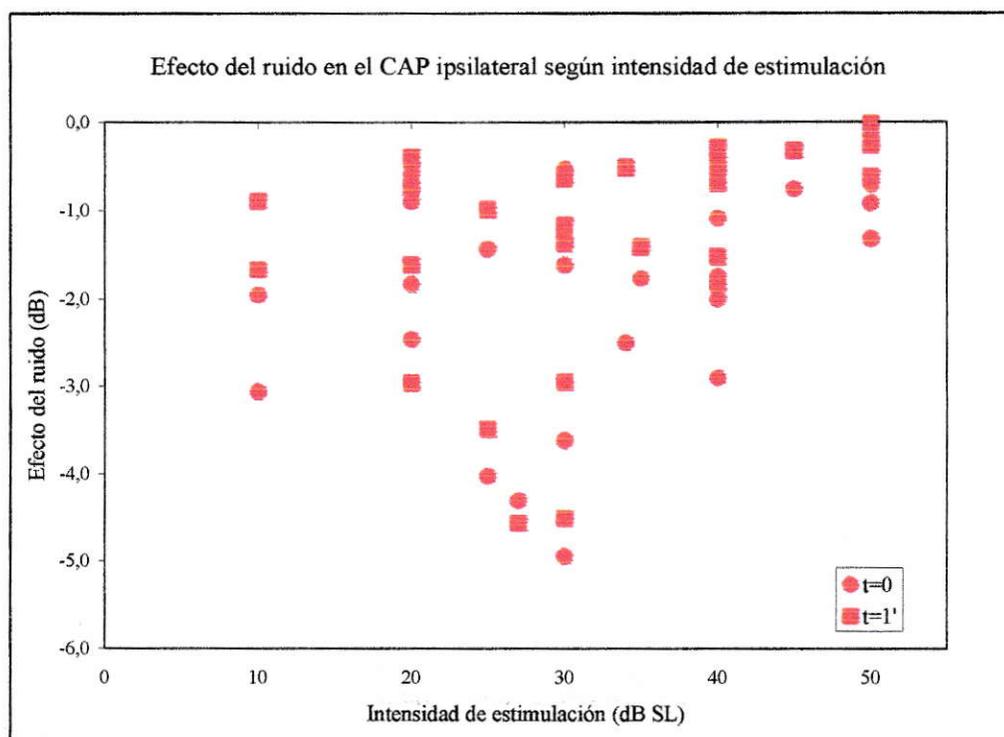


Figura 11: Disminución de la amplitud del CAP ipsi (dB referido a amplitud base) posterior a la presentación de ruido con respecto a la intensidad de estimulación (dB SL). Cada símbolo rojo corresponde al promedio de 32 respuestas. Se muestran las respuestas para los tiempos 0 y 1' posterior al ruido. El mayor efecto de ruido es para CAP entre 20 y 40 dB SL.

V.II.1.3. Potencial microfónico coclear (CM) contralateral

Para el CM contralateral posterior a la presentación de ruido, se encontraron dos tipos de efectos, para un grupo la presentación de ruido provocó un aumento de la amplitud de las respuestas, mientras que en un segundo grupo se observó una disminución. En la figura 12 se muestran ambos efectos de aumento con valores positivos y disminución con negativos.

El grupo con efecto de aumento de la amplitud corresponde al 58% (n=11), además este grupo muestra una menor magnitud del efecto con un mínimo de 0,02 dB y un máximo de 5 dB, para los tiempos 0 y 1'. El grupo de respuestas que disminuyeron fueron el 42% (n=8), presentó una variación del efecto entre los -0,2 y -4,8 dB para los tiempos 0 y 1' (fig.12). Considerando todos los casos (n=19), independiente del efecto de aumento o disminución, se encontró un efecto promedio de 1,1, 1,2 y 1,6 dB para los tiempos 0, 1' y 2', respectivamente y el 90% de los casos tuvo un efecto menor a 4,4, 2,9 y 4,8 dB para los tiempos 0, 1' y 2', respectivamente. Para tiempos mayores a 2' posteriores a la presentación del ruido, el efecto promedio es cercano a 0 dB.

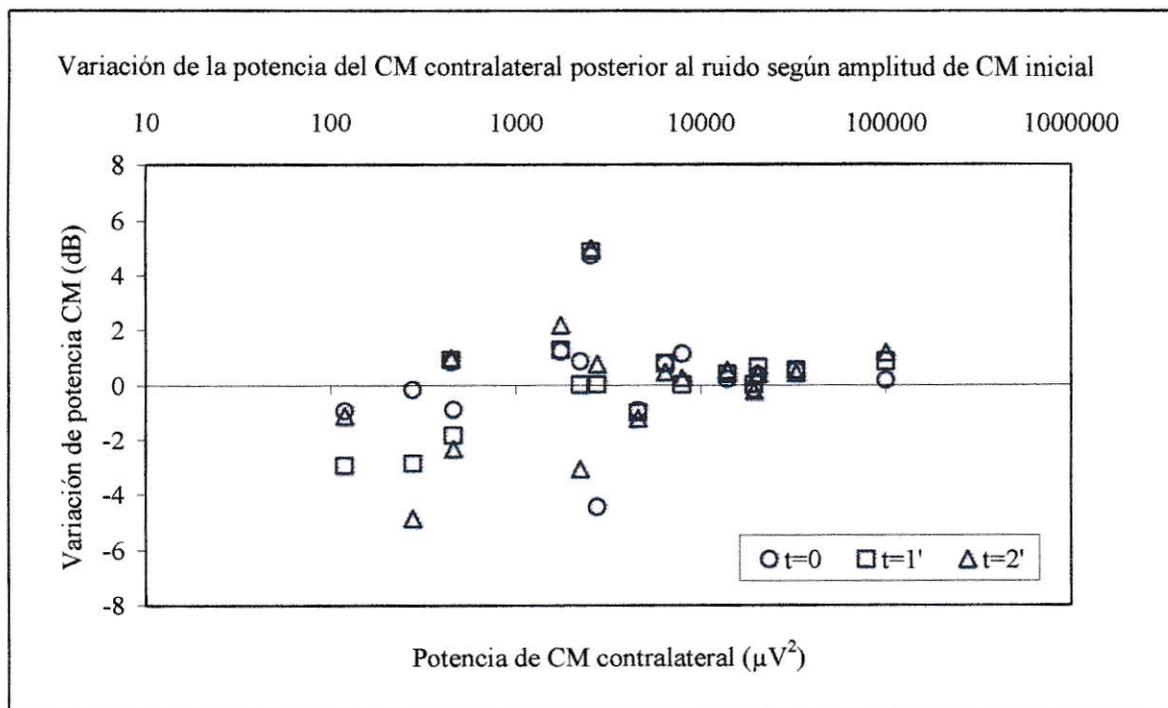


Figura 12: Efecto del ruido en el CM contralateral en función de la amplitud del CM base (potencia del CM en μV^2). Se graficaron tiempo 0, inmediatamente después de la presentación de ruido, 1' y 2' siguientes. Se pueden distinguir 2 tipos de efectos, un aumento de la amplitud del CM en el 58% de los casos y una disminución de la amplitud en el 42% de los casos.

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre el tipo de efecto con la amplitud de la respuesta, ni con la intensidad de estimulación, a pesar de observar una clara tendencia de aumento para intensidades de estimulación mayores a 20 dB SL.

V.II.1.4. Potencial de acción compuesto del nervio auditivo (CAP) contralateral

Al igual que para el CM contralateral, para el CAP contralateral se encontraron dos tipos de efectos, un aumento de la amplitud de las respuestas en 12 casos (57%) y una disminución en 9 casos (43%). La figura 13 muestra estos efectos para tiempos 0, 1' y 2' posteriores a la presentación de ruido en función de la intensidad de estimulación (dB SL). Las respuestas que aumentaron se distribuyeron entre los 0,01 y 1,7 dB con respecto a la amplitud previa al ruido, mientras que las respuestas que disminuyeron se distribuyeron entre 0,01 y 2,3 dB menor que la amplitud previa al ruido. Considerando todos los casos (n=21), independiente del efecto de aumento o disminución, se encontró un efecto promedio de 0,7, 0,6 y 0,7 dB y el 90% de los casos tuvo un efecto menor a 1,3, 1,1 y 0,9 dB para los tiempos 0, 1' y 2', respectivamente. Para tiempos mayores a 2' posteriores a la presentación del ruido, el efecto promedio es cercano a 0 dB.

No se encontró correlación estadísticamente significativa del tipo de efecto con la amplitud de las respuestas, ni con la intensidad de estimulación.

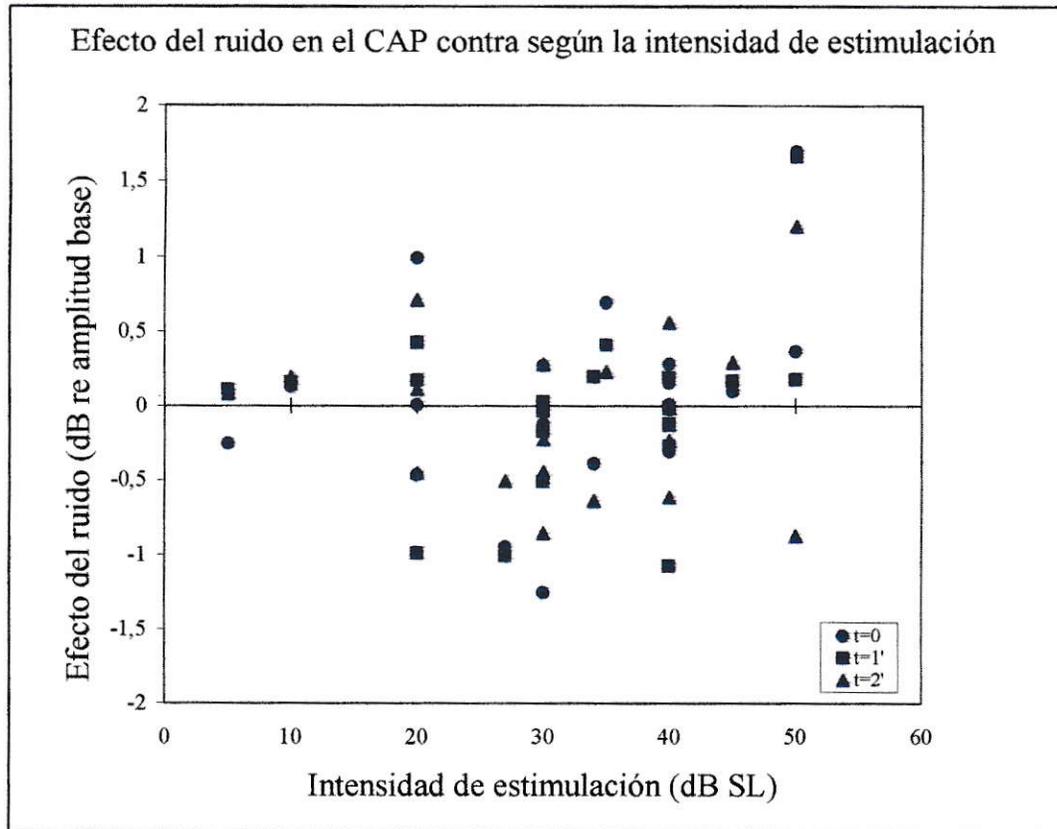


Figura 13: Efecto de la presentación de ruido en la amplitud del CAP contra (dB re amplitud base) en función de la intensidad de estimulación (dB SL). El ruido provocó una disminución de la respuesta en 9 casos y un aumento de la respuesta en 12 casos. Se muestran las respuestas para tiempo 0, 1' y 2' posterior al ruido.

V.II.2 Efecto del ruido en CM y CAP con bloqueo del Sistema Eferente Olivococlear Medial (MOC) por gentamicina.

