



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA VÍA  
EFERENTE EN LA RESPUESTA COCLEAR DE LA  
CHINCHILLA

**DIEGO ENRIQUE ELGUEDA GONZÁLEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

**PROFESOR GUIA: LUIS ROBLES WOBBE**

SANTIAGO – CHILE  
2006



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



## EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LA VÍA EFERENTE EN LA RESPUESTA COCLEAR DE LA CHINCHILLA

### DIEGO ENRIQUE ELGUEDA GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: LUIS ROBLES	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: LUIS ADARO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: RIGOBERTO SOLÍS	.....	.....

SANTIAGO – CHILE  
2006

## **AGRADECIMIENTOS**

Realicé mi memoria de título en el laboratorio de Neurobiología de la Audición de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad, donde fui acogido por un excelente grupo humano. Deseo agradecer al profesor Luís Robles, por el constante apoyo que recibí de su parte bajo su tutela, su excelente disposición y la ayuda que me prestó siempre en los aspectos académicos involucrados en mi tesis y en mis proyectos personales. Así también deseo agradecer a Paul Délano, por toda la ayuda que me prestó durante el trabajo de mi memoria de título, su amistad y excelente disposición. También deseo agradecer a mis compañeros de laboratorio, Elizabeth Pavez, Carlos Hamamé y Fernando Vergara por su apoyo y amistad.

También deseo agradecer a la fundación Guillermo Puelma por el apoyo económico que recibí para presentar los datos obtenidos en esta memoria de título en el 2º Congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencia realizado en Curicó y en el XXII Congreso Latinoamericano y 1er. Ibero-americano de Ciencias Fisiológicas, realizado en Buenos Aires, Argentina.

Finalmente, deseo agradecer a mi familia, por su constante compañía y apoyo en los buenos y malos momentos.

*Dedico esta memoria de título a mis padres y hermanos.*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
1. Aspectos generales	4
2. Anatomía funcional de la cóclea	5
3. Respuesta mecánica	8
4. Transducción mecano-eléctrica	10
5. Inervación del Órgano de Corti	13
6. Sistema eferente olivo-coclear	14
7. Posible rol del sistema eferente auditivo.	19
8. La chinchilla como modelo de estudio del sistema eferente auditivo	20
<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
1. Objetivo general	22
2. Objetivos específicos	22
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
1. Lugar y período del estudio	23
2. Animales y Anestesia	23
3. Cirugía	24
4. Estimulación y registro	24
5. Protocolo experimental	28
6. Procesamiento y análisis de datos.	30
<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
1. Propiedades de las respuestas eléctricas cocleares.	31
2. Efectos eferentes en el potencial de acción compuesto del nervio auditivo.	35
2.1. <i>Dependencia de la intensidad de estimulación acústica.</i>	36
2.2. <i>Dependencia en parámetros de la estimulación eléctrica.</i>	40
2.3. <i>Efecto de la acción eferente sobre la latencia del CAP.</i>	42
3. Efectos eferentes en los potenciales microfónicos cocleares.	44
3.1. <i>Dependencia de parámetros de estímulo acústico.</i>	47

3.2.	<i>Cambios en la fase de los potenciales microfónicos cocleares.</i>	49
4.	Influencia de la integridad de los músculos del oído medio.	50
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>53</b>
1.	Comentarios Generales.	53
2.	Propiedades basales de los potenciales cocleares.	54
3.	Efectos provocados por la estimulación eferente en los potenciales cocleares.	55
4.	Efectos observados en el CAP.	56
5.	Efectos observados en los CM.	59
6.	Posible influencia de la integridad del oído medio.	63
7.	Controles efectuados.	63
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>66</b>
<b>APÉNDICE Nº 1</b>		<b>75</b>

## RESUMEN

En la cóclea de los mamíferos existen dos tipos de células receptoras, células ciliadas internas, invadidas por axones aferentes del VIII nervio craneano y células ciliadas externas, que reciben una importante inervación eferente proveniente del tronco encefálico. A pesar de la destacable presencia de fibras eferentes en la cóclea, su función en el sistema auditivo es aún desconocida. El efecto de la estimulación eléctrica de las fibras eferentes ha sido estudiado en gatos y cobayos. Sin embargo, debido a diferencias anatómicas en la distribución de las fibras eferentes cocleares en las diferentes especies, es importante evaluar este efecto en la chinchilla. Se estimularon fibras olivo-cocleares en 10 chinchillas anestesiadas, aplicando pulsos de corriente mediante un electrodo bipolar colocado en el piso del cuarto ventrículo. Se adquirió el potencial de acción compuesto del nervio auditivo (CAP) y el potencial microfónico coclear (CM) en respuesta a clics y tonos de diferentes frecuencias. La estimulación eléctrica eferente produjo reducciones en la amplitud del CAP que llegaron hasta 12 dB, las cuales fueron mayores para intensidades de sonido bajas a moderadas y también para pulsos eléctricos de mayor intensidad. Además, la estimulación eferente produjo incrementos concomitantes de amplitud de los CM, que fueron mayores para tonos de bajas frecuencias e intensidades. Los incrementos de CM ( $\leq 2,5$  dB) mostraron magnitudes menores a las reducciones de CAP. También se encontraron incrementos en la latencia del CAP que no fueron equivalentes a simples disminuciones en la intensidad de la estimulación acústica, y cambios en la fase de los CM que fueron mayores para tonos de bajas intensidades. Estos

resultados muestran las características del control eferente de la sensibilidad coclear en la chinchilla.

## **SUMMARY**

Two types of receptor cells exist in the mammalian cochlea, inner hair cells, innervated by VIII nerve afferent axons, and outer hair cells, which receive an important efferent innervation from the brainstem. In spite of this remarkable presence of efferent fibers in the cochlea, their function in the auditory system remains unknown. The effect of electrical stimulation of efferent fibers has been studied in cat and guinea pig. However, due to anatomical differences in the distribution of cochlear efferent fibers in the different species, it is important to evaluate this effect in the chinchilla. We stimulated olivocochlear fibers in 10 anesthetized chinchillas, applying current pulses through a bipolar electrode placed on the fourth-ventricle floor. Auditory-nerve compound action potential (CAP) and cochlear microphonic potential (CM) were acquired in response to clicks and tones of different frequencies. Electrical efferent stimulation produced CAP-amplitude reductions, reaching up to 12 dB, which were higher for low to moderate sound levels and were also higher for larger current pulses. In addition, efferent stimulation produced concomitant CM amplitude increments, which were greater for tones of low frequencies and low levels. The CM increments ( $\leq 2.5$  dB) were of smaller magnitude than the CAP reductions. We also found CAP-latency increments that were not equivalent to simple decreases in sound level and CM-phase changes that were larger at low intensity tones. These results show the characteristics of the efferent control of cochlear sensitivity in the chinchilla.

## INTRODUCCIÓN

Los animales reciben información acerca del medio que los rodea mediante sus sistemas sensoriales, que son componentes del sistema nervioso especializados en la detección de estímulos físicos y en el procesamiento de la información que ellos contienen, para así darnos la capacidad de responder a los estímulos del entorno y comunicarnos con otros seres vivos. El sistema auditivo nos permite percibir y analizar las vibraciones mecánicas que se propagan por el medio, las que constituyen los sonidos. El órgano receptor de los estímulos auditivos es la cóclea. En ella se lleva a efecto la transducción mecano-eléctrica que convierte las vibraciones mecánicas de los estímulos acústicos en potenciales de acción que viajarán por las fibras aferentes del nervio auditivo hacia el sistema nervioso central. Desde hace años se ha acumulado evidencia anatómica de una importante inervación eferente que sinapta con las células receptoras de la cóclea, lo que sugiere que el sistema nervioso central puede modular la función coclear. La función de este sistema eferente auditivo es aún bastante desconocida y controversial. Una de las formas que se han utilizado para estudiar la función de estas fibras ha sido mediante la aplicación de pulsos eléctricos en el punto en que cruzan la línea media del piso del cuarto ventrículo, lo que se ha realizado casi exclusivamente en gatos y cobayos. Por ello, pese al amplio uso de la chinchilla como modelo experimental en estudios fisiológicos y psicofísicos de audición, el comportamiento de la función del sistema eferente auditivo es prácticamente desconocido en esta especie. Este estudio pretende analizar la influencia de la

estimulación eléctrica de las neuronas eferentes en las respuestas electrofisiológicas de la cóclea de la chinchilla.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Aspectos generales

La percepción auditiva es parte fundamental de la relación que tienen los animales con el ambiente y otros seres vivos, ya que permite que el sistema nervioso reciba información referente a las vibraciones mecánicas que se propagan en el entorno, para procesar respuestas ante estímulos de importancia biológica.

Los órganos que forman la vía auditiva comprenden un receptor periférico (oído), en donde las vibraciones mecánicas son transformadas a impulsos eléctricos y son transmitidos por vías nerviosas que, pasando por diferentes núcleos en el tronco encefálico, llegan hasta la corteza cerebral auditiva, en donde se lleva a efecto la percepción auditiva.

El sistema auditivo periférico ha sido dividido en tres partes funcionales; oído externo, medio e interno. El **oído externo** comprende la *pinna* o aurícula, una estructura cartilaginosa, prominente y cubierta de piel, que actúa capturando y dirigiendo los estímulos acústicos hasta el meato auditivo externo, y éste a su vez, canaliza el estímulo acústico desde el exterior hasta la membrana timpánica o tímpano. El **oído medio** es una cavidad que contiene una cadena de tres pequeños huesos o huesecillos: martillo, yunque y estribo, encargados de transmitir las vibraciones desde el tímpano hasta la ventana oval de la cóclea. En

el **oído interno** se encuentran los órganos receptores de los sentidos del equilibrio y audición, el laberinto y la cóclea, respectivamente (Hudspeth, 2000).

## 2. Anatomía funcional de la cóclea

La **cóclea** está notablemente adaptada para detectar las vibraciones mecánicas que dan origen al sonido. Consiste en tres tubos membranosos adyacentes, llamados rampas, enrollados en la forma de un caracol (de ahí su nombre, proveniente del griego *kochlos*), rodeados por una cubierta ósea, la cápsula ótica (Robles y Ruggero, 2001). En la base de esta cubierta ligeramente cónica se encuentran dos aperturas o ventanas; la **ventana redonda**, que se encuentra cubierta por una membrana, y la **ventana oval**, sobre la que se apoya la base del estribo, el huesecillo más interno del oído medio.

De los tres tubos que componen la cóclea, las rampas timpánica y vestibular están llenas de un fluido con características de composición iónica muy similares al fluido cerebroespinal, la **perilinfa**. Entre estas dos rampas se encuentra la rampa media, la que se encuentra separada de la rampa vestibular por la membrana de Reissner y de la rampa timpánica por la **membrana basilar**. En el interior de la rampa media se encuentra la **endolinfa**, un fluido que posee una composición iónica similar al medio intracelular, o sea una alta concentración de potasio. Por otra parte, la endolinfa de la rampa media se encuentra a un potencial eléctrico positivo (~ +80 mV) con respecto de las rampas timpánica y vestibular, conocido como **potencial endococlear** (Hudspeth, 2000).

En el extremo apical de la cóclea las rampas timpánica y vestibular se encuentran unidas a través de una comunicación llamada **helicotrema**, que ecualiza las

presiones en las dos rampas para bajas frecuencias.

Dentro de la rampa media, sobre la membrana basilar, yace el **órgano de Corti**, una estructura que, además de otras células, contiene a las células ciliadas, responsables de la transducción mecano-eléctrica. Por sus diferencias anatómicas y funcionales, las células ciliadas se clasifican en **células ciliadas internas (CCI)** y **células ciliadas externas (CCE)**.

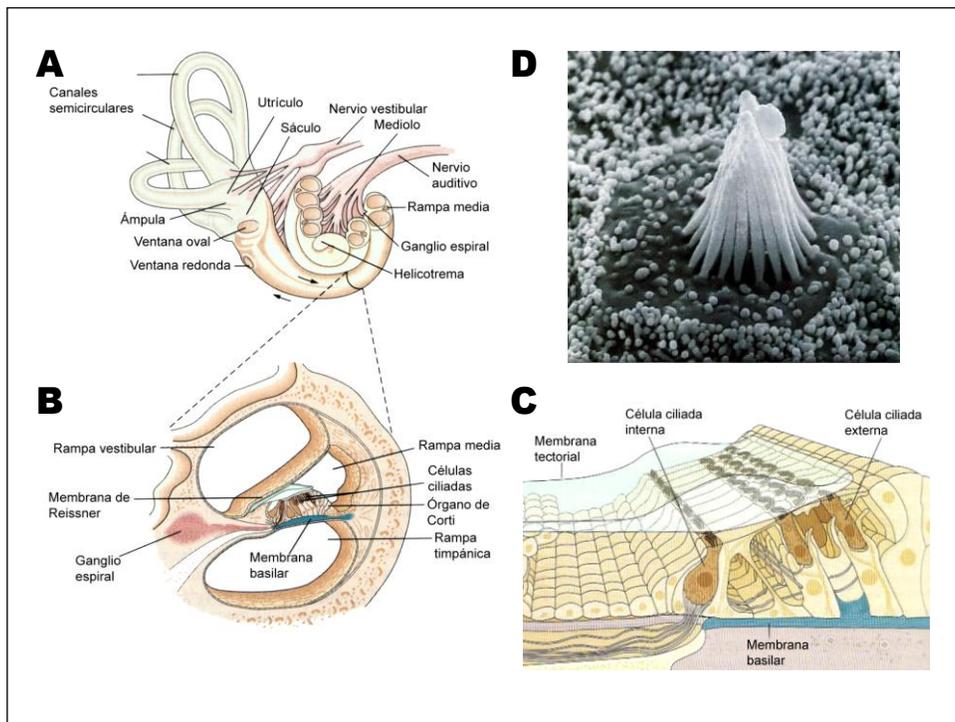
Las CCI forman una fila a lo largo del órgano de Corti de alrededor de 3500 células. Más alejadas del eje del espiral coclear, se encuentran 3 ó 4 filas de aproximadamente 12000 CCE (Hudspeth, 2000).

Las células ciliadas poseen en su ápice un conjunto de **estereocilios**, que se diferencian de los cilios verdaderos en que carecen de un sistema de microtúbulos. Poseen, en cambio, un citoesqueleto de actina que les da rigidez y un estrechamiento sobre su inserción en la membrana apical de la célula ciliada que funciona como una bisagra, sobre la cual el estereocilio puede flectarse. Durante el desarrollo está presente un solo cilio verdadero, de función aún desconocida, llamado **cinocilio**, de mayor altura que el conjunto de estereocilios y que, en mamíferos, desaparece poco después del nacimiento.

Los estereocilios se encuentran ordenados de menor a mayor altura a medida que se acercan al cinocilio y se alejan del eje coclear, por lo que el conjunto de estereocilios de una célula ciliada se observa como una estructura en bisel, similar a la punta de una aguja hipodérmica. Así, se forma un plano de simetría que corre a lo largo del cinocilio. El desplazamiento del conjunto de estereocilios en dirección al estereocilio más alto provoca la despolarización de la célula, por el contrario, el desplazamiento en dirección al estereocilio de menor altura

hiperpolariza la célula. Los desplazamientos en dirección perpendicular a este plano de simetría no provocan cambios en el potencial de receptor de la célula.

Sobre el órgano de Corti se encuentra la **membrana tectorial**, la cual está adherida sólo a los estereocilios de mayor tamaño de las CCE. Esta membrana cobra especial importancia en el proceso de transducción mecano-eléctrica, pues participa en la deflexión del conjunto de estereocilios.



**Figura 1. A:** Composición del oído interno. **B:** Corte a través de una de las vueltas de la cóclea, en que se pueden apreciar las 3 rampas que la forman. **C:** Estructura del órgano de Corti. **D:** Microfotografía electrónica de barrido de los estereocilios de una célula ciliada vestibular que aún conserva el cinocilio.

### 3. Respuesta mecánica

Las vibraciones mecánicas que dan origen al sonido se manifiestan como eventos de compresión y rarefacción sobre la membrana timpánica (Hudspeth, 2000). Tales eventos se propagan por la cadena de huesecillos hasta llegar a la ventana oval sobre la rampa vestibular de la cóclea, donde la base del estribo ejerce una acción de pistón que provoca cambios de presión entre las rampas vestibular y timpánica. Debido a esto, se provoca un desplazamiento de la membrana basilar, que se expresa como ondas que viajan desde la base al ápice de la cóclea y que crecen en amplitud hasta alcanzar un máximo y luego decrecer abruptamente. El sitio de la membrana basilar en que se alcanza la máxima amplitud de la onda viajera es función de la frecuencia del estímulo acústico, por lo que cada lugar a lo largo de la membrana basilar posee una **frecuencia característica** (Békésy, 1960, Robles y Ruggero, 2001). Así, la respuesta mecánica a estímulos de alta frecuencia será máxima más cerca de la base de la cóclea, mientras que la respuesta ante frecuencias bajas será máxima más cerca del ápice coclear. Así se da origen a un mapeo topográfico de frecuencias (es decir, una **tonotopía**) a lo largo de la membrana basilar, que establece que la cóclea actúa como un analizador de frecuencias, pues separa al estímulo acústico en sus diversos componentes espectrales, de modo similar al análisis matemático de la transformación de Fourier (Békésy, 1960; Robles y Ruggero, 2001; Délano *et al.*, 2005). Esta propiedad de tonotopía o sintonización de la respuesta mecánica coclear, se debe a las diferencias anatómicas que presenta la membrana basilar en su recorrido. En su extremo apical, la membrana basilar es más ancha y flexible, mientras que en el extremo basal es más delgada y rígida, lo que se traduce en un

importante aumento en la elasticidad de la partición coclear en su recorrido desde la base al ápice de la cóclea.

Sin embargo, la agudeza en la sintonización observada en la respuesta mecánica estaba muy por debajo de la necesaria para explicar la observada en registros del nervio auditivo y en experimentos psicofísicos (Robles, 2001). En 1971, se produjo un vuelco en el estudio de la fisiología coclear con el descubrimiento de una **no-linealidad** que modificaba la sensibilidad y sintonización de frecuencia de las vibraciones cocleares con la intensidad del estímulo y que desaparecía con la muerte del animal (Rhode, 1971; Rhode y Robles, 1974), lo que se manifiesta con aumentos en la amplitud de la respuesta mecánica ante estímulos acústicos de baja intensidad con frecuencias cercanas a la frecuencia característica. Esto, junto al descubrimiento de las **emisiones otoacústicas**, la emisión de sonidos provenientes de la cóclea que se pueden registrar como cambios de presión en el meato auditivo externo (Kemp, 1978), hizo pensar en la existencia de un mecanismo biológico activo en la cóclea, que amplificaría las vibraciones mecánicas cocleares y que explicaría la extraordinaria sensibilidad y sintonización de frecuencia en la respuesta mecánica coclear ante bajos niveles de estímulo acústico. Tal mecanismo activo es conocido hoy como **amplificador coclear**.

Actualmente está ampliamente aceptado que el principal componente de este amplificador coclear reside en las CCE, pues se ha observado en estudios *in-vitro* que éstas células presentan motilidad somática dependiente de voltaje (Brownell *et al.*, 1985). La respuesta mecánica de las CCE al voltaje es bidireccional, pues se ha comprobado que al depolarizarse las CCE acortan su longitud, mientras que al hiperpolarizarse se alargan. Se cree que estos cambios de longitud de las CCE,

proveen la energía necesaria para cambiar la amplitud de los desplazamientos de la membrana basilar, y así explicar la gran sensibilidad y sintonización de la respuesta coclear, aunque no está aún claro como los movimientos de las CCE potenciarían los desplazamientos de la membrana basilar (Hudspeth, 2000; Robles y Ruggero, 2001).

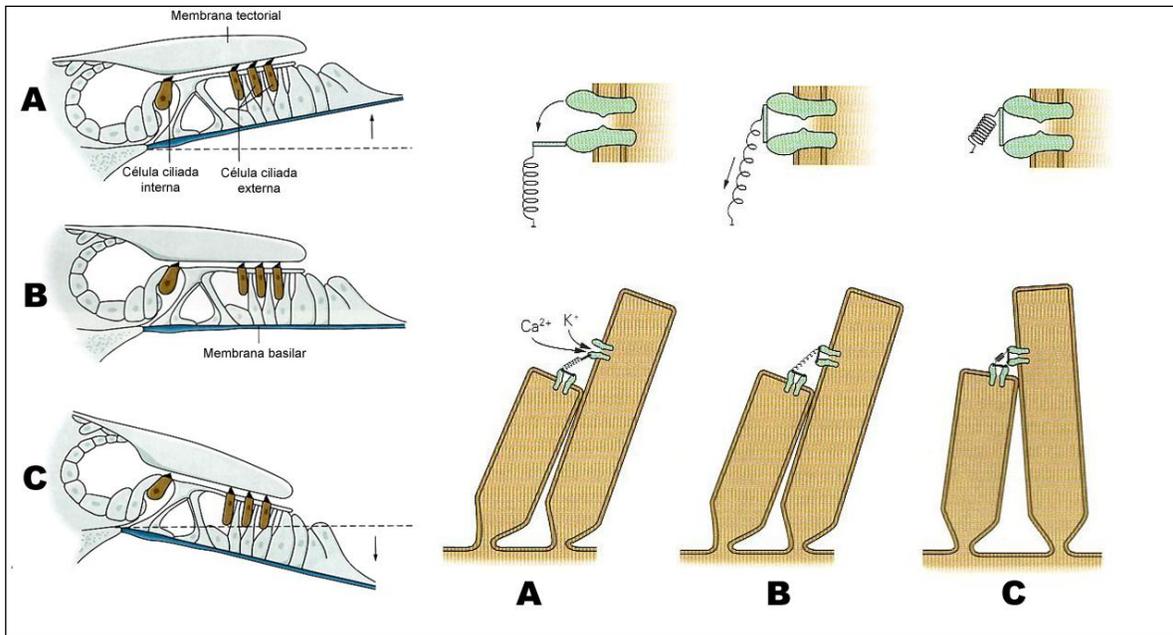
Se ha demostrado que el motor molecular de estas células reside en una proteína llamada **prestina** (Zheng J. *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001). Esta proteína transmembrana, perteneciente a la familia de transportadores sulfato/anión, se encuentra en forma abundante en la membrana latero-basal de las CCE. En una línea de ratón mutante que no expresan prestina se observó que, *in-vivo*, los animales muestran una pérdida de sensibilidad coclear de 40-60 dB y que sus CCE, *in-vitro*, carecen de electromotilidad (Liberman *et al.*, 2002).

#### **4. Transducción mecano-eléctrica**

Estudios *in-vitro* han permitido observar que las células ciliadas expresan una respuesta eléctrica (potencial de receptor) cuando el conjunto de estereocilios es desplazado, ya que poseen canales de transducción sensibles a estímulos mecánicos. En una célula ciliada en estado de reposo, aproximadamente el 15% de los canales de transducción se encuentran abiertos, lo que determina un potencial de reposo cercano a -60 mV (Hudspeth, 2000).

Los desplazamientos de la membrana basilar y la geometría de la partición coclear favorecen un movimiento radial de la membrana tectorial por sobre el órgano de Corti, lo que propicia el movimiento de los estereocilios de las células ciliadas

(Figura 2). Un estímulo positivo, que desplaza al conjunto de estereocilios en dirección al estereocilio mayor, provoca la apertura de un número mayor de canales de transducción, lo que resulta en un influjo de cationes que despolariza a la célula. Por el contrario, un estímulo negativo, que desplaza al conjunto de estereocilios en dirección al estereocilio de menor altura, cierra los canales de transducción que en reposo permanecen abiertos, hiperpolarizando a la célula. Así, las células ciliadas son capaces de generar un potencial de receptor, que se expresa como un potencial alterno con frecuencia igual a la del estímulo acústico, por lo que el registro de estos potenciales muestra un comportamiento similar al de un micrófono. Debido a esto, se han llamado **potenciales microfónicos cocleares** a aquellos formados por potenciales de receptor de las células ciliadas que se propagan por la cóclea y que son obtenidos al registrar con un electrodo en la ventana redonda.



**Figura 2.** Movimiento radial de la membrana tectorial sobre el órgano de Corti favorece la apertura y cierre de canales de transducción en los estereocilios de las células ciliadas. (Modificado de Hudspeth, 2000).

Las células ciliadas pueden convertir los desplazamientos del conjunto de estereocilios en potenciales eléctricos tan sólo en 10  $\mu$ s; tal velocidad de respuesta es necesaria para la transducción de estímulos de altas frecuencias (hasta 20 KHz en humanos, en otros animales hasta 100 KHz) y para la localización de fuentes de sonido. Esta velocidad de respuesta tan alta descarta la mediación de segundos mensajeros (como ocurre por ejemplo en la transducción olfatoria y visual), que es relativamente lenta; y supone la activación directa de los canales de transducción mediante una puerta mecánica.

La microscopía electrónica ha revelado la existencia de estructuras filamentosas que conectan las puntas de dos estereocilios adyacentes. Estas estructuras son conocidas como **tip-links** (uniones de las puntas), y se ha demostrado que juegan un papel esencial en la generación de potenciales eléctricos en las células ciliadas. Los **tip-links** aumentarían su tensión ante un estímulo positivo, la cual se

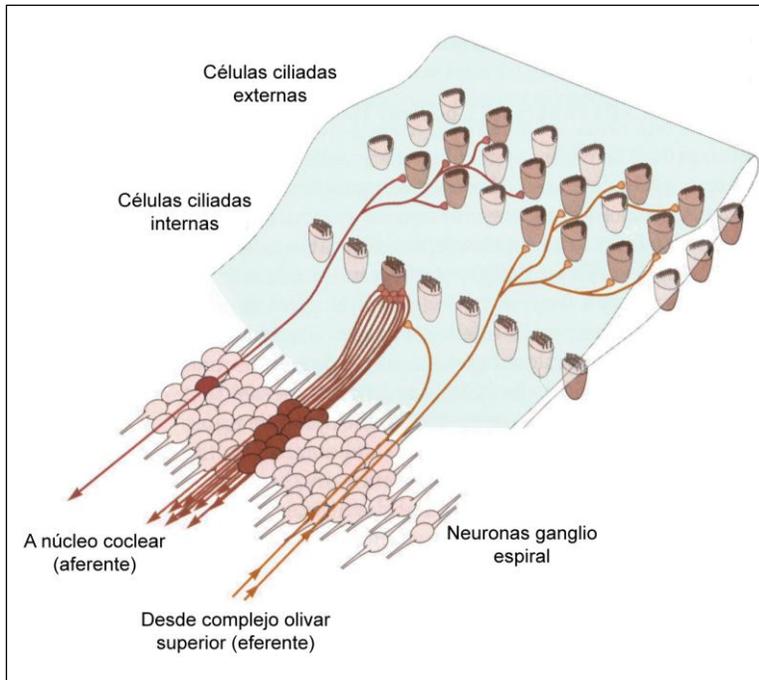
traspasa a canales de transducción especializados en sus extremos, aumentando así la probabilidad de abrir canales de transducción (figura 2). Por el contrario, ante un estímulo negativo, el *tip-link* recibe una menor tensión, aumentando la cantidad de canales de transducción cerrados. (Hudspeth, 2000). La naturaleza molecular de los canales de transducción mecanoeléctrica y del *tip-link* es aún poco conocida. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que el principal componente del *tip-link* correspondería a la cadherina-23 (Siemens *et al.*, 2004; Söllner *et al.*, 2004; Corey y Sotomayor, 2004).

## 5. Inervación del Órgano de Corti

Las CCI y CCE, además de sus diferencias anatómicas, presentan diferencias en la inervación. Cada CCI está inervada en forma directa por 10 a 30 axones aferentes (Sewell, 1996) provenientes de neuronas cuyos somas se encuentran en el llamado **ganglio espiral**, el cual forma parte de la porción coclear del VIII par craneano (vestibulococlear), el nervio auditivo. Muy pocas neuronas del ganglio espiral inervan a las CCE, por medio de terminales que se ramifican hacia numerosas CCE (Spendlin, 1974). En otras palabras, por lo menos el 90% de las neuronas del ganglio espiral proyectan sus aferencias hacia CCI (sólo alrededor de un 25% de las células receptoras del órgano de Corti), lo que establece que virtualmente la totalidad de la información neural que da origen a la percepción auditiva proviene de estas células. El neurotransmisor liberado en las sinapsis entre las fibras del nervio auditivo y las CCI es **glutamato**.