V.II.2.1 CM ipsilateral

La administración de gentamicina provocó una disminución estadísticamente significativa de la magnitud del efecto del ruido (prueba t para muestras dependientes, $p < 0,05$). La figura 14 muestra 4 casos donde se compara simultáneamente el efecto del ruido y de la gentamicina en la potencia del CM. Cada símbolo representa el promedio de 32 respuestas obtenidas cada 1 minuto. En el caso a) el efecto del ruido a $t=0$ pre gentamicina fue de $-2,8$ dB (flecha verde) y post gentamicina fue de $-1,1$ dB (flecha negra), por lo tanto, el MOC aportaría $1,7$ dB a este efecto. En el caso b) el aporte sería de $2,8$ dB, en el caso c) de $4,4$ dB y en d) de $3,3$ dB. En los casos a, b y c las respuestas de menor amplitud posteriores al ruido, pre y post gentamicina, corresponden a los tiempos 0 , $1'$ y $2'$ y se recuperan rápidamente con una cinética individual, como en el caso c donde a los $8'$ y $9'$ posteriores ya no se diferencia de la potencia previa al ruido (asteriscos en fig. 14 c). Además, se analizó el efecto de la gentamicina en la potencia del CM ipsilateral, antes de la presentación del ruido, como en el caso c) donde la gentamicina disminuyó $1,4$ dB la potencia de la respuesta promedio y en el caso d) donde provocó una disminución promedio de $10,8$ dB. Los resultados globales del efecto de la gentamicina se exponen en el ítem V.III.

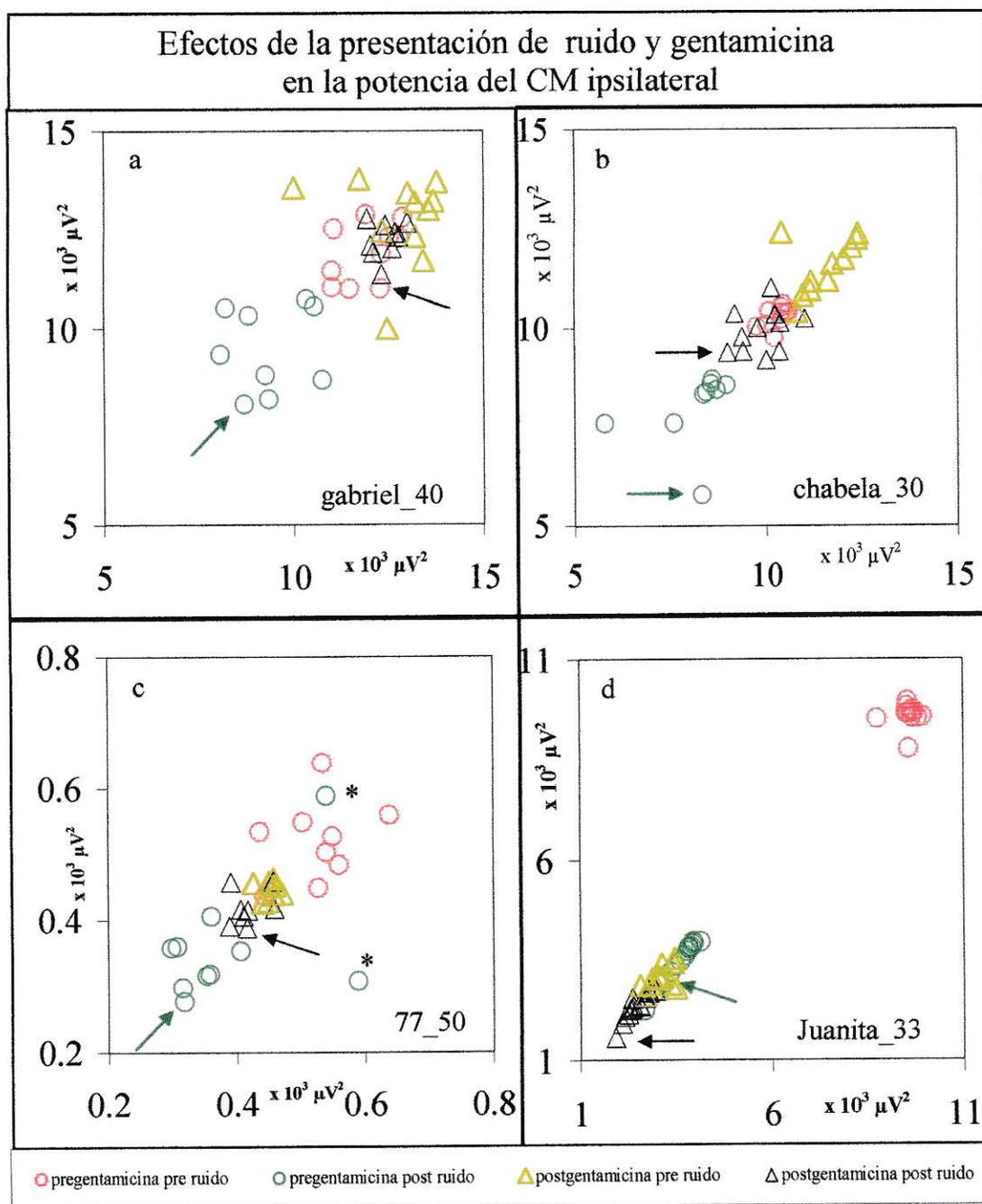


Figura 14: Efecto de la presentación de ruido y gentamicina en la potencia del CM ipsilateral ($\times 10^3 \mu V^2$) en 4 casos. Se muestra la potencia del CM pregentamicina pre ruido en círculos rojos, pregentamicina post ruido en círculos verdes, postgentamicina pre ruido con triángulos ocres y postgentamicina post ruido con triángulos negros. Para la respuesta inmediatamente posterior al ruido el bloqueo del MOC disminuyó significativamente la magnitud del efecto del ruido en 1,7, 2,8, 4,4 y 3,3 dB para los casos a, b, c y d, respectivamente (Prueba t para muestras dependientes, $p < 0,05$).

La gentamicina produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) del efecto del ruido sobre la potencia del CM ipsilateral en todo el rango de valores de potencia inicial (o basal) del CM, como se muestra en la fig. 15.

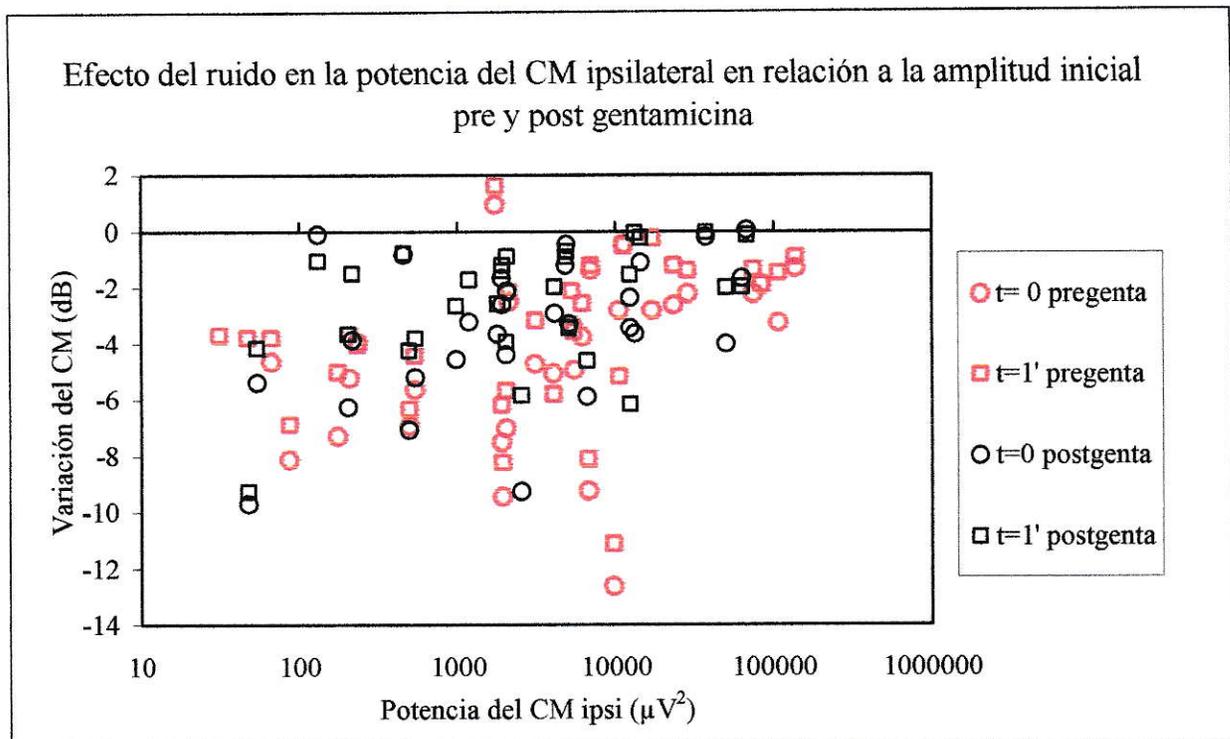


Figura 15: Efecto del ruido en la amplitud del CM ipsilateral (dB de variación) con respecto a la amplitud inicial, previo al bloqueo por gentamicina (símbolos rojos) y posterior al bloqueo (símbolos negros). Se muestran los tiempos 0 y 1' posterior a la presentación del ruido ($n=30$). Post gentamicina el efecto del ruido fue de menor magnitud en todo el rango de amplitudes del CM (potencia en μV^2).

La correlación positiva entre la potencia inicial del CM y la disminución por efecto del ruido, se mantiene posterior a la administración de gentamicina, es decir, el bloqueo del MOC no modifica la relación entre el efecto del ruido con la potencia inicial, sólo disminuye la magnitud del efecto, como se muestra en la figura 16.

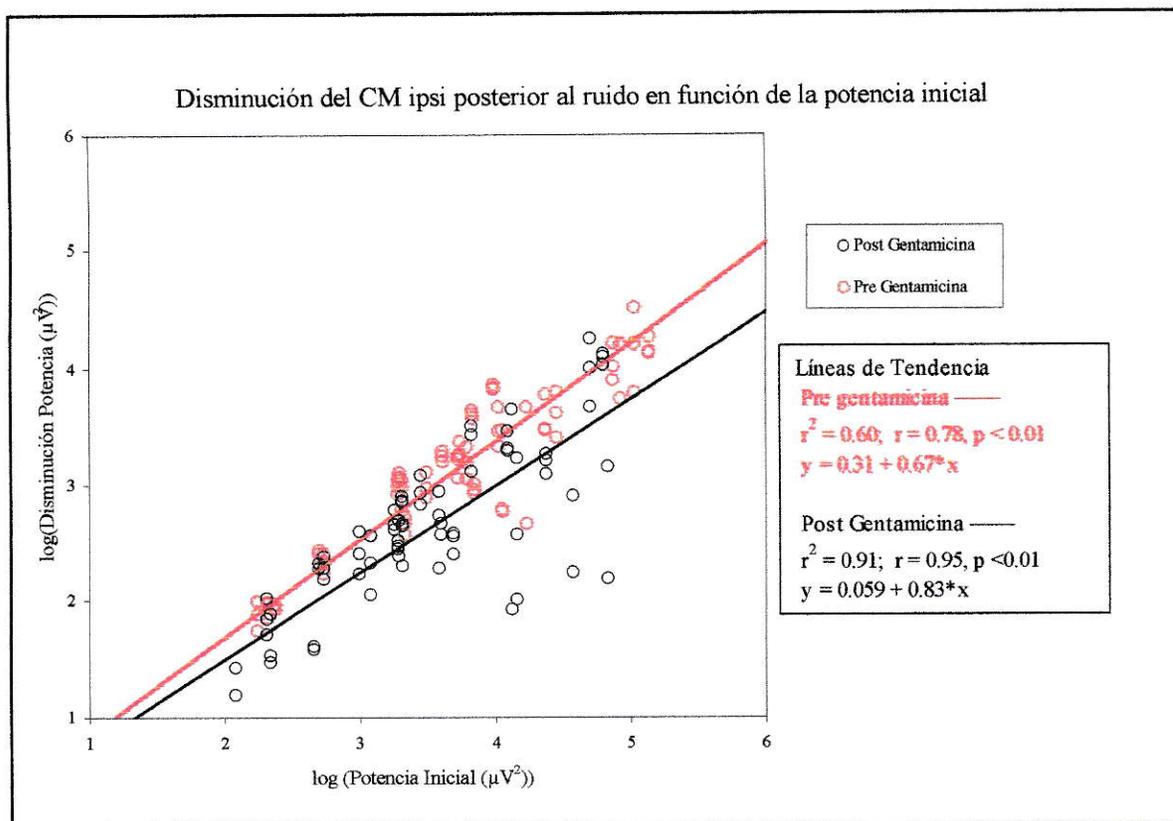


Figura 16: Disminución del CM ipsilateral posterior a la presentación de ruido en función de la potencia inicial, antes y después del bloqueo por gentamicina ($n=30$). Se muestran los tiempos 0, 1' y 2' posteriores al ruido. Se observa que posterior al bloqueo por gentamicina el efecto del ruido provoca una disminución significativamente menor de la potencia del CM y además, las líneas de tendencia muestran que se mantiene una correlación positiva de la disminución por ruido con la potencia inicial.