La inervación eferente del órgano de Corti presenta un patrón distinto y complementario al aferente. Los axones eferentes inervan extensamente a las

CCE, pudiéndose observar varios terminales sinápticos de gran tamaño sobre la superficie basolateral de éstas células. Las CCI están indirectamente innervadas por fibras eferentes que hacen sinapsis con las fibras aferentes provenientes del ganglio espiral, cerca de las sinapsis de estas fibras con las CCI, es decir, mediante sinapsis axoaxónicas (Spoendlin, 1974).



**Figura 3.** Esquema de la innervación aferente y eferente del órgano de Corti (Modificado de Hudspeth, 2000).

## 6. Sistema eferente olivo-coclear

Las fibras nerviosas eferentes que innervan la cóclea tienen su origen en el tronco encefálico y se extienden hasta las células receptoras del órgano de Corti, lo que sugiere que el sistema nervioso central puede influenciar la percepción auditiva desde su origen.

Las investigaciones realizadas por Rasmussen en 1946 y 1960 permitieron una primera aproximación a la anatomía de las fibras eferentes. En 1946 describió fibras que se originaban en la parte medial del complejo olivar superior, y que

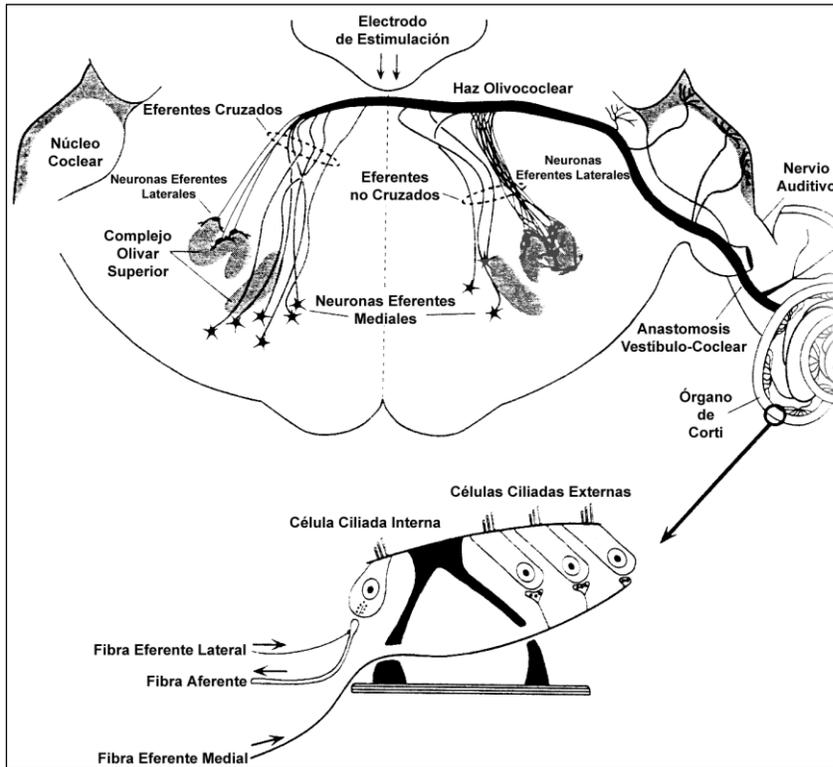
cruzaban la línea media del tronco encefálico, cerca del piso del cuarto ventrículo, en forma de un haz compacto al que llamó **haz olivo-coclear cruzado**, y que se proyectaba hasta la cóclea contralateral. Más tarde, en 1960, describió el **haz olivo-coclear no cruzado**, el cual se dirigía a la cóclea ipsilateral, sin cruzar la línea media del tronco encefálico. De este modo, y durante años, se mantuvo una clasificación de la vía eferente olivo-coclear en componentes cruzado y no cruzado.

Posteriormente, Warr (1975), inyectó trazadores neuronales retrógrados en la cóclea, con lo que logró dilucidar el origen de los haces olivo-cocleares cruzado y no cruzado ya descritos por Rasmussen. Como resultado de éste y otros estudios (Warr y Guinan, 1979) surgió una nueva clasificación de la vía eferente olivo-coclear, basada esta vez en el origen de estas fibras en el tronco encefálico, y que dividió la vía eferente olivo-coclear en 2 grandes grupos, los sistemas **olivo-coclear medial** (MOC) y **olivo-coclear lateral** (LOC).

Las fibras eferentes MOC se originan de neuronas de gran tamaño ubicadas generalmente medial, ventral y anteriormente al núcleo olivar superior medial, poseen axones de gran calibre, con vaina de mielina, y se proyectan hasta el órgano de Corti, donde hacen sinapsis directamente con las CCE (Warr y Guinan, 1979). Estas fibras se proyectan predominantemente a la cóclea contralateral, cruzando la línea media del tronco encefálico, en proporciones que varían dependiendo de la especie.

Las fibras eferentes LOC se originan de neuronas de menor tamaño ubicadas dentro y alrededor del núcleo olivar superior lateral, tienen axones de menor calibre, amielínicos, que hacen sinapsis axoaxonal con las fibras aferentes

provenientes del ganglio espiral que llegan a las CCI (Warr y Guinan, 1979). Estas fibras son más numerosas que las MOC, y se proyectan mayoritariamente a la cóclea ipsilateral (figura 4).



**Figura 4.** Origen y proyección de las neuronas eferentes olivo-cocleares (Modificado de Guinan, 1996).

Las especializaciones morfológicas en los sitios de contacto sináptico indican que las sinapsis entre las células ciliadas y los axones neuronales son de naturaleza química. En el caso de las fibras eferentes MOC, el neurotransmisor que se libera al espacio sináptico es **acetilcolina**, la cual actúa sobre receptores nicotínicos (formados por subunidades homoméricas alfa-9 o heteroméricas alfa-9, alfa-10) que exhiben inusuales propiedades farmacológicas y son exclusivos de las CCE (Elgoyhen *et al.*, 1994). La acción de la acetilcolina sobre su receptor provoca un influjo de cationes, lo que genera una corriente hiperpolarizante en la CCE. En las sinapsis entre las fibras LOC y las fibras aferentes también predomina acetilcolina,

pero se ha encontrado otros neurotransmisores como GABA, dopamina, encefalinas y péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP).

Los primeros estudios relacionados con la fisiología de la vía eferente auditiva los realizó Galambos en 1956. Mediante impulsos eléctricos aplicados en el piso del cuarto ventrículo, logró estimular fibras eferentes que cruzaban la línea media del tronco encefálico. Observó una reducción en la amplitud del **potencial de acción compuesto del nervio auditivo** (CAP) provocado por clics, es decir, por estímulos acústicos de corta duración y amplia gama de frecuencias. Este es, quizás, el efecto más conocido del sistema eferente auditivo, y ha sido corroborado en numerosos experimentos (Desmedt, 1962; Wiederhold y Peake, 1966; Gifford y Guinan, 1987). En estos experimentos se observó que la supresión del CAP era máxima ante estímulos acústicos de baja intensidad, y que este efecto disminuye a medida que aumenta el nivel de intensidad del estímulo acústico, hasta prácticamente desaparecer.

Posteriormente, también se observó la modificación de potenciales cocleares no neurales por estimulación eferente. Fex (1959 – 1967) observó un aumento en la amplitud del **potencial microfónico coclear** (CM), que corresponde al potencial de receptor de las CCE. Este cambio en los CM se debería a un aumento en la conductancia de las CCE y a un cambio en los flujos de corriente al interior de las células ciliadas (Fex, 1967).

En estos estudios, es muy probable que sólo se haya logrado estimular fibras eferentes mediales, pues éstas son de mayor diámetro y poseen vaina de mielina, lo que las hace más fáciles de estimular con choques eléctricos (Gifford y Guinan, 1987; Guinan, 1996; Délano *et al.*, 2005). Por esto mismo, las fibras eferentes

laterales, de pequeño calibre y amielínicas, son muy difíciles de excitar (Guinan, 1996). Gifford y Guinan, en 1987, intentaron estimular focalmente las neuronas LOC situando electrodos de estimulación cerca de la ubicación de éstas neuronas en el tronco encefálico, sin encontrar efectos claros que pudieran ser atribuidos a las fibras eferentes laterales. Junto a esto, encontraron efectos equivalentes estimulando focalmente el origen de las fibras MOC y el piso del cuarto ventrículo. Más aún, la estimulación focalizada de neuronas MOC provocó efectos 2,6 veces mayores en la cóclea contralateral respecto a la ipsilateral en gato, proporción muy similar a la proyección de fibras eferentes mediales hacia la cóclea contralateral (2,4 veces) respecto a las que proyectan hacia la cóclea ipsilateral en esta especie (Warr *et al.*, 1975).

También se ha documentado la influencia de la acción eferente en registros intracelulares en células ciliadas. En estos estudios se encontró que la estimulación de la vía eferente medial disminuía dramáticamente la sensibilidad y sintonización de la respuesta eléctrica de las CCI ante estímulos acústicos de baja intensidad (Brown *et al.*, 1983; Brown y Nuttall, 1984).

En estudios más recientes se pudo comprobar que la estimulación eléctrica de la vía eferente medial provoca una pérdida de sensibilidad y agudeza de sintonización en la respuesta mecánica coclear (Murugasu y Russell, 1996; Cooper y Guinan, 2003), es decir, la estimulación eferente medial provoca una disminución en los desplazamientos de la membrana basilar, la cual es máxima ante estímulos acústicos de baja intensidad y con frecuencias cercanas a la frecuencia característica del segmento coclear estudiado. Este parece ser el

mecanismo dominante mediante el cual la acción eferente medial provoca una depresión en la amplitud del CAP.

El comportamiento de la influencia eferente medial sobre la respuesta mecánica parece indicar que su acción principal está a nivel del amplificador coclear (Guinan, 1996). Las sinapsis eferentes mediales parecen estar idealmente ubicadas para influenciar la operación de las CCE, sin embargo, los mecanismos por los cuales afectan las propiedades de estas células aún son desconocidos.

## **7. Posible rol del sistema eferente auditivo.**

A pesar del gran número e importancia anatómica de las terminaciones nerviosas eferentes en el órgano de Corti, la función del sistema eferente auditivo aún es desconocida. Existen múltiples roles putativos, pero las evidencias que los avalan son aún escasas y, en ocasiones, contradictorias.

Entre las proposiciones que se han hecho están: 1- ajuste del rango dinámico auditivo de la cóclea (Zheng, *et al.* 1999) 2- reducción del efecto de enmascaramiento producido por ruido u otros tonos (Winslow y Sachs, 1987; Kawase y Liberman, 1993) 3- control de la sensibilidad de la cóclea de acuerdo al estado de atención del sujeto (Oatman, 1971). 4- prevención del daño coclear producido por sonidos de alta intensidad (Rajan, 1995) y 5- modulación de las aferencias auditivas durante el ciclo sueño-vigilia (Velluti, 1997). La escasa información que existe sobre la función del sistema eferente lateral hace difícil especular acerca de su rol en la fisiología auditiva (Délano *et al.*, 2005).

## **8. La chinchilla como modelo de estudio del sistema eferente auditivo**

La chinchilla (*Chinchilla lanigera*) es un excelente modelo de estudio en la investigación sobre sistema auditivo. Razones para esto son su fácil cuidado, docilidad, resistencia a infecciones óticas, resistencia a la anestesia general, fácil acceso a oído medio e interno y, principalmente, a que poseen una curva de umbrales auditivos muy similar a la del humano, como ha sido demostrado en diversos experimentos psicofísicos (Miller, 1970; Nelson y Kiestler, 1978; Heffner y Heffner, 1991).

Pese a que la chinchilla ha sido ampliamente utilizada en la investigación del sistema auditivo, existe muy poca información relacionada con su sistema eferente olivo-coclear. Existe evidencia de diferencias en la distribución y anatomía de las vías eferentes en las diferentes especies y, considerando que gato y cobayo son las especies más estudiadas en este tema, esto no permite generalizar los efectos fisiológicos de la vía eferente entre las diversas especies. Existen muy pocos estudios acerca de la distribución y morfología de las neuronas olivo-cocleares de la chinchilla. Sin embargo, se ha logrado comprobar algunas particularidades destacables. Sus neuronas eferentes MOC presentan la proporción más importante de fibras cruzadas respecto a no cruzadas (4:1) entre las especies conocidas (Azeredo *et al.*, 1999), es decir, sus neuronas MOC proyectan un 80% a la cóclea contralateral y sólo un 20% a la cóclea ipsilateral. Estos resultados concuerdan con los datos de Iurato *et al.* (1978) que sugieren que la proporción de fibras MOC cruzadas es cercana a un 80%.

Asimismo, se ha comprobado que poseen 2 grupos morfológicos de neuronas LOC, neuronas intrínsecas (en el interior de la oliva superior lateral) y las llamadas

*shell neurons*, que se encuentran rodeando a la oliva superior lateral y presentan somas de mayor tamaño. Las *shell neurons* han sido también encontradas en ratas, jerbos, gatos y hay evidencias indirectas de que se encontrarían también en otras especies, como en el cobayo (Brown, 1987; Warr, 1992). En el estudio realizado por Azeredo *et al.* (1999) se encontró un promedio total de 1168 neuronas olivo-cocleares en la chinchilla. De estas, la mayoría (67%) correspondían a neuronas LOC intrínsecas, las cuales proyectan casi exclusivamente a la cóclea ipsilateral; 24% correspondieron a neuronas MOC; y 9% a *shell neurons*, con una proporción de proyecciones hacia la cóclea ipsilateral respecto de la contralateral de 2,2:1.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Determinar el efecto de la estimulación eléctrica de las vías eferentes olivococleares mediales en las respuestas cocleares de la chinchilla.