Para los casos de CM con potencia entre 100 y 10000 μV^2 (fig. 17), se observa una clara disminución del efecto del ruido post gentamicina, más significativo para efectos pre gentamicina mayores a 5 dB. Entre 0 y 5 dB de efecto pre gentamicina, la magnitud del efecto del ruido post gentamicina fue muy variable.

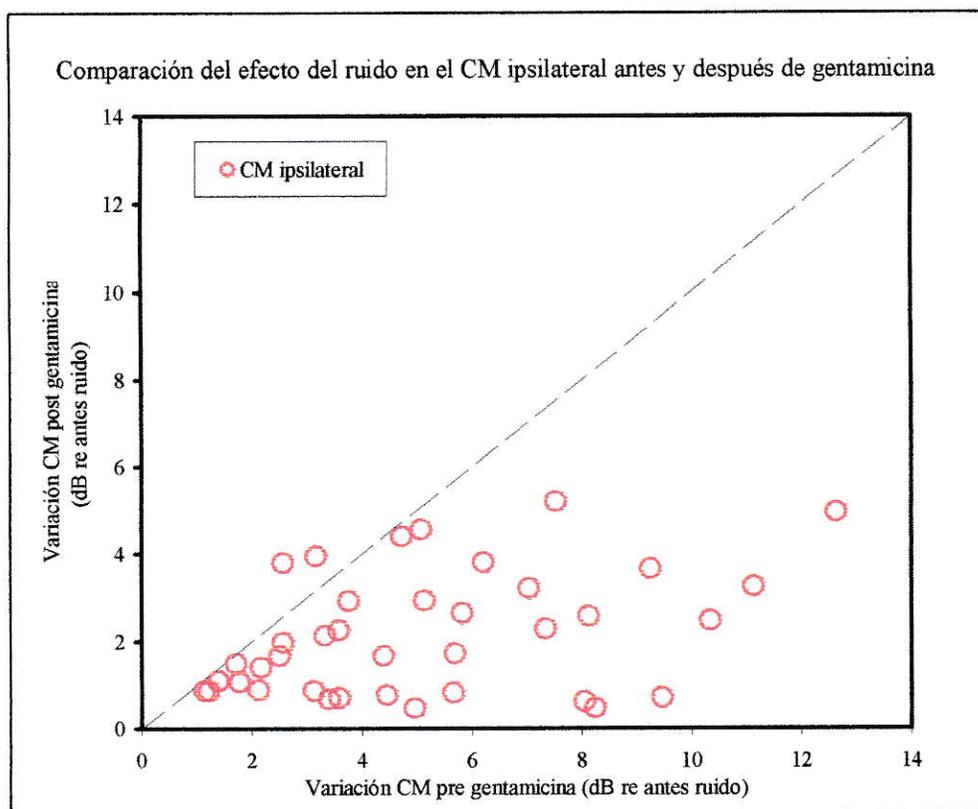


Figura 17: Efecto del ruido en el CM ipsilateral de potencias entre 100 y 10000 μV^2 , antes y después de gentamicina, para los tiempos 0, 1' y 2'. Los efectos de ruido pre gentamicina mayores a 5 dB mostraron los mayores niveles de bloqueo por gentamicina. La línea segmentada indica cuando no existen diferencias entre el efecto pre y post gentamicina.

Para analizar diferencias estadísticamente significativas pre y post gentamicina se usó la Prueba de remuestreo con recolocación (Resampling with Bootstrap Method) (anexo). Con este método se construyó la distribución por remuestreo de la disminución de la potencia del CM ipsilateral por efecto del ruido, obteniendo un efecto promedio de -4,3 dB (DS 0,59, $p < 0,05$) y -3,29 dB (DS 0,43, $p < 0,05$) antes y después de gentamicina, respectivamente (fig. 18, izquierda). Las diferencias entre ambas distribuciones fueron estadísticamente significativas (Prueba t para muestras dependientes, $p < 0,01$) y para cuantificarlas se construyó la distribución de la diferencia entre los promedios por remuestreo (anexo), obteniendo un promedio de -0,98 dB (DS 0,73, $p < 0,05$), que

corresponde al aporte del sistema eferente olivococlear medial en la disminución de las respuestas por efecto de la presentación de ruido (fig. 18, derecha).

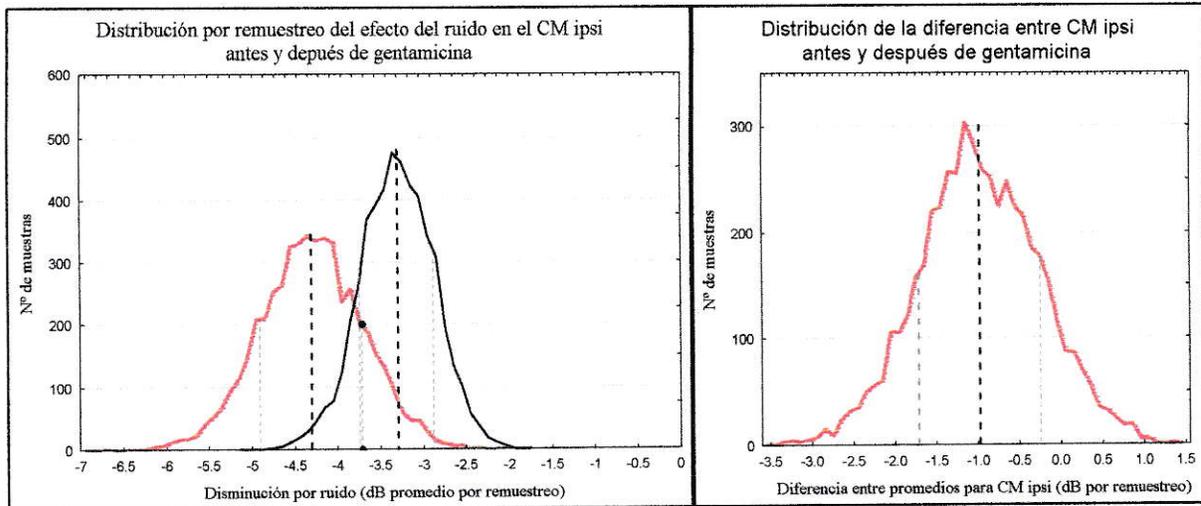


Figura 18: A la izquierda se muestra la distribución por remuestreo del efecto de la presentación de ruido en el CM ipsi antes (rojo) y después (negro) de la administración de gentamicina, con un promedio de $-4,3$ dB (DS $0,59$, líneas segmentadas) y $-3,29$ dB (DS $0,43$, líneas segmentadas), respectivamente y una diferencia promedio de $-0,98$ dB (DS $0,73$, panel de la derecha) que corresponde a la disminución que aporta el sistema eferente olivococlear medial.

Al realizar un análisis estadístico similar para aquellos casos de CM con efectos de ruido mayores a 5 dB pre gentamicina ($n=15$), se observó un mayor bloqueo por gentamicina, con un promedio de $-7,4$ dB (DS $0,62$ dB) y $-3,9$ dB (DS $0,6$ dB) pre y post gentamicina, respectivamente (fig. 19 a la izquierda). Al construir la distribución del promedio de la diferencia se obtuvo un bloqueo de $-3,6$ dB (DS $0,86$ dB) que sería el efecto de supresión que aporta el MOC (fig. 19 a la derecha).

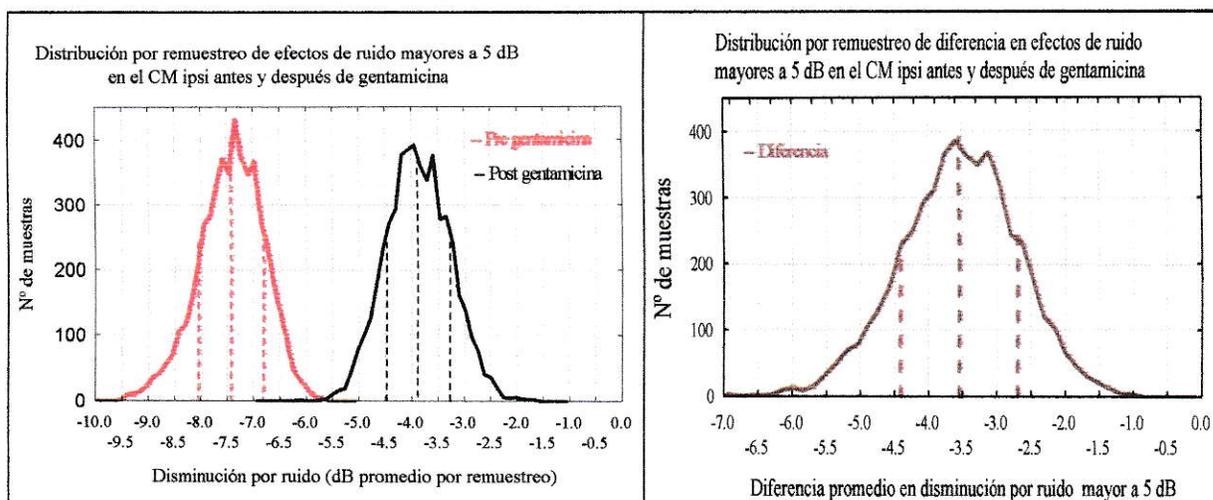


Fig. 19: A la izquierda se muestra la distribución por remuestreo del efecto de la presentación de ruido en el CM ipsi antes (rojo) y después (negro) de la administración de gentamicina para los casos con un efecto de ruido mayor a 5 dB pre gentamicina. Se obtuvo un promedio de -7,4 dB (DS 0,62 dB, líneas segmentadas) y -3,9 dB (DS 0,6 dB, líneas segmentadas) pre y post gentamicina, respectivamente. A la derecha se muestra la diferencia promedio de -3,6 dB (DS 0,86 dB, líneas segmentadas) que corresponde a la disminución que aporta el sistema eferente olivococlear medial.

V.II.2.2 CAP ipsilateral

La administración de gentamicina provocó una disminución significativa de la magnitud del efecto del ruido. En la figura 20 se muestran 4 casos de la variación en la amplitud del CAP ipsilateral, antes y después del ruido, pre y post gentamicina. Para cada caso la respuesta obtenida inmediatamente después del ruido ($t=0$) está indicada con una flecha pre y post gentamicina. En el caso a) pre gentamicina el efecto del ruido fue de 4,3 dB y post gentamicina de 1,6 dB, es decir, la gentamicina disminuyó la magnitud del efecto en 2,7 dB. En este caso además se observa una disminución de la amplitud inicial por efecto de la gentamicina de 2,3 dB. En el caso b) la gentamicina disminuyó la magnitud del efecto en 1,3 dB; además, pre gentamicina a los 8' posteriores al ruido se observa una recuperación total de la respuesta (asterisco). En el caso c) la magnitud del efecto disminuyó en 2,3 dB y en el caso d) en 1,4 dB. En el caso d) no hubo disminución de la amplitud inicial por efecto de la gentamicina.

En los casos pre gentamicina donde el ruido provocó una disminución de la amplitud del CAP ipsilateral menor a 1,5 dB, post gentamicina el efecto del ruido fue muy variable, con disminuciones menores o mayores a las observadas previamente (fig. 21). Para efectos pre gentamicina mayores a 1,5 dB la disminución por ruido post gentamicina fue significativamente menor.

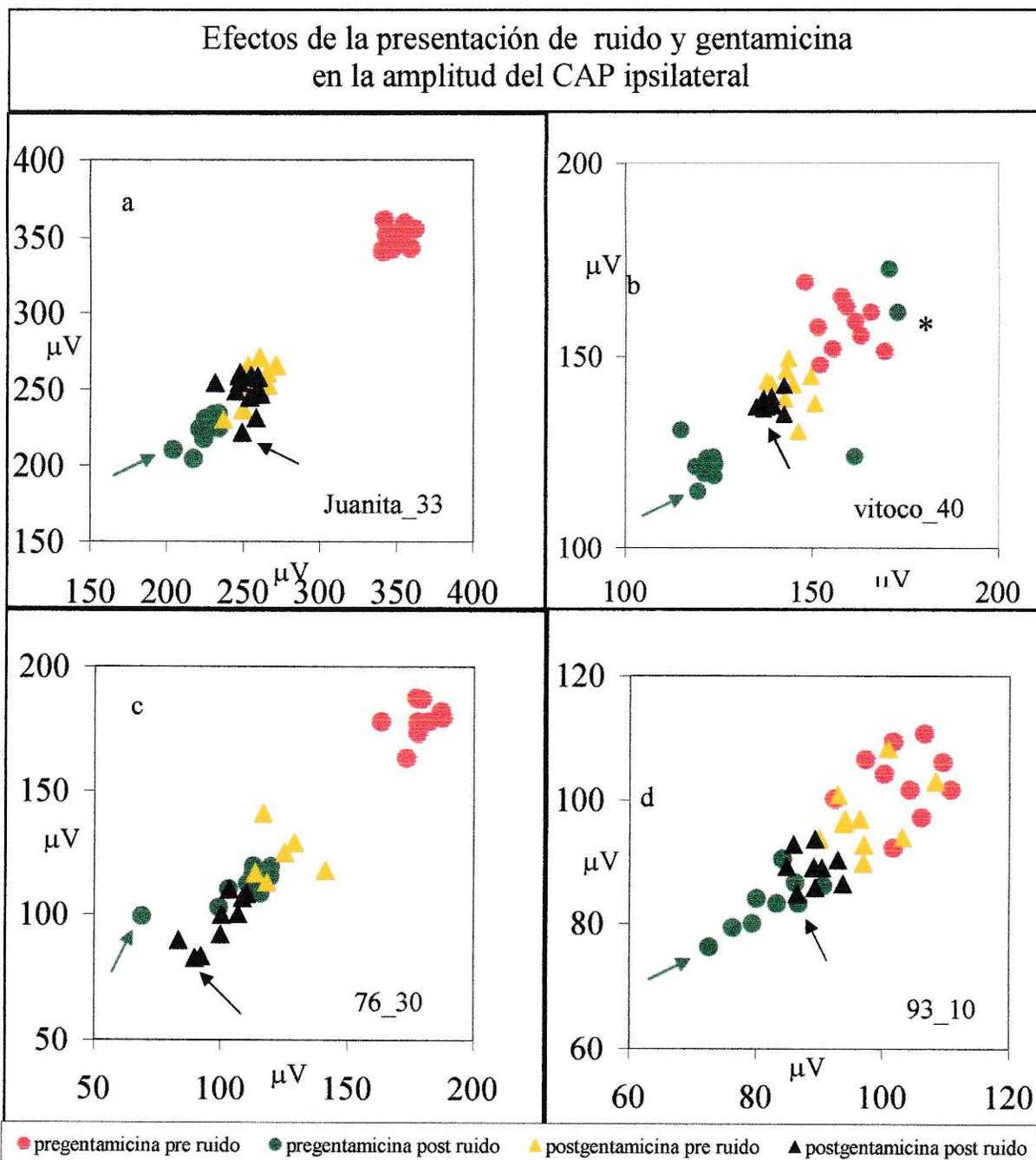


Figura 20: Efecto de la presentación de ruido antes y después de gentamicina en la amplitud del CAP ipsilateral en 4 casos. Se muestra la amplitud del CAP pregentamicina pre ruido en círculos rojos, pregentamicina post ruido en círculos verdes, postgentamicina pre ruido con triángulos amarillos y postgentamicina post ruido con triángulos negros. Se observa que la gentamicina disminuyó significativamente la magnitud del efecto del ruido en 2,7, 1,3, 2,3 y 1,4 dB para los casos a, b, c y d, respectivamente. Además, se observa que la gentamicina disminuyó la amplitud basal en los casos a, b y c.

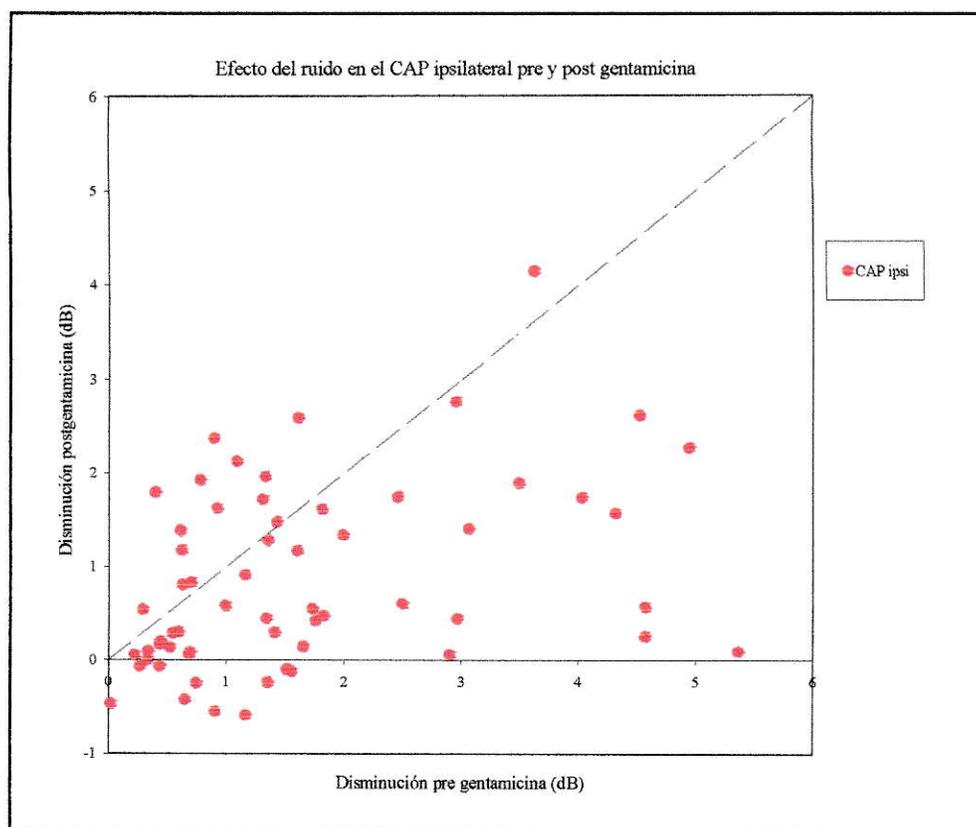


Figura 21: Disminución de la amplitud del CAP ipsilateral posterior a la presentación de ruido post gentamicina en función de la disminución pre gentamicina. Se muestran las respuestas para los tiempos 0 y 1'. Se observa un efecto del ruido menor post gentamicina, excepto para las disminuciones menores a 1,5 dB pre gentamicina.

Al igual que en el caso del CM ipsilateral, para analizar si las diferencias observadas en toda la muestra fueron estadísticamente significativas, se construyó la distribución por remuestreo de la disminución de la amplitud del CAP ipsilateral posterior a la presentación de ruido, obteniendo un efecto promedio de $-1,91$ dB (DS $0,25$, $p < 0,05$) y $-1,17$ dB (DS $0,21$, $p < 0,05$) antes y después de gentamicina, respectivamente (fig. 22, izquierda). Las diferencias entre ambas distribuciones fueron estadísticamente significativas (Prueba t para muestras dependientes, $p < 0,01$) y para cuantificarla se construyó la distribución de la diferencia entre los promedios por remuestreo, obteniendo un promedio de $-0,74$ dB (DS

0,32, $p < 0,05$), que corresponde al aporte del sistema eferente olivococlear medial a la disminución de las respuestas por efecto de la presentación de ruido (fig. 22, derecha).

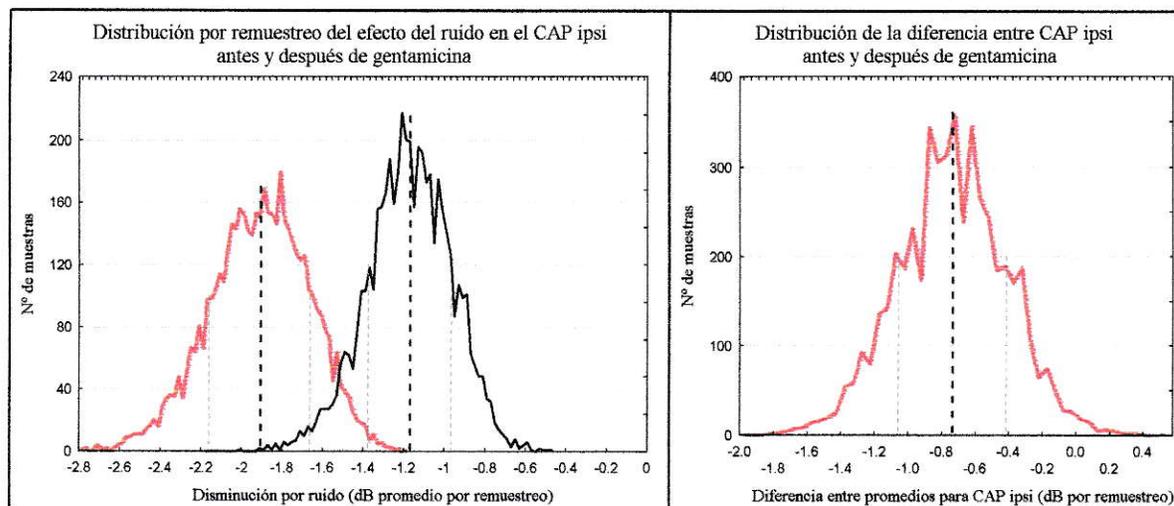


Figura 22: A la izquierda se muestra la distribución por remuestreo de la disminución de la amplitud del CAP ipsilateral posterior a la presentación de ruido antes (rojo) y después (negro) de la administración de gentamicina, con un promedio de $-1,91$ dB (DS $0,25$, líneas segmentadas) y $-1,17$ dB (DS $0,21$, líneas segmentadas), respectivamente y una diferencia promedio de $-0,74$ dB (DS $0,32$, panel de la derecha) que corresponde a la disminución que aporta el sistema eferente olivococlear medial.

Al realizar un análisis estadístico similar para aquellos casos de CAP con efectos de ruido mayores a $1,5$ dB pre gentamicina ($n=15$), se observó un mayor bloqueo por gentamicina, con un promedio de $-2,9$ dB (DS $0,31$ dB) y $-1,5$ dB (DS $0,32$ dB) pre y post gentamicina, respectivamente (fig. 23 a la izquierda). Al construir la distribución del promedio de la diferencia se obtuvo un bloqueo de $-1,4$ dB (DS $0,44$ dB) que sería el efecto de supresión que aporta el MOC (fig. 23 a la derecha).

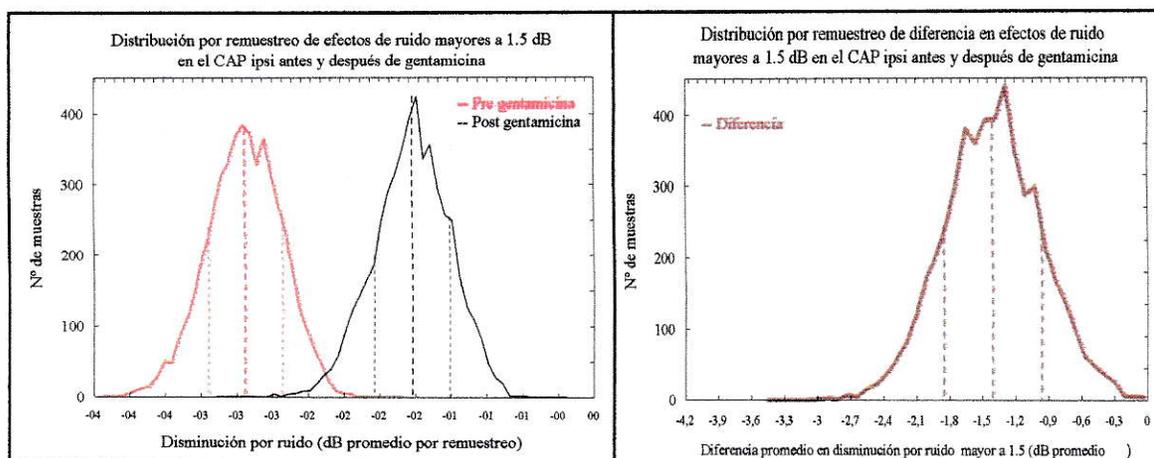


Fig. 23: A la izquierda se muestra la distribución por remuestreo del efecto de la presentación de ruido en el CAP ipsi antes (rojo) y después (negro) de la administración de gentamicina para los casos con un efecto de ruido mayor a 1,5 dB pre gentamicina. Se obtuvo un promedio de -2,9 dB (DS 0,31 dB, líneas segmentadas) y -1,5 dB (DS 0,32 dB, líneas segmentadas) pre y post gentamicina, respectivamente. A la derecha se muestra la diferencia promedio de -1,4 dB (DS 0,44 dB, líneas segmentadas) que corresponde a la disminución que aporta el sistema eferente olivococlear medial.