### **2. Objetivos específicos**

- Estimular eléctricamente el haz olivo-coclear mediante un electrodo situado en el piso del cuarto ventrículo.
- Medir los efectos inducidos por la estimulación eléctrica eferente en el potencial de acción compuesto coclear.
- Medir los efectos inducidos por la estimulación eléctrica eferente en potenciales de receptor (microfónicos) de la cóclea.
- Comparar los efectos eferentes observados con resultados experimentales obtenidos en otras especies, considerando las diferencias anatómicas ya conocidas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Lugar y período del estudio**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Neurobiología de la Audición a cargo del Dr. Luis Robles W., en el Programa de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, entre los meses de abril de 2004 y julio de 2005.

### **2. Animales y Anestesia**

Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA#098 FMUCH) y se realizaron de acuerdo a las pautas del NIH en manejo de animales de experimentación. Para este estudio se utilizaron 24 Chinchillas adultas (*Chinchilla laniger*) con pesos entre 400 y 700 gramos. Fueron premedicadas con atropina (0,04 mg/kg I.M.) y Xilazina (4-8 mg/kg I.M.) y luego anestesiadas con Ketamina (35-40 mg/kg, I.M.), con repetición de la mitad de la dosis cada 45-60 minutos o ante presencia de movimientos o respuestas positivas a pruebas de dolor (Anderson, 1996). Cuando fue necesario, se rehidrató a algunos animales con suero fisiológico por vía intraperitoneal o subcutánea.

Se mantuvo control constante de la temperatura rectal entre 35 y 37° C (Spotorno *et al.*, 2004) con un colchón calefactor y un tele-termómetro (YSI-43TD). La eutanasia de los animales se llevó a cabo con una sobredosis de tiopental sódico tres veces mayor a la dosis anestésica (3 x 40 mg/kg) administrada por vía intracardiaca, sin recuperación del estado de anestesia general.

### **3. Cirugía**

Para obtener un mejor acceso al meato auditivo externo y a la membrana timpánica, fue necesario retirar la oreja izquierda de todos los animales utilizados y realizar una craneotomía lateral en la *bulla* timpánica. Posteriormente se realizó una craneotomía dorsal en la *bulla* para el corte del músculo tensor del tímpano. La aproximación a la cóclea se hizo por apertura en el aspecto posterior de la *bulla* timpánica. Por esta misma apertura fue posible desinsertar el músculo estapedio. Sólo fue posible cortar o desinsertar los músculos del oído medio en los últimos 7 animales en estudio.

Para acceder al piso del cuarto ventrículo se realizó craneotomía dorsal, retirando gran parte de los huesos parietales desde la sutura coronal (parietofrontal) hasta la sutura parietooccipital. Posteriormente se realizó una apertura en la duramadre y aspiración de la porción central y frontal del cerebelo.

Los procedimientos se realizaron bajo lupa (*Zeiss, OpMi- 1*) con aumento de hasta 40x, con un escalpelo eléctrico *Wappler* modelo C-263. Se realizó hemostasis utilizando gelatina hemostática (*Spongostan Special*).

Para controlar el acúmulo de líquido cerebro-espinal en el cuarto ventrículo se realizaron aspiraciones periódicas o se colocaba material absorbente o gelatina hemostática.

### **4. Estimulación y registro**

Todos los experimentos se realizaron en una cámara construida con doble muralla y con cierre de doble puerta, lo que permite aislar el interior de la habitación del

ruido y vibraciones ambientales del exterior. Además, la superficie de la muralla interna de la pieza se encuentra tapizada con un material absorbente al sonido.

Asimismo, cada experimento fue realizado sobre una mesa flotante a prueba de vibraciones, en la que se fijó el animal a un aparato estereotáxico sobre una plataforma con dos ejes de movimiento micrométrico.

Los estímulos acústicos fueron generados por un procesador en tiempo real RP-2.1 y atenuados con un atenuador programable PA-5, ambos parte de un equipo *Tucker-Davis Technologies (TDT) System 3*. Los estímulos fueron entregados en el meato auditivo externo por medio de un audífono electrostático TDT conectado a un sistema sellado al meato externo, enfrentado directamente a la membrana timpánica.

Los estímulos generados consistían en **clics** y **tonos**. Un clic es un pulso acústico de muy corta duración (100  $\mu$ s) que tiene un amplio espectro de frecuencias, por lo que estimula una gran extensión de la cóclea. Los tonos usados tenían una duración de 15 ms y fueron presentados con frecuencias de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 KHz; en ocasiones también se utilizaron tonos de 500 Hz y 12 KHz. Debido a las características de tonotopía de la respuesta coclear, los tonos nos permitían estimular sitios más específicos de la cóclea.

Todos los estímulos acústicos fueron generados con alternancia de fase, es decir, cada estímulo acústico fue generado con polaridad opuesta a la del estímulo anterior. Esto permite aislar los potenciales cocleares (CAP y CM) en el análisis de los datos.

En algunos animales se llevó a cabo una calibración de la intensidad del estímulo acústico generado frente a la membrana timpánica a todas las frecuencias de estimulación.

Para la adquisición de los potenciales eléctricos cocleares se colocó un electrodo de alambre de plata de 80  $\mu\text{m}$  de diámetro sobre la membrana de la ventana redonda. La señal recogida fue amplificada 100 veces con pre-amplificadores contruídos en el laboratorio (en ocasiones con un pre-amplificador *Grass P15*) y 100 veces más con un filtro *Krohn-Hite* modelo 3323, resultando en una ganancia total de 10000X. La señal adquirida fue filtrada entre 300 y 10000 Hz para tonos de hasta 8 KHz; y entre 300 y 20000 Hz para tonos de frecuencias más altas que 8 KHz. Posteriormente, estas señales fueron digitalizadas a 40000 muestras por segundo con una tarjeta de adquisición análogo-digital *National Instruments 6024E* instalada en un computador Pentium IV.

Las vías eferentes fueron estimuladas en el punto en que cruzan la línea media del tronco encefálico con estimulación bipolar a través de un arreglo de electrodos metálicos colocado a lo largo de la línea media del piso del cuarto ventrículo. El arreglo de 6 electrodos fue confeccionado con alambre de una aleación de níquel – cromo y aislados con esmalte, en que se dejó descubiertos 500  $\mu\text{m}$  en la punta. Los electrodos poseen un diámetro de 200  $\mu\text{m}$  y se encuentran separados entre sí por 500  $\mu\text{m}$ . Para la estimulación se utilizó el par de electrodos adyacentes que produjera una máxima disminución del potencial de acción compuesto del nervio auditivo sin causar grandes movimientos musculares (Gifford y Guinan, 1987; Guinan y Stankovic, 1996). Los electrodos de estimulación fueron posicionados con un micro manipulador hidráulico marca *David Kopf Instruments*, modelo

1207B, y se mantenían aislados de la red eléctrica mediante un aislador de acoplamiento óptico construido en el laboratorio.

Para la estimulación eferente se utilizaron, inicialmente, pulsos eléctricos de 300  $\mu$ s a frecuencias de 200-300 pulsos por segundo, por periodos de 100 ms e intervalos de 330 ms, ya que pulsos de estas características han producido, en otras especies, la mayor inhibición del potencial de acción compuesto del nervio auditivo (Gifford y Guinan, 1987; Guinan, 1996; Cooper y Guinan, 2003). En los primeros experimentos se variaron estos parámetros de estimulación eléctrica, sin encontrar efectos mayores a los obtenidos en las condiciones iniciales.

En todos los experimentos se consideró que la estimulación eléctrica fue efectiva cuando provocó movimientos faciales y disminuciones en la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio auditivo, lo que fue logrado en la gran mayoría de los experimentos. Los movimientos faciales se deben a la cercanía del cruce de las fibras eferentes olivo-cocleares con las “rodillas” del nervio facial, inflexiones anteroposteriores de fibras provenientes de los núcleos faciales.

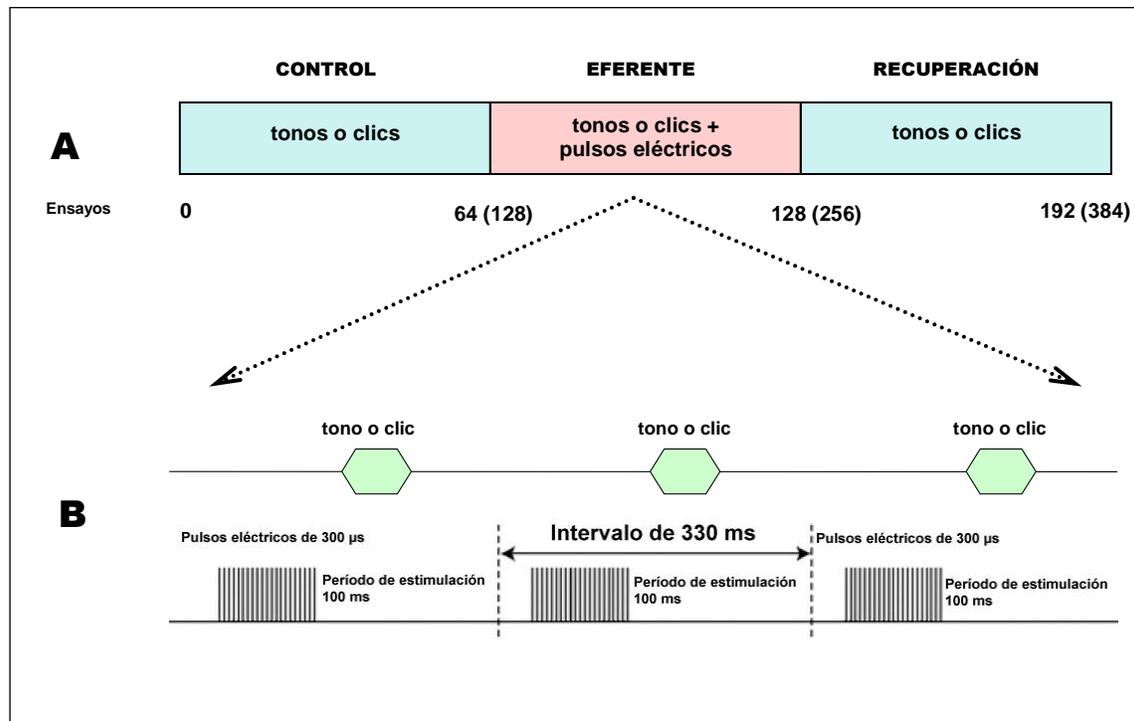
Tras corroborar una efectiva estimulación eléctrica, se disminuía la intensidad de los pulsos eléctricos tratando de obtener el máximo efecto de reducción en la amplitud del CAP con un nivel moderado de contracciones faciales.

Los estímulos generados y los potenciales adquiridos podían ser observados en un osciloscopio en todo momento para controlar el correcto funcionamiento de todo el sistema.

## **5. Protocolo experimental**

Al comienzo de cada experimento se profundizaba 400-500  $\mu\text{m}$  el arreglo de electrodos de estimulación eléctrica en la línea media del cuarto ventrículo. Tras esto se probaba la intensidad y calidad de la estimulación eléctrica, buscando la intensidad de estimulación eléctrica y el par de electrodos que produjeran contracciones faciales. Posteriormente, se buscaba de la misma forma la máxima reducción del potencial de acción compuesto del nervio auditivo cuando se presentaban clics de intensidad moderada (-60 a -40 dB). Muchas veces fue necesario modificar también la profundidad de los electrodos de estimulación entre 400 y 600  $\mu\text{m}$ , obteniendo generalmente los mejores resultados con 500  $\mu\text{m}$  de profundidad. Entre cada evento de estimulación eléctrica se esperaba un periodo de 3-5 minutos. Tras encontrar los parámetros adecuados se bajaba el voltaje de la estimulación eléctrica tratando de tener una clara reducción de amplitud del CAP con el mínimo de contracciones musculares faciales.

Una vez establecidos los parámetros óptimos de estimulación eléctrica se comenzaba el registro de los potenciales cocleares para diferentes niveles de presión de sonido para clics y tonos de todas las frecuencias en estudio, para así obtener curvas de **entrada – salida** en el análisis posterior. Para cada intensidad



**Figura 5.** Paradigma experimental. **A:** Para cada nivel de intensidad de estímulo acústico se realizaron 3 etapas o series, primero 64 (ó 128) presentaciones del estímulo acústico, luego igual número de presentaciones del estímulo acústico aplicando pulsos eléctricos en el piso del cuarto ventrículo y finalmente igual cantidad de ensayos sin aplicación de pulsos eléctricos. **B:** Detalle de la estimulación acústica y eléctrica en un ensayo de la serie con estimulación eferente.

de estimulación acústica, se presentaban 3 series contiguas de 64 (ó 128) repeticiones del estímulo acústico, primero en ausencia de estimulación eléctrica, luego en presencia de pulsos eléctricos y finalmente sin pulsos eléctricos.

El control del experimento, generación de estímulos y adquisición de los registros fue realizado con el programa *Kapulse*, desarrollado (por Paul Délano) en lenguaje de programación C en un ambiente *Labwindows/CVI (National Instruments)*.

## **6. Procesamiento y análisis de datos.**

Con el programa *Kapulse* se obtuvieron los valores de amplitud del CAP. Para un mayor análisis del CAP y sobre todo de los CM fue necesario crear un programa (*CMtool*, Diego Elgueda) en lenguaje C que realizara cálculos de latencia del CAP y transformación rápida de Fourier a los registros para obtener valores de amplitud de los CM. *CMtool* permitió también obtener imágenes de los registros para su presentación posterior. Con el programa *FastPhase* (Paul Délano) se pudo analizar la fase de los CM, también mediante la transformación rápida de Fourier. Los valores obtenidos con estos programas fueron tabulados en planillas Excel, y se verificó la significancia de las diferencias entre las series experimental y control mediante la prueba *t* de *Student*.