V.II.2.3. CM contralateral

Similar a los efectos del ruido previo a la administración de gentamicina, post gentamicina el ruido provocó aumento y disminución del CM contralateral. En la figura 24 se muestran 4 casos con distintos tipos de efecto. El tiempo inmediatamente después del ruido ($t=0$) se muestra con una flecha pre y post gentamicina y se comparó con la potencia promedio, previa al ruido. En el caso a) pre gentamicina el efecto del ruido disminuyó 3,1 dB la amplitud de la respuesta base y disminuyó sólo 0,3 dB post gentamicina, mientras que para el mismo animal a una intensidad diferente (caso b, 50 dB de atenuación) pre gentamicina el ruido provocó un aumento de 1,1 dB y post gentamicina una disminución de 2,0 dB. En el caso c) pre gentamicina el ruido provocó una disminución de 4,4 dB y post gentamicina de 0,7 dB, a los 8 y 9 min se observó un aumento de la amplitud por sobre los valores iniciales (asterisco). En d) pre gentamicina se observó un aumento de 2,2 dB y post gentamicina una disminución de 2,2 dB.

El efecto del ruido pre y post gentamicina no tuvo un patrón de respuesta constante, como se muestra en la figura 25 con valores negativos para los efectos de disminución y con valores positivos para aumentos. No se encontró correlación con la amplitud de la respuesta ni la intensidad de estimulación.



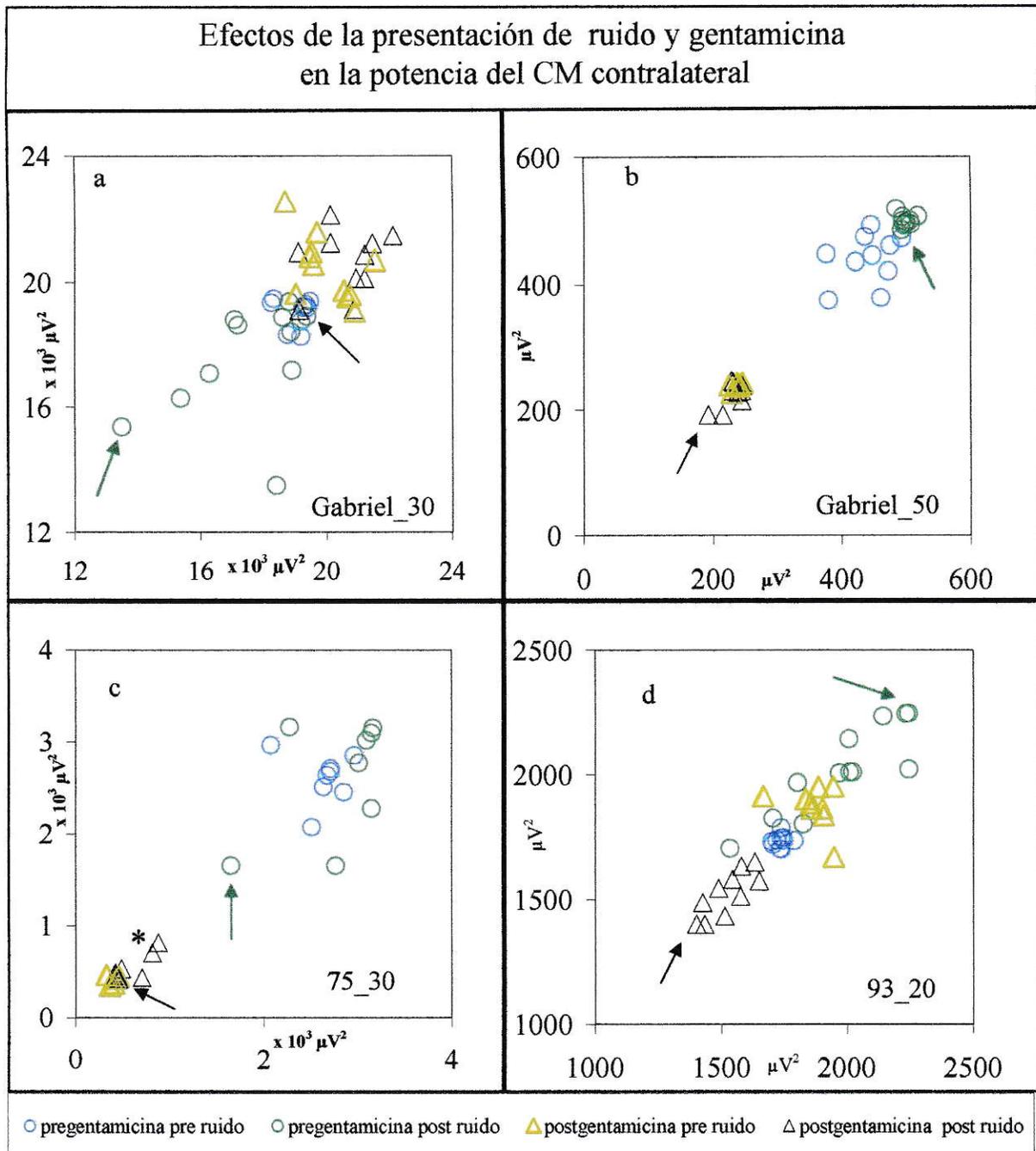


Figura 24: Efecto de la presentación de ruido y gentamicina en la potencia del CM contralateral. Se muestra la potencia de la respuesta para 4 casos con efectos de ruido diferentes. Pregentamicina pre ruido en círculos azules, pregentamicina post ruido en círculos verdes, postgentamicina pre ruido con triángulos ocre y postgentamicina post ruido con triángulos negros.

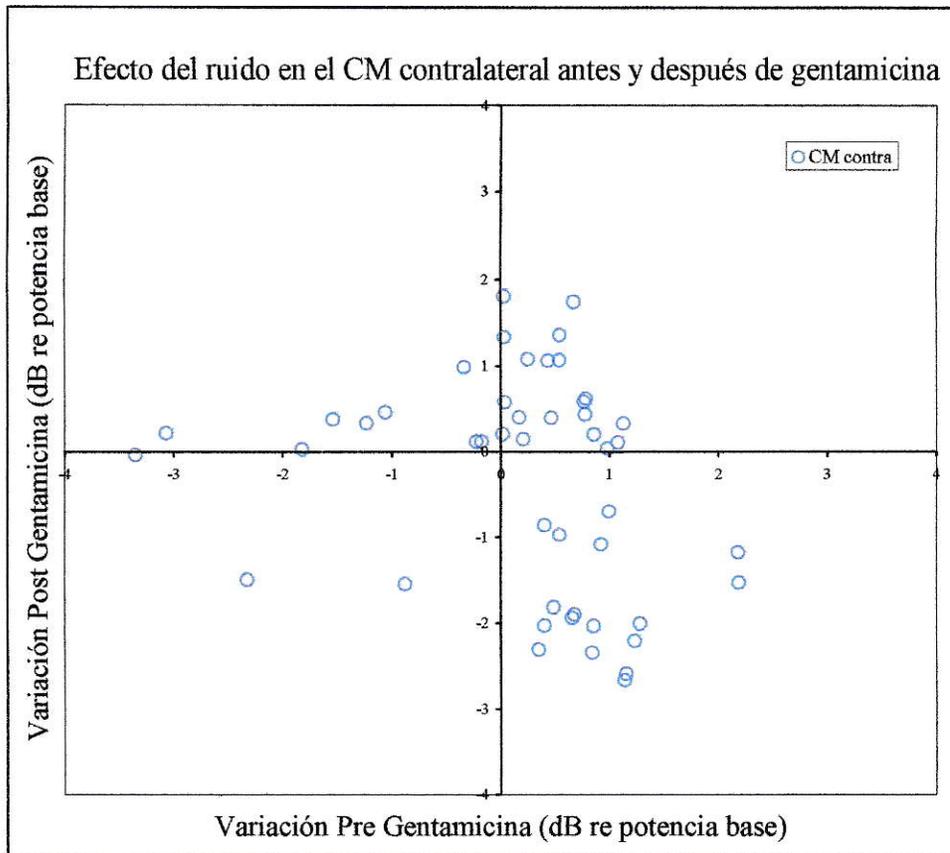


Figura 25: Efecto del ruido en el CM contralateral (dB de variación) post gentamicina en función de la disminución pre gentamicina. Se muestran los 3' posteriores al ruido (n=17). Las respuestas que aumentaron pre gentamicina, post gentamicina en algunos casos aumentaron y en otros disminuyeron. Lo mismo ocurre para las respuestas que disminuyeron previo a la gentamicina. Se observa una gran variabilidad en el efecto del ruido y el bloqueo del MOC.

La distribución por remuestreo de las variaciones en el CM contralateral posterior a la presentación de ruido, muestra un efecto promedio de 1,0 dB de aumento (DS 1,1, $p < 0,05$) y 0,6 dB de aumento (DS 0,6, $p < 0,05$) antes y después de gentamicina, respectivamente (fig.26 panel izquierdo). Las diferencias entre ambas distribuciones fueron estadísticamente significativas (Prueba t para muestras dependientes, $p < 0,01$) y para cuantificarlas se construyó la distribución de la diferencia entre los promedios por remuestreo, obteniendo 0,4 dB (DS 1,2, $p < 0,05$), que indica que no hay diferencia en el

promedio (fig. 26 panel derecho). La diferencia es en la forma de ambas distribuciones; para la distribución pregentamicina se observa la presencia de 2 peaks que hacen sospechar de la presencia de dos fenómenos superpuestos, uno que provoca un aumento en la amplitud de la respuesta posterior al ruido y otro que provoca una disminución; el bloqueo por gentamicina elimina el componente que provoca el aumento, por lo tanto, en esta condición el sistema eferente olivococlear medial estaría provocando un aumento de la amplitud del CM contralateral. A pesar de las diferencias entre las distribuciones antes y después de gentamicina, ambas son consideradas normales (según prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov).

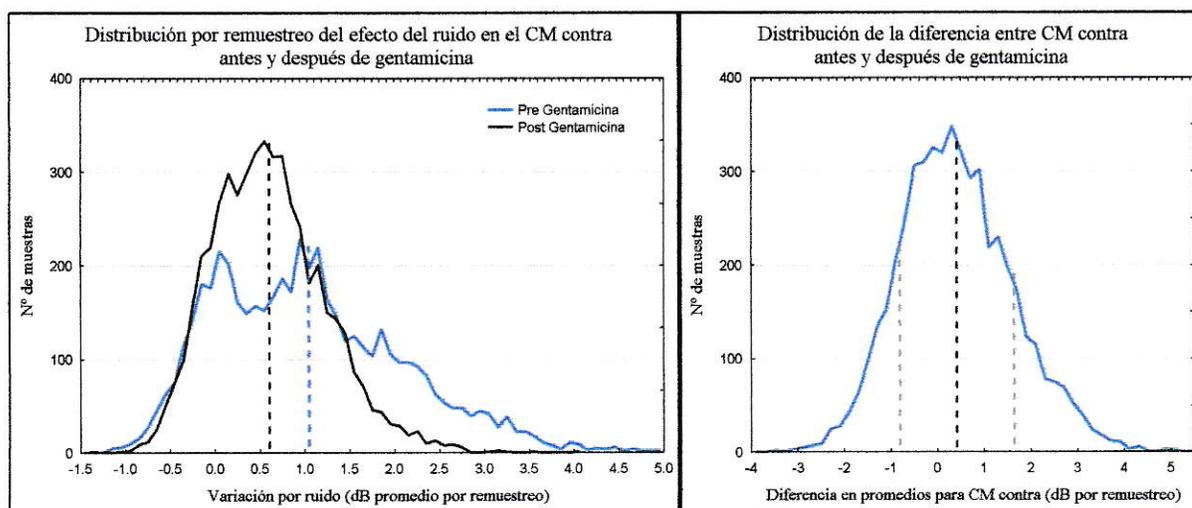


Figura 26: A la izquierda se muestra la distribución por remuestreo de la variación de la amplitud del CM contralateral por efecto de la presentación de ruido antes (azul) y después (negro) de la administración de gentamicina, con un promedio de 1,0 dB (DS 1,1) y 0,6 dB (DS 0,6), respectivamente. El bloqueo por gentamicina no provocó diferencia en el promedio de estas distribuciones (0,4 dB DS 1,2, panel de la derecha), si no que suprimió el leve componente de aumento.

V.II.2.4. CAP contralateral

Similar a los resultados del CM contralateral, la administración de gentamicina provocó tanto aumento como disminución de las respuestas posteriores a la presentación de ruido en el CAP contralateral. La figura 27 muestra 4 casos del efecto de la presentación de ruido y de la gentamicina en la amplitud del CAP contralateral. El tiempo inmediatamente después del ruido ($t=0$) se muestra con una flecha pre y post gentamicina y se comparó con la amplitud promedio, previa al ruido. En el caso a) pre gentamicina el ruido provocó un aumento de 5,8 dB y post gentamicina una disminución de 2,9 dB, mientras que en el mismo animal a 30 dB de atenuación (caso b), pre gentamicina el ruido provocó una disminución de 0,3 dB y post gentamicina una disminución mayor de 2,5 dB. En el caso c) pre gentamicina el efecto del ruido fue una disminución de 1,0 dB y post gentamicina de 0,3 dB. En el caso d) pre gentamicina hubo un aumento de 0,7 dB y post gentamicina un aumento de 0,5 dB.

El efecto del ruido en toda la muestra se presenta en la figura 28, donde se puede apreciar los distintos tipos de efectos pre y post gentamicina. Efectos de aumento pre gentamicina provocaron tanto aumento como disminución post gentamicina y un comportamiento similar se observó para disminuciones pre gentamicina. Estos efectos no se correlacionaron con la amplitud de la respuesta ni la intensidad de estimulación.

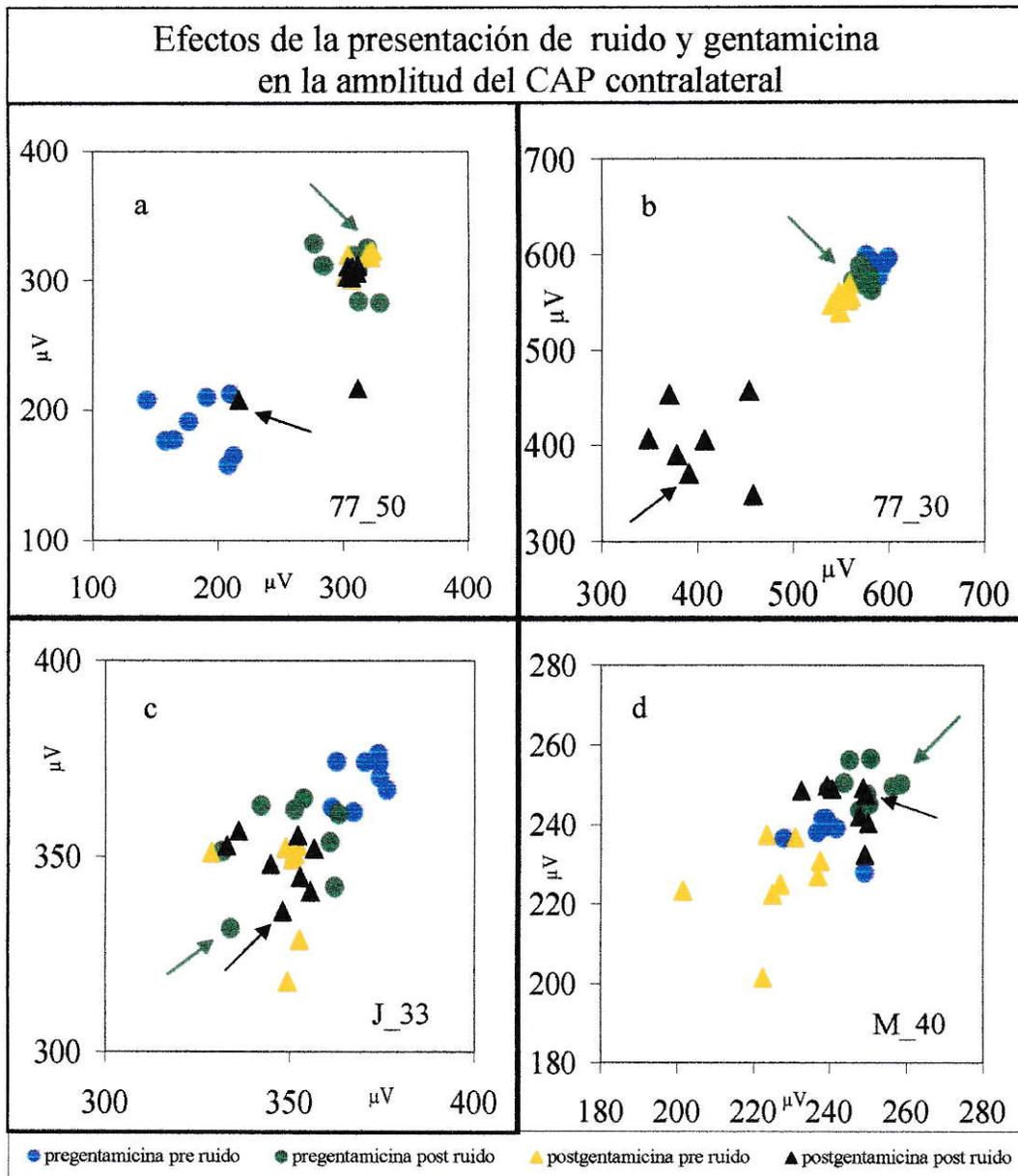


Figura 27: Efecto de la presentación de ruido y gentamicina en la amplitud del CAP contralateral. Se muestra la amplitud de la respuesta para 4 casos con efectos de ruido diferentes. Pregentamicina pre ruido en círculos azules, pregentamicina post ruido en círculos verdes, postgentamicina pre ruido con triángulos amarillos y postgentamicina post ruido con triángulos negros.

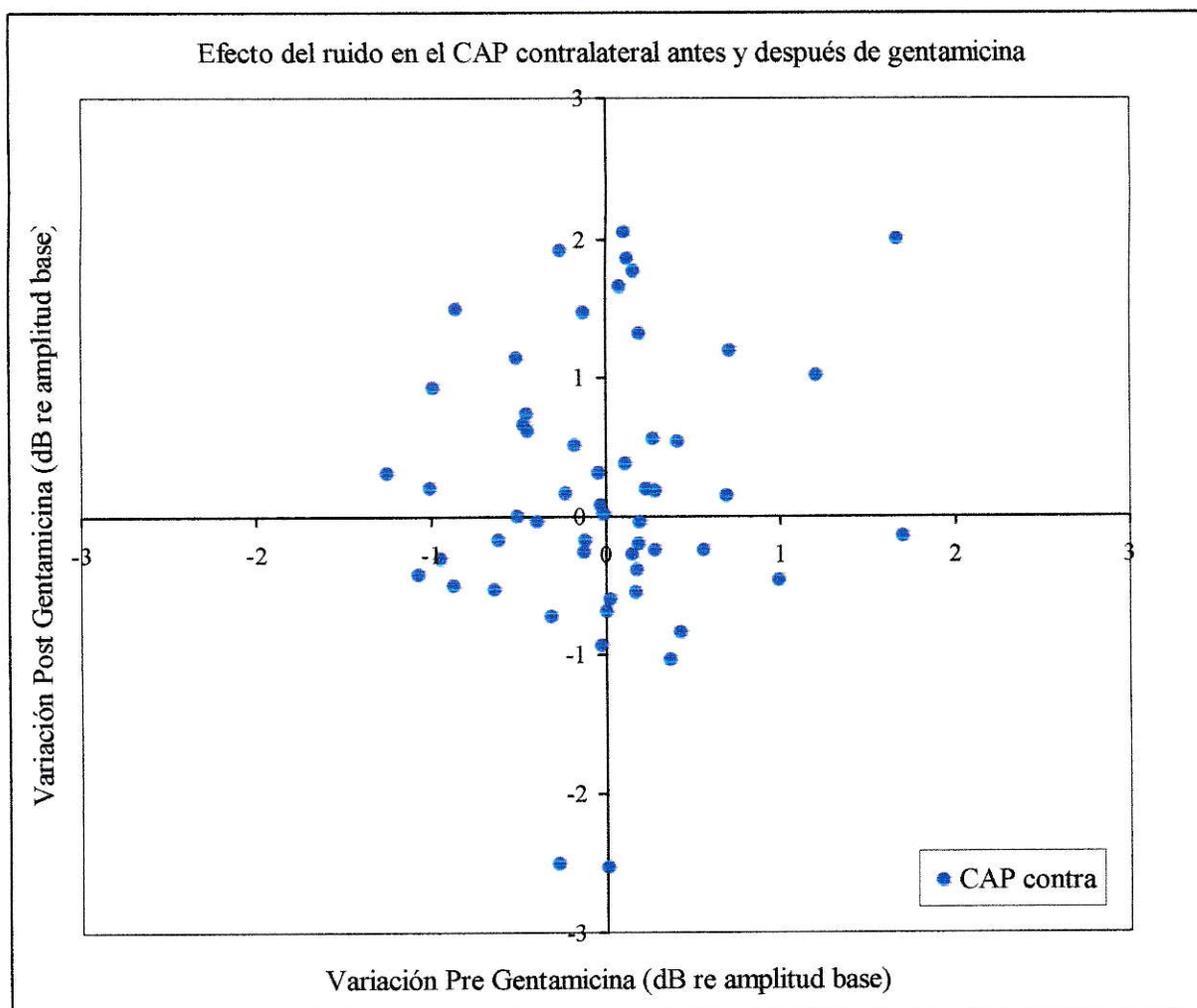


Figura 28: Variación de la amplitud del CAP contralateral por efecto del ruido (dB referido a amplitud base) antes y después de gentamicina (n=21). Se muestran los datos a $t=0, 1'$ y $2'$ posteriores al ruido, los valores positivos representan un aumento y los negativos una disminución. Tanto pre como post gentamicina se observa un efecto de aumento o disminución por ruido, sin un patrón constante.

En la distribución por remuestreo de la variación en la amplitud del CAP contralateral por efecto del ruido, se obtuvo un promedio de 0,3 dB (DS 0,3, $p<0,05$) y 0 dB (DS 0,2, $p<0,05$) antes y después de gentamicina, respectivamente. Considerando los intervalos de confianza, que se muestran en el panel de la izquierda de la figura 29, las

diferencias entre ambas distribuciones no fue significativa (95% de confianza). Al construir la distribución de la diferencia entre los promedios por remuestreo, se obtuvo un promedio de 0,3 dB (DS 0,4, $p < 0,05$), que no permite diferenciar las respuestas antes y después de gentamicina, por lo tanto, en base a estos resultados la modulación del sistema eferente olivococlear medial en el CAP contralateral posterior a la presentación de ruido no es estadísticamente significativa (fig. 29, derecha).

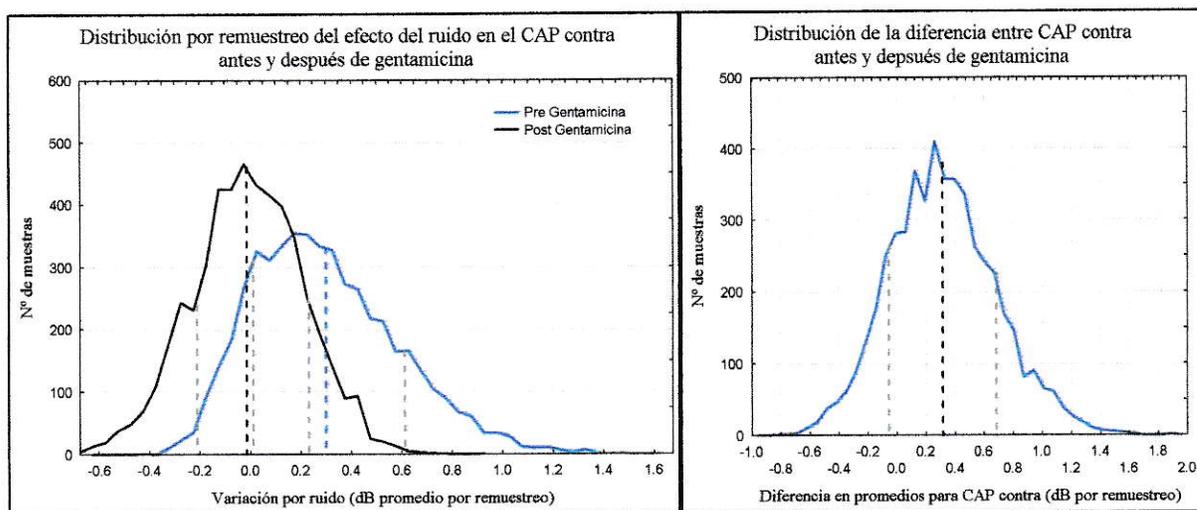


Figura 29: A la izquierda se muestra la distribución por remuestreo de la variación en la amplitud del CAP contralateral por efecto de la presentación de ruido, antes (azul) y después (negro) de la administración de gentamicina, con un promedio de 0,3 dB (DS 0,3) y 0 dB (DS 0,2), respectivamente y una diferencia promedio de 0,3 dB (DS 0,4, panel de la derecha). Considerando los intervalos de confianza (líneas grises segmentadas) no se observaron diferencias estadísticamente significativas antes y después de gentamicina.