## **RESULTADOS**

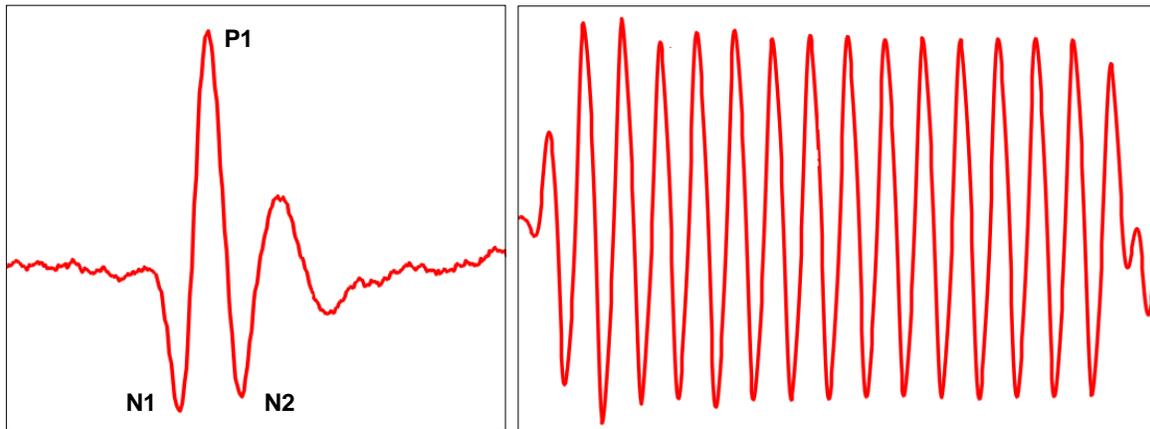
Los resultados se basan en mediciones electrofisiológicas realizadas en 10 chinchillas. En los 5 últimos experimentos se cortaron los dos músculos del oído medio, el músculo tensor del tímpano y el músculo estapedio, para eliminar un posible efecto de la estimulación eléctrica en la función de ambos músculos.

La estimulación eléctrica del haz olivo-coclear provocó cambios en los potenciales cocleares estudiados: reducciones en la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio auditivo (CAP) e incrementos en la amplitud de los potenciales microfónicos cocleares (CM). En general, los cambios observados en la amplitud del CAP fueron mucho más manifiestos que los obtenidos en los CM; asimismo, el comportamiento del efecto de la estimulación eferente sobre los CM fue, en general, más irregular que el efecto sobre el CAP. Además, se lograron reducciones de amplitud del CAP con clics y tonos de todas las frecuencias utilizadas, mientras que los aumentos en la amplitud de los CM se observaron principalmente con tonos de bajas frecuencias.

### **1. Propiedades de las respuestas eléctricas cocleares.**

Se realizaron mediciones en la amplitud de los potenciales registrados con el electrodo en la ventana redonda (CAP y CM) en función de la intensidad del estímulo acústico (clic y tonos) y de la tasa de presentación de estímulo. Asimismo, se realizaron mediciones de latencia del CAP en relación a la intensidad del estímulo acústico. La amplitud del CAP se midió entre la primera y segunda onda (N1 y P1) del registro promedio de 64 ó 128 respuestas (figura 6). Las amplitudes de los CM se obtuvieron de la transformación de Fourier, la que

descompone una señal en sus diferentes componentes de frecuencia, por lo que entrega un valor mucho más confiable de amplitud y fase de la respuesta a la frecuencia en estudio.

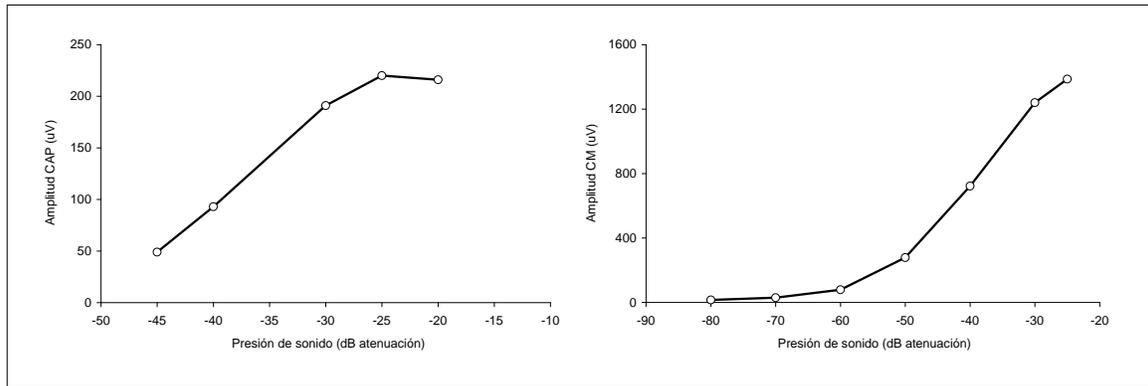


**Figura 6.** Potenciales cocleares registrados con un electrodo en la ventana redonda de la cóclea. Se han marcado, en el panel izquierdo (ch51), las tres deflexiones principales del CAP, N1, P1 y N2. La amplitud del potencial se mide entre N1 y P1. El panel de la derecha (ch50) muestra un potencial microfónico en respuesta a un tono de 1 KHz (-30 dB).

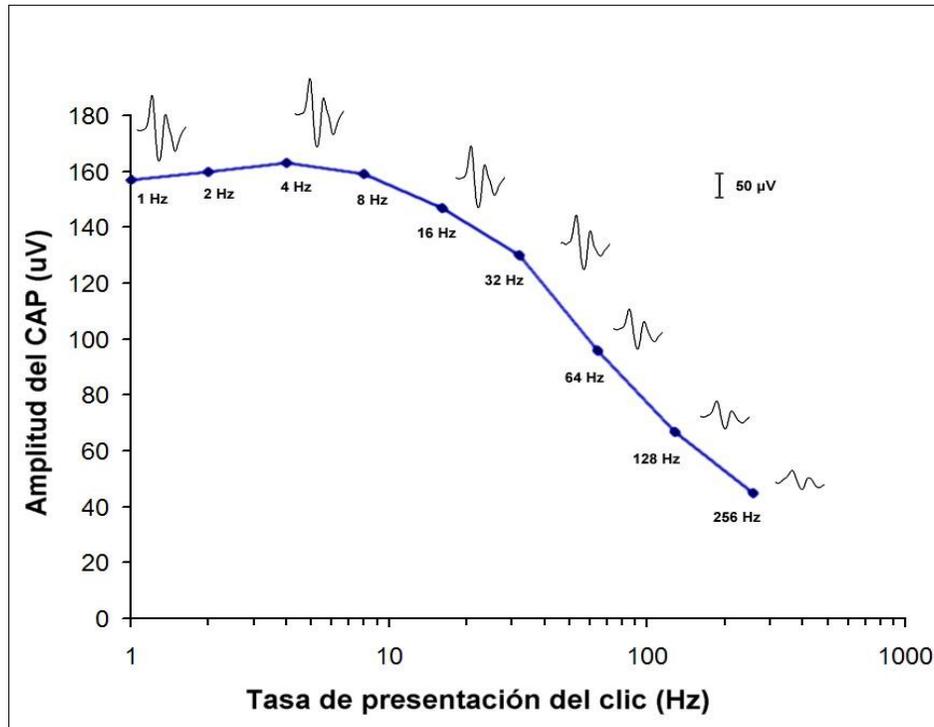
La amplitud del CAP depende de modo no lineal de la intensidad del estímulo (presión de sonido), aumentando hasta alcanzar un *plateau* a intensidades mayores. Las amplitudes de los CM están también relacionadas de modo no lineal con la intensidad del estímulo acústico, incrementándose exponencialmente a medida que aumenta la presión de sonido para estímulos de intensidad media (figura 7).

En cuanto a la tasa de presentación de estímulo, se realizaron pruebas con diferentes frecuencias de presentación de clics en una chinchilla, a una intensidad

fija. Se encontró que la amplitud del CAP disminuye paulatinamente a medida que aumenta la tasa de presentación de estímulo (figura 8).

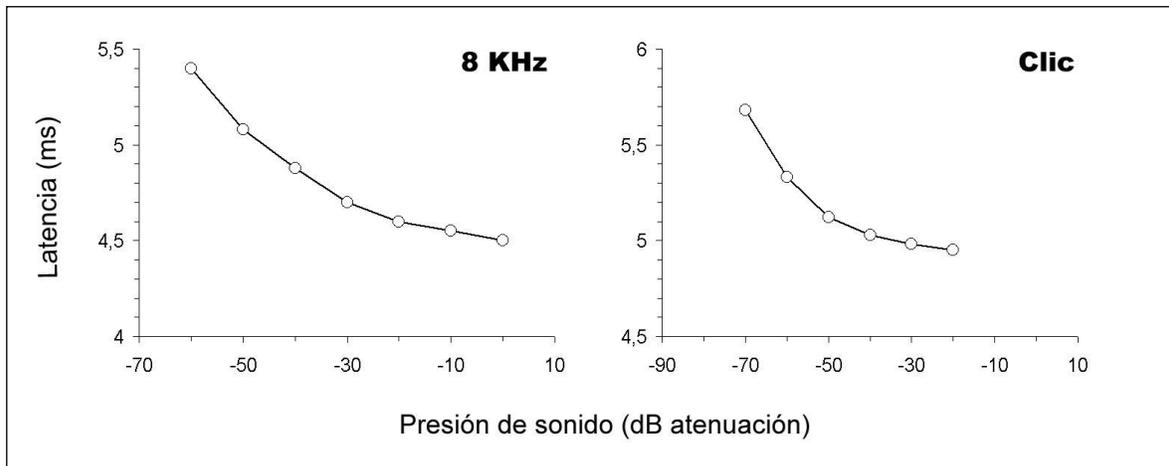


**Figura 7.** Curvas de amplitud del CAP (izquierda) y CM (derecha) en función a la intensidad del estímulo acústico. El panel de la izquierda (ch33) se obtuvo con clics, mientras que el panel de la derecha (ch46) con tonos de 1 KHz, en ambos casos para estímulos presentados con diferentes valores de intensidad. La intensidad en ésta y las figuras siguientes se representa en el eje de las abcisas por el valor de atenuación usado.



**Figura 8.** Relación entre la amplitud del CAP y la tasa de presentación de estímulo (clic). La magnitud del CAP disminuye paulatinamente con frecuencias de presentación mayores a 8 Hz. Se muestran ejemplos de los CAPs obtenidos para cada tasa de presentación.

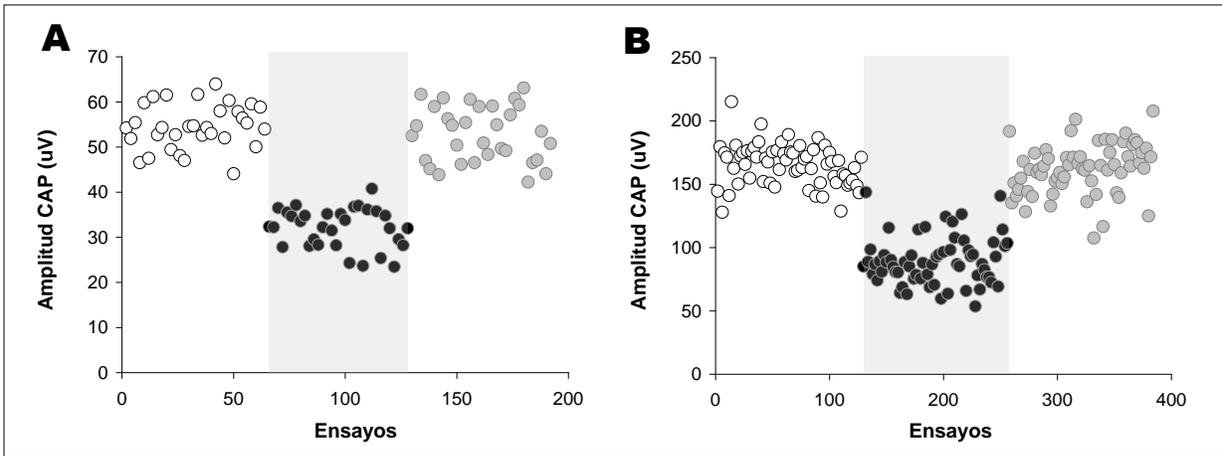
La latencia del CAP se define como el periodo entre la presentación del estímulo acústico y el pico de la primera onda del CAP (N1). La latencia es dependiente de la intensidad del estímulo acústico, siendo mayor cuando el estímulo acústico es de menor intensidad (figura 9).



**Figura 9.** Latencias de CAPs obtenidos con tonos de 8 KHz (ch49) y clics (ch61) de diferentes intensidades.

## **2. Efectos eferentes en el potencial de acción compuesto del nervio auditivo.**

En los ensayos con efectiva estimulación eléctrica fue posible observar reducciones en la amplitud y aumentos en la latencia del CAP ante diversos estímulos acústicos. Las reducciones de amplitud se caracterizaron por aparecer bruscamente, recuperándose ésta tan pronto cesaba la estimulación eléctrica (figura 10). Se comprobó la dependencia de este efecto de varios parámetros de la estimulación acústica y eléctrica.



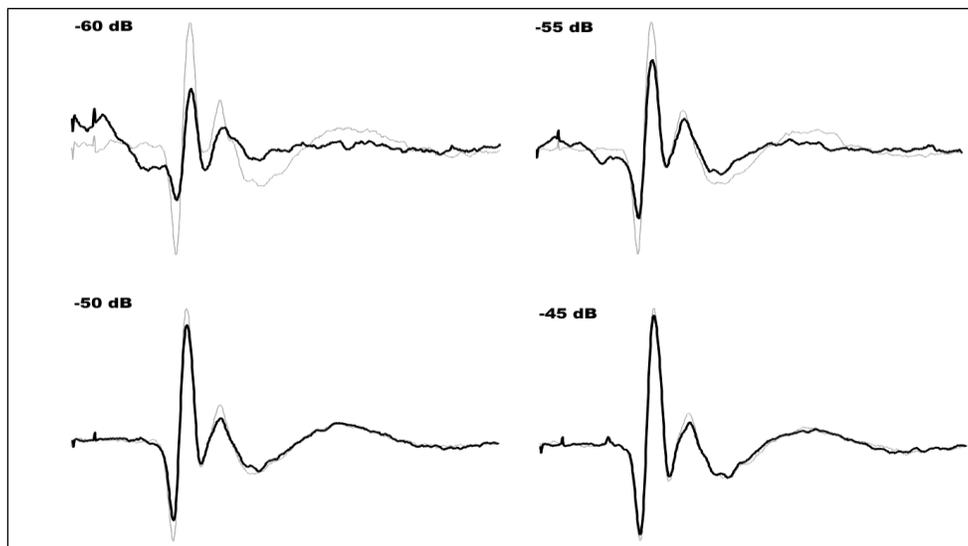
**Figura 10.** Ejemplos en que se aprecia el cambio en la amplitud del CAP por estimulación eferente. **A:** Amplitud de CAPs obtenidos como respuesta a clics con 50 dB de atenuación. Se realizaron 192 ensayos, de lo cuales, sólo los 64 correspondientes a la zona demarcada (entre ensayos 65 y 128) estaban precedidos por estimulación eléctrica en el cuarto ventrículo (ch50,  $p < 0,005$ , prueba  $t$  de Student). **B:** Amplitud de CAPs obtenidos con tonos de 1 KHz con 60 dB de atenuación. Se realizaron 384 ensayos, con los 128 ensayos de la zona demarcada precedidos por estimulación eléctrica en el cuarto ventrículo (entre ensayos 129 y 256). (ch61,  $p < 0,005$ , prueba  $t$  de Student).