V.III Efecto de la administración de gentamicina en la amplitud de las respuestas del CAP y CM.

Para analizar el efecto de la gentamicina sobre la amplitud de las respuestas, se cuantificó la diferencia en dB entre la amplitud de las respuestas iniciales, pregentamicina antes del ruido con la amplitud 3 a 5 hrs postgentamicina antes del ruido, para el CM y CAP ipsi y contralateral. Se clasificó en efectos de disminución menores a 1,5 dB, entre 1,5 y 2,5 dB, mayores a 2,5 dB y efectos de aumento de la amplitud. Para el CM se incluyeron sólo aquellas respuestas con potencias mayores a $100 \mu V^2$, que se encuentran por sobre el ruido del registro. Los efectos de aumento de la amplitud fueron entre 0,4 y 1,5 dB para el CAP ipsi y contralateral; y entre 0,3 y 2,7 dB para el CM ipsi y contralateral.

La Tabla 2 muestra la disminución o aumento de las respuestas en el total de 82 registros. Para el CM ipsilateral (n=25) en el 17 % del total de casos la administración de gentamicina provocó una disminución de la potencia de la respuesta mayor a 2,5 dB. Para el CAP ipsilateral (n=27) en el 15 % del total de casos se observó una disminución de la amplitud menor a 1,5 dB y el 10 % una disminución entre 1,5 y 2,5 dB. Del total de casos, el CM contralateral (n=12) presentó el 10 % con aumento de la potencia, mientras que el CAP contralateral (n=18) presentó el 12 % de casos con disminución menor a 1,5 dB.

En las diferentes sesiones experimentales, la recolocación del molde con el tubo de estimulación en el conducto auditivo externo del animal, provocó una variabilidad en la intensidad de estimulación de 1,3 dB máximo (ítem V.IV). Además, durante una misma

sesión experimental, existió una diferencia en la amplitud de la respuesta inicial (10 a 20 primeros minutos de registro) de entre 0,05 a 2,5 dB, con un promedio de 1,5 dB, para el CM y CAP. De acuerdo a esto, las disminuciones y los aumentos de amplitud menores a 1,5 dB se pueden atribuir a la variabilidad antes mencionada y no a un efecto ototóxico de la gentamicina.

La figura 30 muestra el efecto de la gentamicina en porcentaje de casos para CM y CAP ipsi y contralateral, según la clasificación descrita anteriormente. Las respuestas ipsilaterales fueron más afectadas, el 60% de CM y el 41% CAP disminuyó su amplitud en más de 1,5 dB, lo que hace sospechar que la gentamicina provoca un daño ototóxico que se potencia con la exposición al ruido. En el oído contralateral, no expuesto a ruido, el CM presentó una disminución de la amplitud mayor a 1,5 dB en el 25 % de los casos y el CAP en el 12%. Tanto en las respuestas ipsi como en las contralaterales, el CM fue más afectado que el CAP.

TABLA 2: Disminución de la amplitud del CM y CAP ipsi y contralateral por efecto de la administración de gentamicina.

	%	%	%	%	%
	CM Ipsi	CAP Ipsi	CM Contra	CAP Contra	Total
< -1,5 dB	5	15	1	12	33
-1,5 a -2,5 dB	1	10	0	1	12
> -2,5	17	4	4	1	26
Aumento	7	5	10	7	29

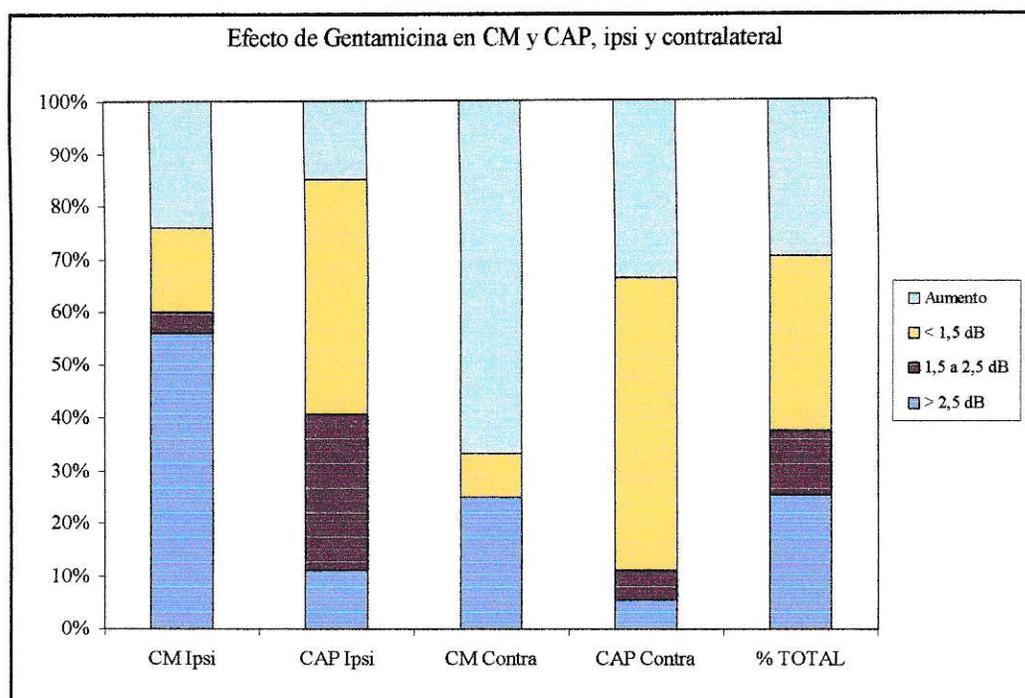


Figura 30: Efecto de la gentamicina en el CM y CAP ipsi y contralateral, expresado en porcentaje de casos que presentaron una disminución de la amplitud menor a 1,5 dB (amarillo), entre 1,5 y 2,5 dB (burdeo), mayor a 2,5 dB (celeste) y aumento de la amplitud (verde). La gentamicina afectó mayormente las respuestas ipsilaterales.

Los efectos descritos para el CM y CAP se pueden explicar por un posible efecto ototóxico de la gentamicina sobre la cóclea. Además, es posible que el sistema eferente olivococlear medial presente una activación tónica que module la actividad coclear y la gentamicina bloquee esta descarga, disminuyendo o aumentando la amplitud de las respuestas basales.

V.IV Control de las variaciones en la intensidad de estimulación a nivel del conducto auditivo externo.

Para obtener todos los registros antes descritos, en animal despierto, es necesario colocar al animal repetidas veces en el restrictor y volver a colocar los moldes en el pabellón auricular. Con el objetivo de medir las variaciones en la intensidad de estimulación debido a esta metodología, en un animal, se realizó un implante donde se dejó colocado un tubo a nivel de la bula y posteriormente se realizaron mediciones con un micrófono inserto en este tubo.

Se realizaron mediciones en 4 repetitivas colocaciones del molde auditivo, durante 6 minutos cada una, presentando un tono en el oído ipsilateral al micrófono. Se encontró una diferencia máxima de 1,3 dB en el total de las mediciones.

VI CONCLUSIONES

En chinchilla, la exposición a un ruido de alta intensidad en un solo oído durante 30 s provoca una disminución de las amplitudes del potencial de acción compuesto del nervio auditivo y del potencial microfónico coclear en el oído expuesto de 1,9 dB (DS 0,25) y de 4,3 dB (DS 0,6), respectivamente. La administración de una dosis única de gentamicina bloquea parcialmente el efecto del ruido sobre estos potenciales, disminuyendo el efecto promedio en 0,7 dB (DS 0,3) para el CAP y en 1 dB (DS 0,7) para el CM. En la mitad de los casos se observó una mayor actividad del MOC, que se evidenció en aquellos casos con efectos de ruido mayores a 1,5 dB para el CAP y 5 dB para el CM, donde el bloqueo por gentamicina provocó una disminución del efecto del ruido en 1,4 dB para el CAP y 3,6 dB para el CM.

En el CM contralateral al ruido, pre gentamicina se observaron efectos de aumento y disminución de la respuesta, pero ambos de baja magnitud. El bloqueo por gentamicina eliminó el componente de aumento, sin modificar el promedio del efecto. Estos resultados hacen sospechar de la presencia de dos efectos simultáneos donde el MOC está provocando un leve aumento del CM, que depende probablemente de la intensidad de estimulación. Para el CAP la presentación de ruido provocó un leve aumento (0,3 dB) en la amplitud de las respuestas, que no se modificó significativamente con la administración de gentamicina, lo que permite concluir que no existe una participación significativa del MOC en este efecto.

Estos resultados permiten concluir que el sistema eferente olivococlear medial se activa con la presentación de ruido unilateral de alta intensidad, provocando una disminución de la respuesta de la cóclea y del nervio auditivo ipsilateral, y un leve aumento de la respuesta a nivel de la cóclea contralateral.

La figura 31 muestra un esquema de la vía de activación del MOC. El ruido se presenta en la cóclea ipsilateral estimulando la vía aferente (flechas negras) hasta el complejo olivar superior donde hace sinapsis con neuronas del MOC. En rojo se muestran las fibras del MOC que van a provocar una supresión de la actividad de la cóclea y del nervio auditivo ipsilateral y que en la chinchilla constituyen el 80 % de todas las fibras del MOC, por lo que el efecto modulador es mayor para este oído. En azul se muestran las fibras del MOC que van a provocar un leve aumento de la actividad coclear contralateral y como en la chinchilla estas fibras sólo representan el 20 % del total de fibras del MOC su efecto modulador es menor que para el oído ipsilateral.

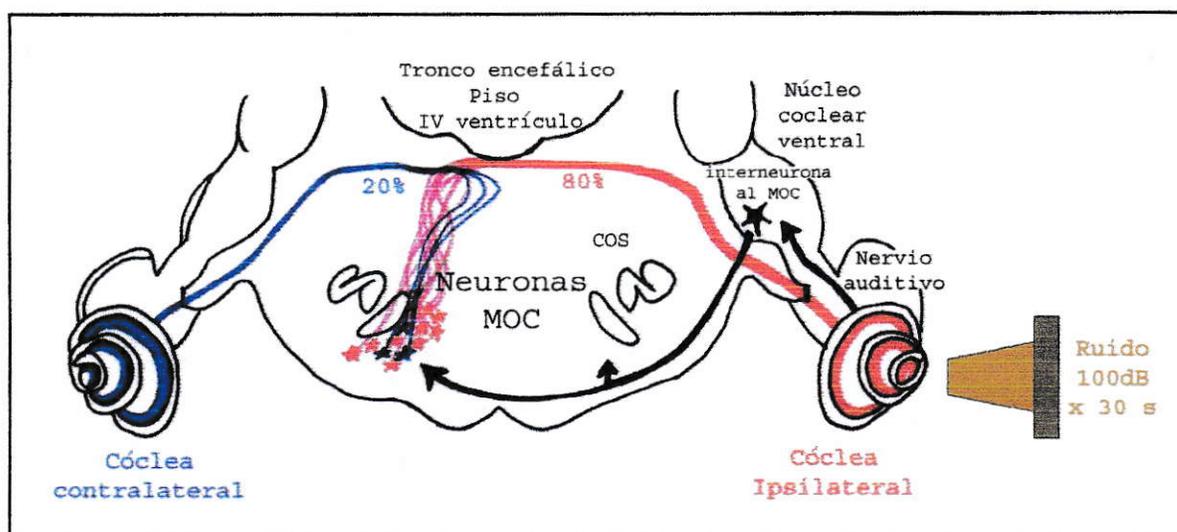


Fig. 31: Esquema de la vía de activación del sistema eferente olivococlear medial después de la presentación de ruido de alta intensidad en el oído ipsilateral. Las flechas negras muestran las fibras de la vía aferente, en rojo se muestran las fibras del MOC que modulan el oído ipsilateral y en azul las fibras del MOC que modulan el oído contralateral.