## 2.1. Dependencia de la intensidad de estimulación acústica.

Una de las características más destacables del efecto eferente sobre el CAP fue una fuerte dependencia de la intensidad del estímulo acústico o presión de sonido. Concordando con la literatura existente, la disminución en la amplitud del CAP fue mayor para intensidades bajas y moderadas de estímulo acústico, llegando en ocasiones, a supresiones de magnitudes cercanas o superiores a los 12 dB respecto del control.

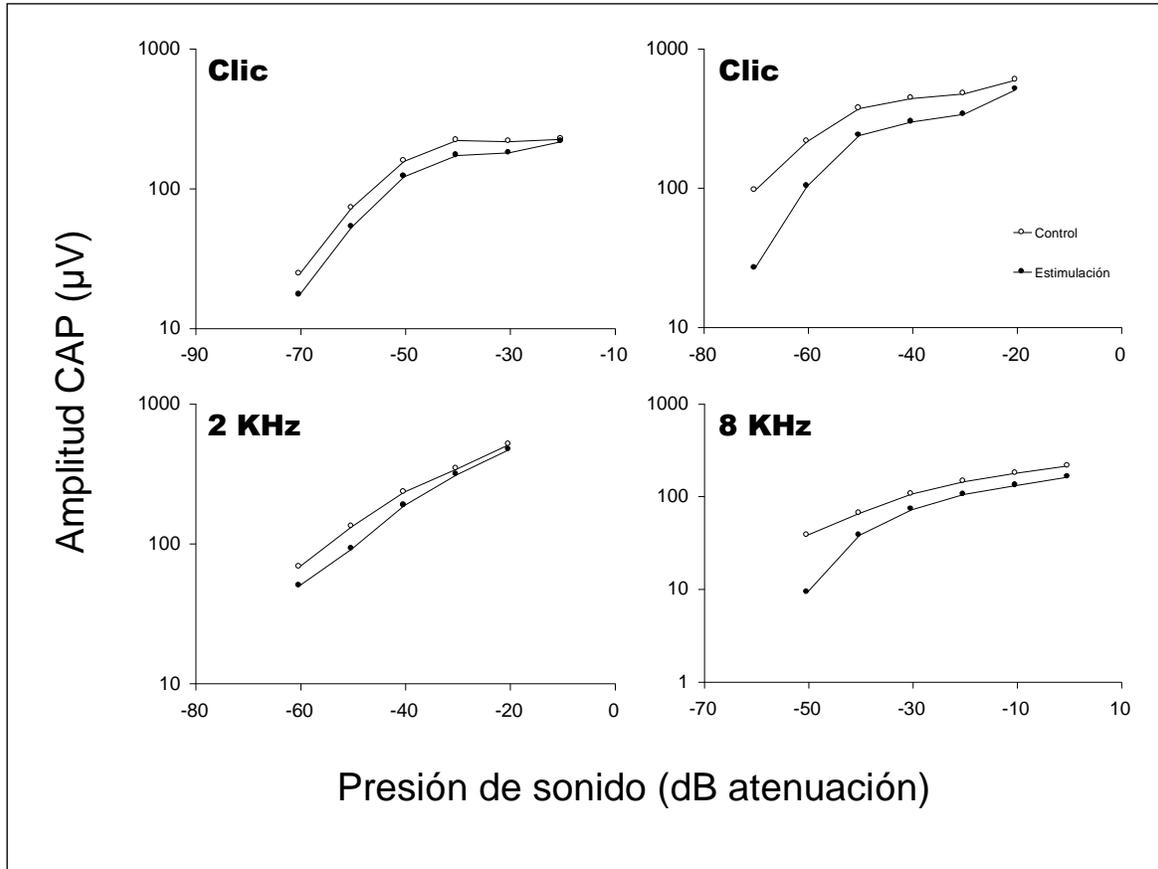
A medida que se aumentaba la intensidad del estímulo acústico, se observaba un menor efecto, e incluso, para altas intensidades de estímulo, no se obtenían diferencias significativas en la amplitud del CAP entre los grupos control y bajo estimulación eléctrica (figura 11).

En muchas ocasiones, el registro de CAP obtenido al presentar estímulos acústicos de alta intensidad se contaminó con remanentes de potenciales microfónicos cocleares, lo que no permitía continuar aumentando la presión de sonido. Por otra parte, para bajas intensidades de estímulo acústico, el registro obtenido se contaminaba por el nivel de ruido base.



**Figura 11.** CAPs obtenidos con clics a diferentes intensidades (ch41, promedios de 64 repeticiones). Los controles se han trazado de color gris y los CAPs obtenidos tras estimulación eléctrica de la vía eferente en negro. Los registros obtenidos con clics de alta intensidad (45 dB de atenuación) muestran disminuciones de menor magnitud que aquellos obtenidos con clics de baja intensidad (-60 dB).

La figura 12 muestra funciones de entrada-salida, donde se grafican las amplitudes promedio de CAPs obtenidos a diferentes intensidades de estímulo acústico. En estas funciones es posible observar más claramente la influencia de la intensidad del estímulo acústico sobre el efecto de la estimulación eferente.



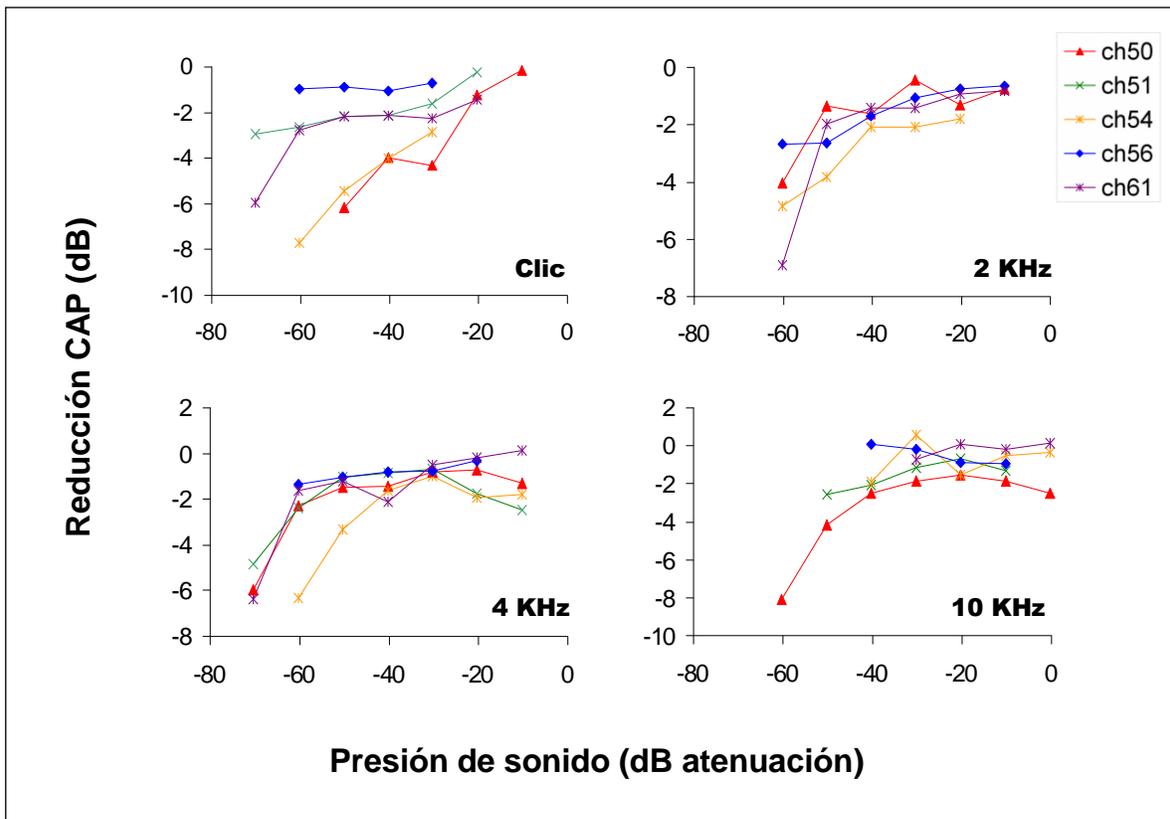
**Figura 12.** Curvas de entrada-salida de CAPs obtenidos con y sin estimulación eléctrica en el piso del cuarto ventrículo. Los paneles superiores corresponden a curvas obtenidas con clics (izquierda ch51, derecha ch47) y los inferiores con tonos de 2 KHz (ch56) y 8 KHz (ch50).

Para poder realizar comparaciones entre diversos ensayos y experimentos es conveniente utilizar un valor que caracterice el cambio que provoca la estimulación eléctrica sobre los potenciales medidos. Este valor se obtuvo calculando la diferencia en **decibeles** que existe entre las amplitudes de los CAP obtenidos bajo estimulación eléctrica y el control correspondiente, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Supresión de CAP (dB)} = 20 \times \text{Log}_{10} (A / A_{\text{ref}})$$

donde  $A$  es la amplitud del promedio de las respuestas obtenidas bajo estimulación eléctrica y  $A_{ref}$  es la amplitud promedio de los ensayos sin estimulación eléctrica (controles). Los valores obtenidos se graficaron en función del nivel de presión de sonido de tonos de diferentes frecuencias y clics (figura 13).

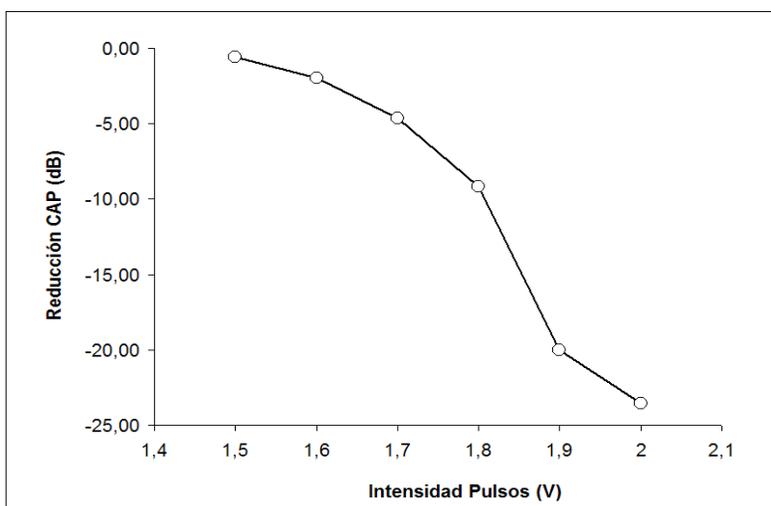
En el apéndice de la presente memoria de título se pueden encontrar los gráficos de todos los experimentos realizados en que fue posible estimular adecuadamente las fibras eferentes, con clics y tonos de todas las frecuencias en estudio.



**Figura 13.** Reducción del CAP provocada por estimulación eléctrica de la vía eferente en función de la intensidad del estímulo acústico para 5 animales. Es evidente una mayor reducción para estímulos acústicos de menor intensidad.

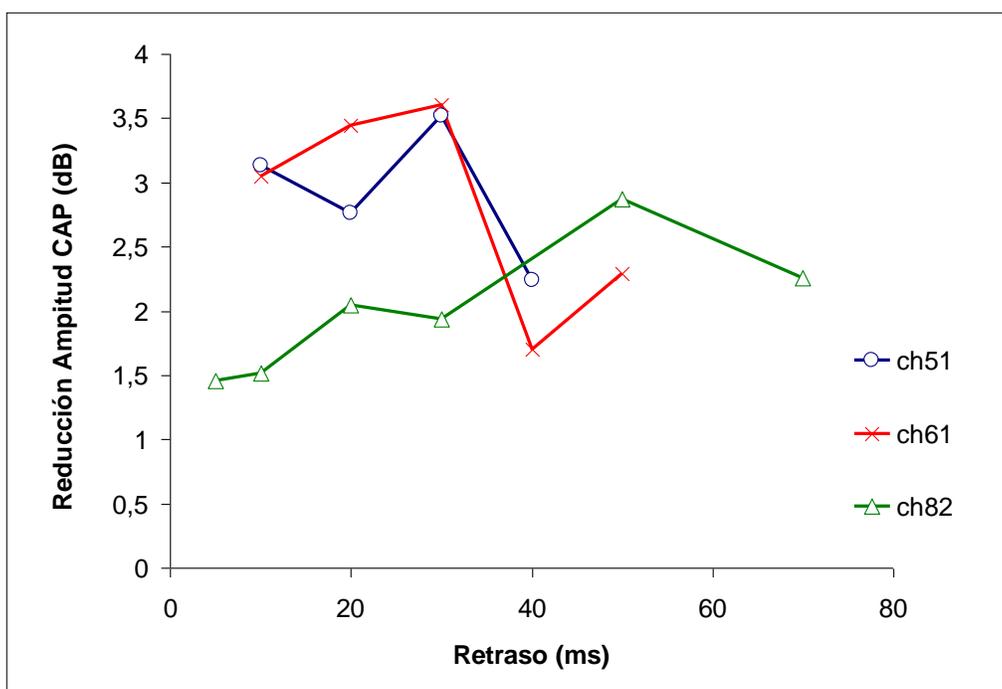
## 2.2 Dependencia en parámetros de la estimulación eléctrica.

En uno de los experimentos se estudió la influencia de la intensidad de la estimulación eléctrica en la supresión del CAP. Esto se hizo eligiendo un estímulo acústico a una intensidad (presión de sonido) cuya respuesta neural (CAP) fuese fuertemente suprimida por la estimulación eferente, repitiendo el ensayo con diferentes intensidades de estímulo eléctrico (volts). En la figura 14 se aprecia que la magnitud de la reducción del CAP se incrementó con la intensidad de los pulsos eléctricos, es decir, a medida que aumentaba la intensidad de los pulsos, el efecto tendía a crecer. Esta característica de la estimulación eléctrica concuerda con lo encontrado en la literatura existente (Galambos, 1956; Konishi y Slepian, 1971; Gifford y Guinan, 1987). Sin embargo, no era siempre factible usar intensidades de pulso altas, pues estas provocaban movimientos musculares cada vez más vigorosos que podían interferir con los registros. Ello se debe a la cercanía del nervio facial con el sitio de estimulación. Por esto, en todos los experimentos se eligió una intensidad de pulso eléctrico que produjera la mayor reducción posible en el CAP con un nivel aceptable de contracciones musculares.



**Figura 14.** Influencia de la intensidad de estimulación eléctrica sobre el efecto de reducción de amplitud del CAP (ch49, tono de 6 KHz presentado a -60 dB).

En tres experimentos se estudió la influencia del periodo comprendido entre el último pulso eléctrico y el estímulo acústico (retraso). El mayor efecto de la estimulación eléctrica de la vía eferente sobre el CAP fue máximo después de 30 ms de aplicados los pulsos eléctricos (figura 15), lo que difiere de los 10 ms reportados en experimentos en gatos y cobayos (Gifford y Guinan, 1987; Konishi y Slepian, 1971). En dos ocasiones obtuvimos el máximo efecto después de 30 ms de retraso, y en un experimento se obtuvo la máxima reducción del CAP a los 50 ms. Debido a limitaciones del paradigma de adquisición de datos y estimulación utilizado, no fue posible probar retrasos superiores a 80 ms.

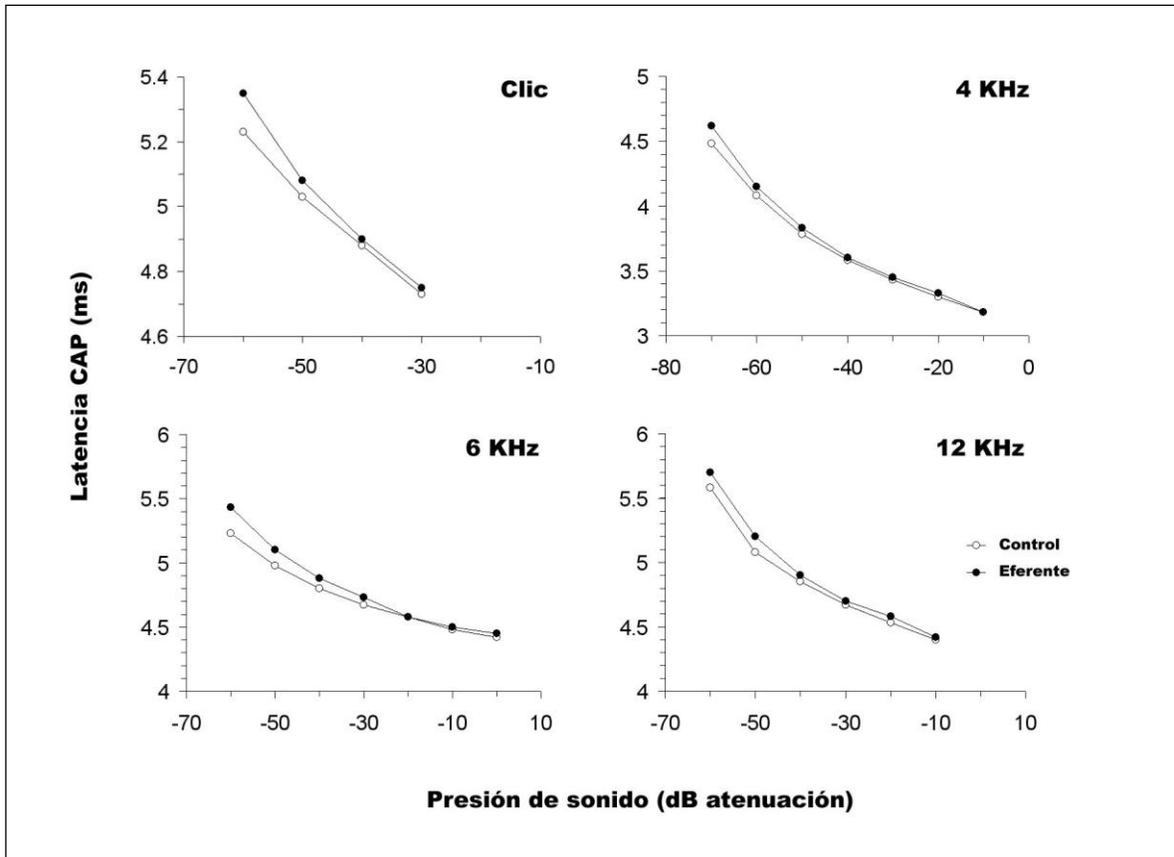


**Figura 15.** Reducción de la amplitud del CAP provocada por estimulación eléctrica de la vía eferente en función del período entre el último pulso eléctrico y la estimulación acústica (retraso) en tres animales (ch51, tonos de 6 KHz, -50 dB; ch61, tonos de 6 KHz, -60 dB; ch82, tonos de 1 KHz, 50 dB SPL).

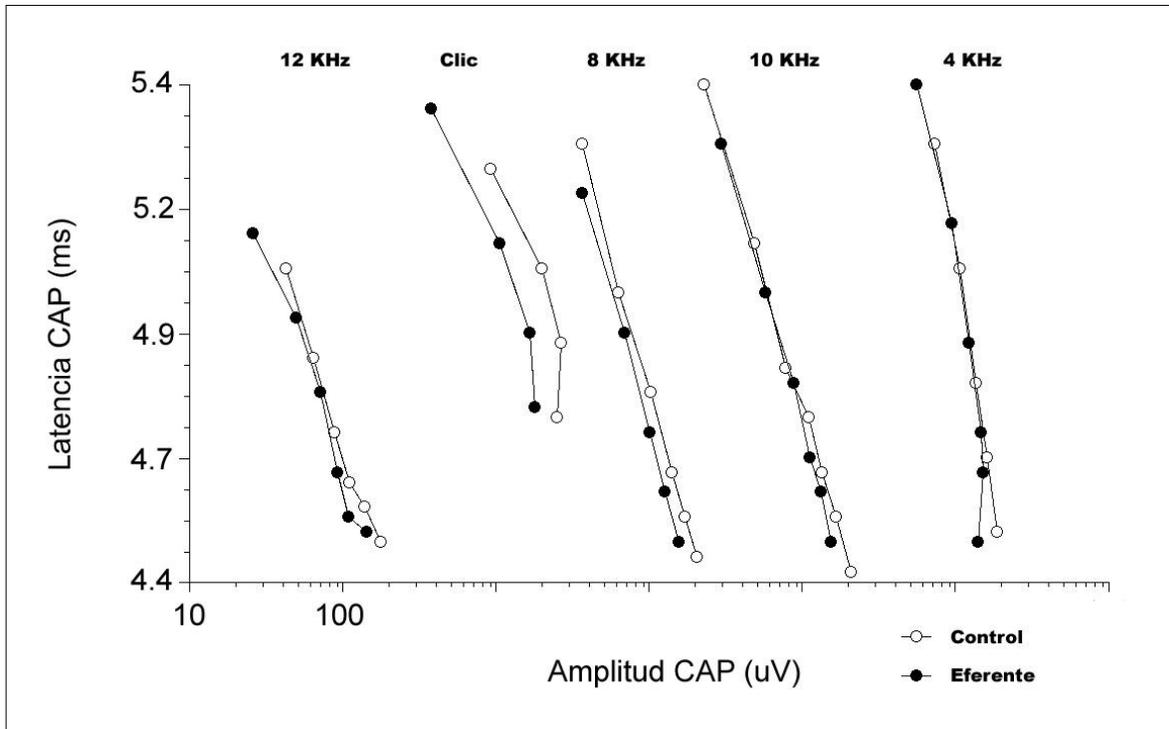
### **2.3. Efecto de la acción eferente sobre la latencia del CAP.**

La estimulación eléctrica de la vía eferente provocó, además de la reducción en la amplitud, un aumento en la latencia del CAP. Al igual que en el caso de la amplitud, el cambio en la latencia fue máximo para intensidades moderadas o bajas del estímulo acústico (figura 16).

Para determinar si el efecto de reducción del CAP provocado por la estimulación eléctrica es comparable a una reducción de la intensidad del estímulo acústico, se graficó la latencia en función de la amplitud para CAPs obtenidos con y sin estimulación eferente. En el caso de que el efecto de la estimulación de la vía eferente fuera equivalente a bajar la intensidad del estímulo acústico, las curvas obtenidas en presencia de estimulación eléctrica deberían coincidir con las curvas sin estimulación eléctrica. La figura 17 muestra que, para varias condiciones de estimulación acústica, la latencia obtenida bajo estimulación eléctrica es menor que la observada a una misma amplitud del CAP en condición control, lo que sugiere que los cambios inducidos por la estimulación eléctrica de la vía eferente no son equivalentes a una simple disminución de la intensidad del estímulo acústico.



**Figura 16.** Curvas de latencia del CAP en función de la intensidad del estímulo acústico en presencia y ausencia de estimulación eléctrica de la vía eferente. La estimulación eléctrica provoca un aumento en la latencia que es máximo a intensidades bajas del estímulo acústico (clic ch54, 4 KHz ch61, 6 KHz ch50, 12 KHz ch51).



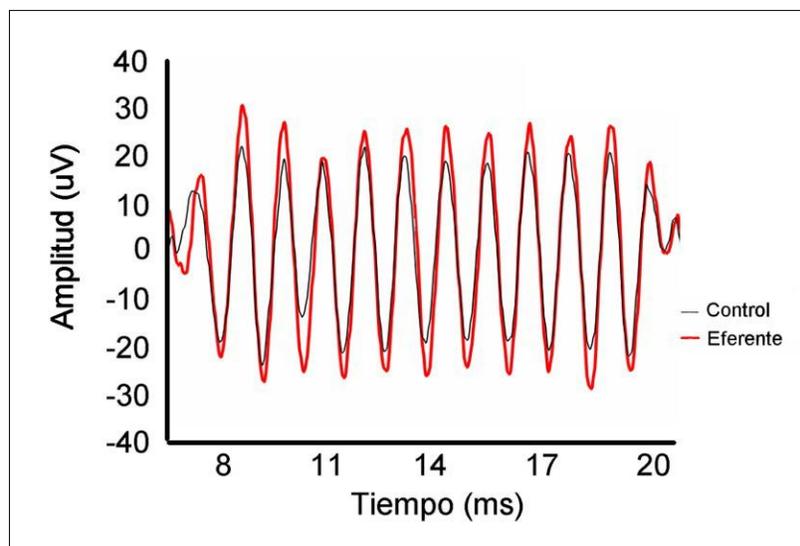
**Figura 17.** Latencia en función de amplitud de CAPs obtenidos con y sin estimulación eléctrica para diferentes estímulos acústicos. A partir del segundo gráfico de la izquierda, cada par de curvas está consecutivamente desplazado en la escala en una unidad logarítmica para facilitar la visualización. (12 KHz ch50, clic ch54, 8 KHz ch50, 10 KHz ch50, 4 KHz ch51).

### 3. Efectos eferentes en los potenciales microfónicos cocleares.

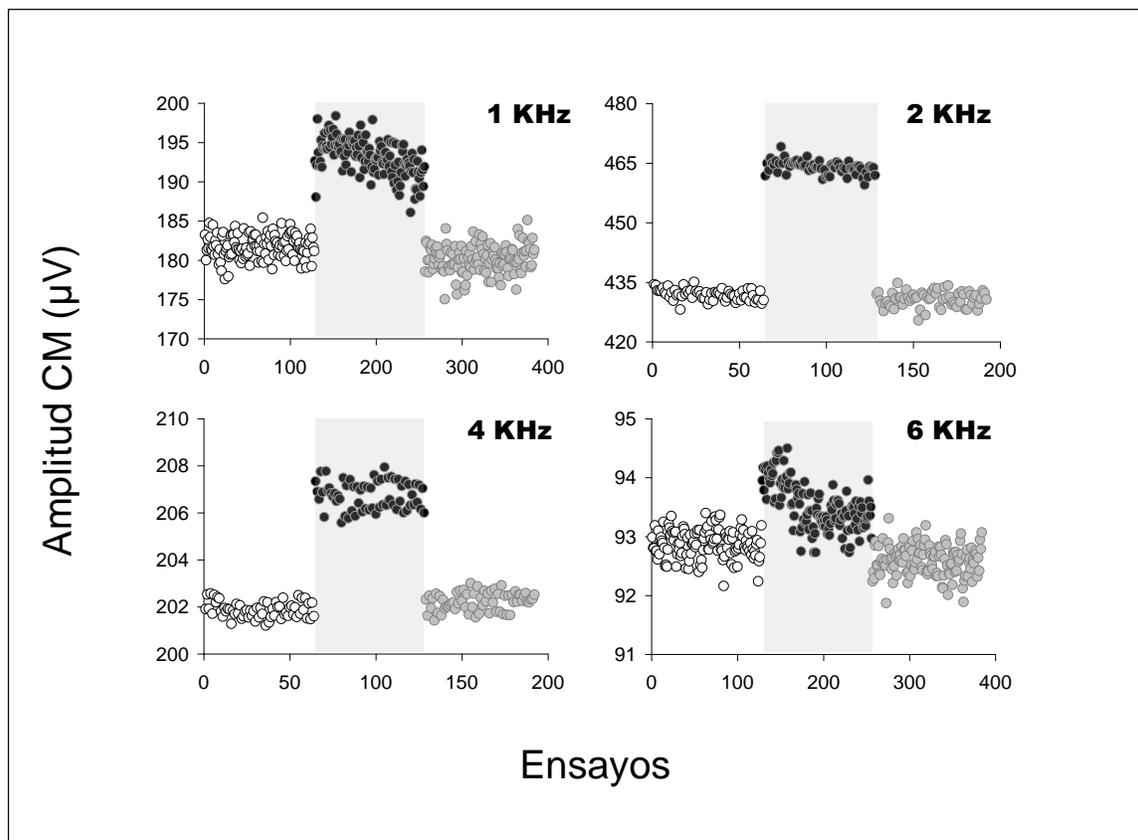
Junto con los efectos producidos en el CAP, la estimulación eléctrica de la vía eferente provocó cambios en los CM. Sin embargo, los cambios observados en los CM fueron, en general, menos manifiestos que aquellos observados en el CAP, por lo que fue necesario utilizar la **transformada rápida de Fourier (FFT)**. Este cálculo matemático, que transforma una señal en el dominio del tiempo al dominio de las frecuencias, permite separar los registros en sus componentes de frecuencia. Como los CM expresan la misma frecuencia del estímulo acústico, el cálculo de FFT nos permite obtener las magnitudes y fases de los componentes a

cada frecuencia de un modo más confiable. En el caso de los CM obtenidos con clics, la medición de amplitud se realizó de modo similar a la medición realizada con los CAP, tomando la amplitud entre los puntos máximo y mínimo del registro (medición entre pico y pico).