VII DISCUSIÓN

En la chinchilla el efecto de supresión por ruido para el oído ipsilateral es similar a lo descrito en seres humanos (20) donde encontraron un efecto de 1,8 dB de disminución en el registro de emisiones otoacústicas, que al igual que el CM, reflejan la actividad de la cóclea. Este efecto también sería similar a investigaciones descritas en cobayos (19). De acuerdo a los hallazgos descritos en la literatura (17, 19, 20, 32) y los de esta investigación para el oído ipsilateral, independiente del tipo de activación (acústica o eléctrica) el MOC provoca una disminución de la sensibilidad de la cóclea y del nervio auditivo.

Además, en la mitad de los casos para los CAP y CM ipsilaterales al ruido se observó un mayor efecto supresor del MOC, lo que sugiere una mayor activación de este. Es posible plantear que el MOC disminuye la sensibilidad de la cóclea y del nervio auditivo para protegerlo de la exposición a un ruido de alta intensidad.

En el caso del oído contralateral el efecto bipolar, de aumento y disminución posterior a la presentación del ruido no se correlacionó significativamente ni con la amplitud de las respuestas, ni con la intensidad de estimulación, a pesar de mostrar una tendencia a agruparse según la intensidad de estimulación mayor o menor a 25 dB SL. Para CM pre gentamicina con intensidades mayores a 25 dB SL se observó un efecto de ruido que en promedio aumentó la amplitud de las respuestas y para intensidades menores a 25 dB SL el efecto fue de disminución, post gentamicina estos efectos se invirtieron en cada grupo. Para el CAP también se observó un efecto bipolar de menor magnitud. A pesar de

que estos resultados no son concluyentes, es muy relevante describirlos e intentar establecer un patrón de respuesta, ya que este fenómeno podría indicar la presencia de 2 poblaciones neuronales activándose simultáneamente, una que produce una disminución de la sensibilidad de la cóclea y una que provoca un aumento. La literatura describe cambios bipolares en emisiones otoacústicas por producto de distorsión (17) donde al modificar la intensidad de uno de los 2 tonos que generan el producto de distorsión se observan disminuciones o aumentos de la amplitud de la emisión. James y cols (14) estudió el efecto de supresión contralateral de las emisiones otoacústicas por producto de distorsión en chinchilla y en humanos y mencionan que en varios casos observaron aumento más que supresión, pero no fueron consistentes, por lo que no tabularon estos resultados. De acuerdo a estos antecedentes, sería interesante estudiar este fenómeno de manera específica en futuras investigaciones.

La administración de una sola dosis de gentamicina en la chinchilla tuvo efectos no descritos anteriormente en cobayos. En 3 casos donde se administró una segunda dosis de gentamicina, un mes después de la primera dosis, el animal perdió peso paulatinamente, sin recuperarse, así es que por razones éticas se aplicó una sola dosis a los animales posteriores. Por otra parte, se observó una importante disminución de la amplitud del CM y del CAP contralateral ($>$ a 1,5 dB en el 6% del total de casos), oído que no se expuso al ruido, por lo tanto, sólo se puede explicar por la administración de gentamicina. En el oído ipsilateral, del total de casos, la disminución de la amplitud fue más frecuente, alcanzando un 18 y 14% para el CM y CAP, respectivamente, lo que hace sospechar que en la chinchilla una sola dosis gentamicina puede provocar un grado de ototoxicidad que la hace

más lábil a la exposición al ruido. En general, la chinchilla parece ser un animal de experimentación más sensible al daño por gentamicina que el cobayo.

Esta investigación espera haber contribuido a confirmar la participación activa del MOC frente al ruido de alta intensidad, modulando la actividad de ambos oídos.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Azeredo WJ, Kliment ML, Morley BJ, Relkin E, Slepecky NB, Sterns A, Warr WB, Weekly JM, Woods CI. "Olivocochlear neurons in the chinchilla: a retrograde fluorescent labelling study". *Hear. Res.* 134(1999)57-70
2. Blanchet C, Eróstegui C, Sugawara M, Dulon D. "Gentamicin blocks Ach-evoked K⁺ current in guinea-pig outer hair cells by impairing Ca²⁺ entry at the cholinergic receptor". *J. Physiol.* 525.3(2000):641-654
3. Brown MC, de Venecia RK, Guinan JJ Jr. "Responses of medial olivocochlear neurons. Specifying the central pathways of the medial olivocochlear reflex". *Exp Brain Res.* 2003 Dec;153(4):491-8
4. Chan DK, Hudspeth AJ. "Ca²⁺ current-driven nonlinear amplification by the mammalian cochlea in vitro". *Nat. Neurosci.* 8(2005)149-155
5. Chertoff ME, Amani-Taleshi DA, Guo Y, Burkard R. "The influence of inner hair cell loss on the instantaneous frequency of the cochlear microphonic". *Hear. Res.* 174(2002)93-100
6. Cooper NP, Yates GK. "Nonlinear input-output functions derived from the responses of guinea-pig cochlear nerve fibres: variations with characteristic frequency". *Hear. Res.* 78(1994)221-234
7. Cooper NP, Guinan Jr JJ. "Separate mechanical processes underlie fast and slow effects of medial olivocochlear efferent activity". *J. Physiol*(2003), 548.1:307-312
8. Fex J. "Augmentation of cochlear microphonic by stimulation of efferent fibres to the cochlea". *Acta oto-laryngol.* 50 (1962):540-541
9. Galambos, R. "Supresión of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea". *J. Neurophysiol.* 19(1956):424
10. Guinan JJ Jr (1996). The physiology of olivocochlear efferents. In: Dallos P, Popper AN, Fay RR (eds) *The cochlea*. Springer, New York, pp 435–502
11. Hashino E, Shero M. "Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells". *Brain. Res.* 704(1995)135-140
12. Heffner RS, Heffner HE. "Behavioral hearing range of the chinchilla". *Hear. Res.* 52(1991)13-16
13. Hood LJ, Berlin CI, Hurley A, Cecola P, Bell B. "Contralateral suppression of transient-evoked otoacoustic emissions in humans: intensity effects". *Hear. Res.* 101(1996)113-118
14. James A, Harrison R, Pienkowski M, Dajani H, Mount R. "Dynamics of real time DPOAE contralateral suppression in chinchillas and humans". *Int. J. Aud.* 44(2005)118-129
15. Liberman MC, Gao J, He DZZ, Wu X, Jia S, Zuo J. "Prestine is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier". *Nature.* 419(2002)300-304
16. Lima da Costa D, Chibois A, Erre JP, Blanchet C, Charlet de Sauvage R, Aran JM. "Fast, Slow, and Steady-State effects of contralateral acoustic activation of the medial olivocochlear efferent system in awake guinea pigs: action of gentamicin". *J. Neurophysiol.* 78(1997)1826-1836

17. Müller J, Janssen T, Heppelmann G, Wagner W. "Evidence for a bipolar change in distortion product otoacoustic emissions during contralateral acoustic stimulation in humans". *J. Acoust. Soc. Am.* 118(6)(2005):3747-3756
18. Nagai J, Takano M. "Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity". *Drug. Metab. Pharmacokin.* 19.3(2004):159-170
19. Pedemonte M, Drexler DG, Vellutti RA. "Cochlear microphonic changes after noise exposure and gentamicin administration during sleep and waking". *Hear. Res.* 2004 Aug;194(1-2):25-30
20. Philibert B, Veuillet E, Collet L. "Functional asymmetries of crossed and uncrossed medial olivocochlear efferent pathways in humans". *Neuroscience Letters* 253(1996)99-102
21. Pickles JO. III. The Cochlea. En "An introduction to the physiology of hearing". Academic Press, 1982(24-70).
22. Pickles JO. VIII. The Centrifugal pathway. En "An introduction to the physiology of hearing". Academic Press, 1982(228-250)
23. Rajan R. Ch.14 Efferent and priming modulation of noise-induced hearing loss. En "Scientific basis of noise-induced hearing loss". Thieme, New York, 1996 (159-171)
24. Robles L, Ruggero M.A. "Mechanics of the mammalian cochlea". *Physiol. Rev.* 81(2001)1305-1352
25. Ruggero MA, Rich NC, Robles L, Recio A. Ch.2 The effects of acoustic trauma, other cochlear injury, and death on basilar-membrane responses to sound. En "Scientific basis of noise-induced hearing loss". Thieme, New York, 1996 (23-29)
26. Sánchez-González MA, Warr cWB, López DE. "Anatomy of olivocochlear neurons in the hamster studied with FluoroGold". *Hear. Res.* 185(2003)65-76
27. Smith DW, Erre JP, Aran JM. "Rapid, reversible elimination of medial olivocochlear efferent function following single injections of gentamicin in the guinea pig". *Brain. Res.* 652(1994)243-248
28. Subramaniam M, Salvi RJ, Spongr VP, Henderson D, Powers NL. "Changes in distortion product otoacoustic emissions and outer hair cells following interrupted noise exposures". *Hear. Res.* 74(1994)204-216
29. Sutton LA, Lonsbury-Martin BL, Martin GK, Whitehead ML. "Sensitivity of distortion-product otoacoustic emissions in humans to tonal over-exposure: Time course of recovery and effects of lowering L_2 ". *Hear. Res.* 75(1994)161-174
30. Warren EH, Liberman MC. "Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I Contributions of cochlear efferents". *Hear. Res.* 37(1989)89-104
31. Withnell Robert H. "Brief report: the cochlear microphonic as an indication of outer hair cell function". *Ear. Hear.* Feb (2001):75-77
32. Yoshida N, Liberman MC, Brown MC, Sewell WF. "Gentamicin blocks both fast and slow effects of olivocochlear activation in anesthetized guinea pigs". *J. Neurophysiol.* 82(1999):3168-3174
33. Zheng J, Shen W, He DZZ, Long KV, Madison LD, Dallos P. "Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells". *Nature.* 405(2000):149-155

34. http://bcs.whfreeman.com/ips5e/content/cat_080/pdf/moore14.pdf.
 - o <http://www.whfreeman.com/ipsresample>. “Bootstrap methods and permutation test”. Hesterberg T, Moore D.S, Monaghan S, Clipson A, Epstein R.

IX ANEXO

Para el análisis estadístico de los resultados se usó la Prueba de remuestreo con recolocación, o resampling con el método de bootstrap (34). Este método permite hacer inferencias estadísticas del comportamiento de una muestra obtenida muchas veces en las mismas condiciones, sin necesitar que la muestra se distribuya de acuerdo al modelo normal y sin aplicar estadística basada en una muestra de distribución normal. En la estadística clásica se parte del supuesto que las variables estudiadas se distribuyen según la curva normal, si no es así, el tamaño de la muestra tiene que ser suficientemente grande para hacer una estimación estadística válida que represente a la población. El método de bootstrap elimina este supuesto y construye una distribución del parámetro estadístico, simulando un número elevado de muestras aleatorias obtenidas a partir directamente de los datos observados. Esto permite aplicar el método de bootstrap independiente del tamaño muestral, por lo que resulta muy útil para muestras pequeñas, como en el caso de esta investigación.

En esta prueba se realiza un muestreo aleatorio n número de veces, de una muestra de tamaño m , volviendo a incluir cada uno de los datos que componen la muestra seleccionada al azar, antes de seleccionar el siguiente dato. De esta forma cualquier dato puede ser seleccionado más de una vez o ninguna. Para cada muestreo se obtiene el valor del estadístico de interés que se almacena y se realiza un nuevo muestreo. Con los n valores del estadístico se construye una distribución y se obtienen los datos estadísticos necesarios,

como promedio e intervalos de confianza. En este trabajo se usó $n=5000$ y como parámetro estadístico el promedio (\bar{x}).

Además, para comparar las muestras pre y post gentamicina, se realizó un resampling con bootstrapping simultáneo, donde para cada muestreo se obtuvo la resta de ambos promedios, luego con este valor se construyó la distribución del promedio de la resta de ambas muestras.

Los intervalos de confianza se calcularon según:

$$\bar{X}_{boot} \pm t * SE_{boot}$$

Donde \bar{X}_{boot} es el promedio de la distribución bootstrap, t el valor de la distribución estadística t y SE_{boot} el error estándar de la distribución bootstrap.