La estimulación eléctrica de la vía eferente provocó un incremento en la amplitud de los CM, el que, en ocasiones, llegó hasta niveles cercanos a 2 dB respecto del control (figura 18) y que, generalmente, cesaba por completo una vez que se dejaba de estimular eléctricamente la vía eferente (figura 19).



**Figura 18.** Registros promedio de 64 respuestas obtenidas con un tono de 1 KHz (-60 dB) en ausencia (negro) y presencia (rojo) de estimulación eléctrica de la vía eferente. Las respuestas obtenidas con estimulación eléctrica fueron significativamente mayores (ch50, prueba *t* de Student  $p < 0,01$ ).



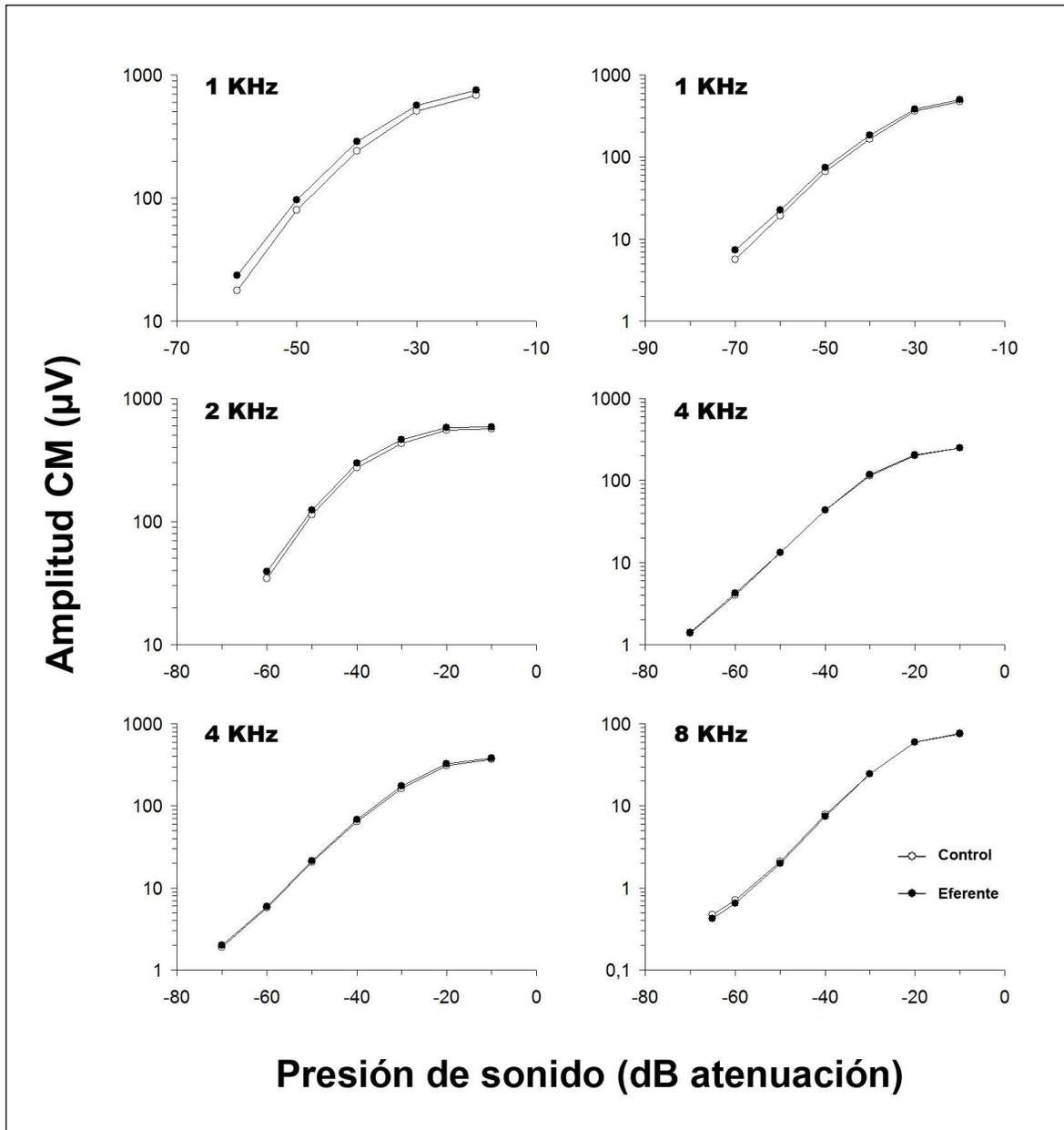
**Figura 19.** Amplitud de CM en respuesta a tonos de diferente intensidad y frecuencia. Se aprecia el cambio en la amplitud de los CM cuando se aplica estimulación eléctrica de la vía eferente (área demarcada). **1 KHz:** ch54, se realizaron 384 ensayos a una frecuencia de 3 por segundo, presentando tonos de 1 KHz con 50 dB de atenuación ( $p < 0,05$ , prueba  $t$  de Student). **2 KHz:** ch50, 192 ensayos con tonos de 2 KHz y 30 dB de atenuación presentados 1 por segundo ( $p < 0,05$ , prueba  $t$  de Student). **4 KHz:** ch51, 192 ensayos con una frecuencia de 1 por segundo, tonos de 4 KHz y 20 dB de atenuación ( $p < 0,05$ , prueba  $t$ ). **6 KHz:** ch61, 384 ensayos presentados a una tasa de 3 por segundo. Tonos de 6 KHz atenuados 20 dB. ( $p < 0,05$ , prueba  $t$  de Student).

### **3.1. Dependencia de parámetros de estímulo acústico.**

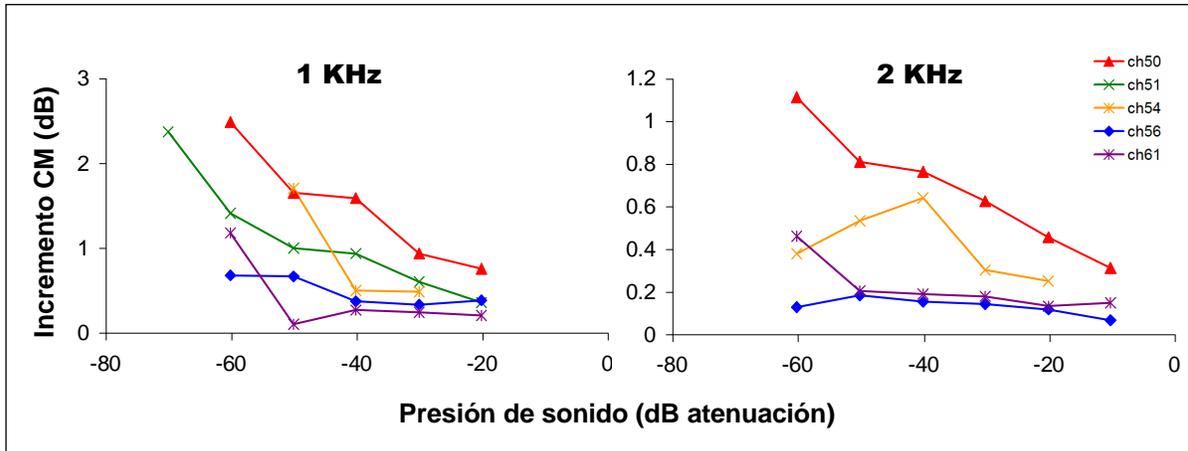
El incremento en la amplitud en los CM se vio fuertemente influenciado por los parámetros del estímulo acústico, como intensidad y frecuencia. El incremento en la amplitud de los CM fue mayor mientras menor fuera la intensidad del estímulo acústico (figuras 20 y 21).

Este incremento en la amplitud de los CM mostró también gran dependencia en la frecuencia del estímulo acústico, siendo máximo para frecuencias relativamente bajas (1 - 2 KHz), disminuyendo hasta desaparecer a medida que se aumentaba la frecuencia. En la figura 20 se muestran curvas de entrada-salida de CM obtenidos en dos animales en presencia y ausencia de estimulación eléctrica en el piso del cuarto ventrículo, para tonos de diferentes frecuencias. En ella es posible observar la dependencia de la magnitud de los CM de ambos parámetros del estímulo acústico.

De igual forma que con el CAP, se calculó el incremento de la amplitud en decibeles (dB), teniendo como referencia la amplitud obtenida en ausencia de estimulación con pulsos eléctricos. Esto nos permite comparar el efecto obtenido en varios experimentos a una misma frecuencia del estímulo acústico (figura 21).



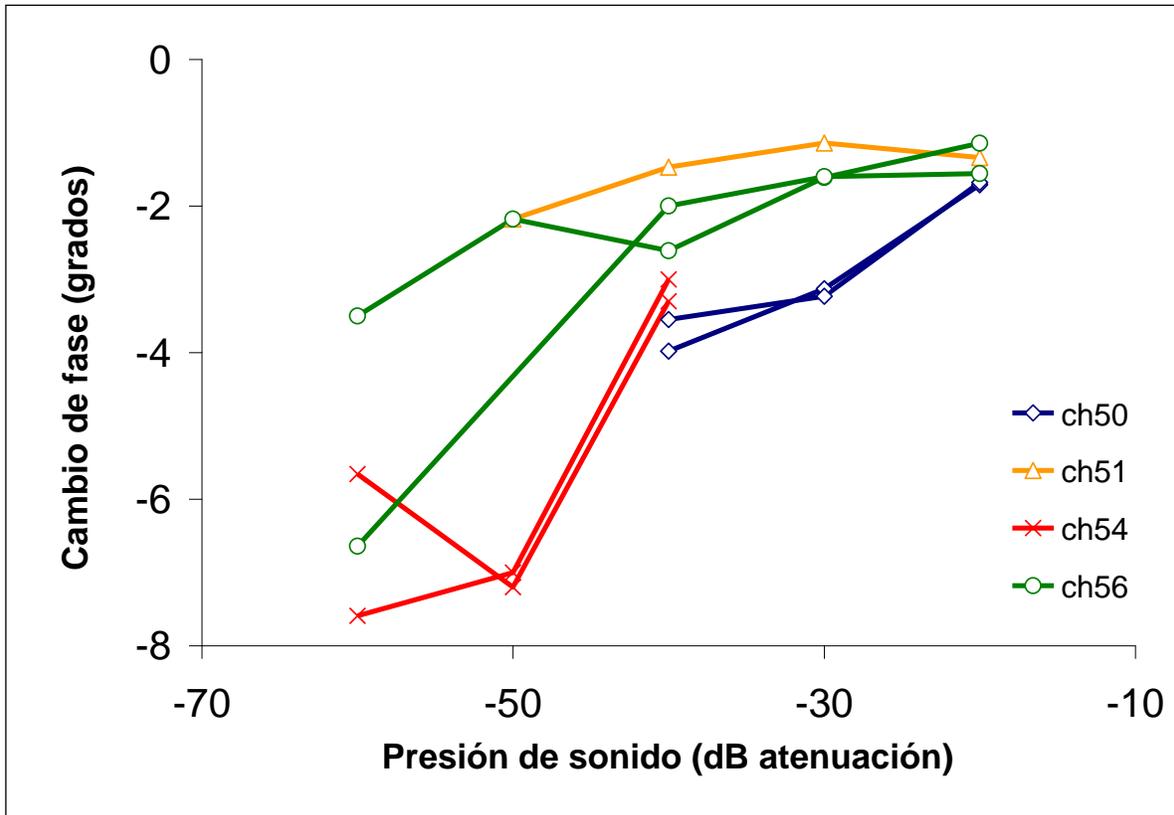
**Figura 20.** Curvas de entrada-salida de CM obtenidos en respuesta a tonos de diferentes frecuencias en presencia y ausencia de estimulación eléctrica de la vía eferente. Las figuras de la izquierda corresponden al animal ch50 y las de la derecha al animal ch51.



**Figura 21.** Incremento de CM provocado por estimulación eléctrica de la vía eferente en función de la intensidad del estímulo acústico en 5 chinchillas. Es evidente un incremento mayor ante tonos de menor intensidad y también un incremento mayor para tonos de 1 KHz que para 2 KHz.

### 3.2. Cambios en la fase de los potenciales microfónicos cocleares.

La estimulación eléctrica del haz olivo-coclear provocó también cambios en la fase de los CM. Se midió sólo en cinco animales en que se cortaron los músculos del oído medio, y sólo a una frecuencia de 1 KHz, por ser esta la frecuencia que presentó mayores cambios en la amplitud de los CM. En cuatro animales se obtuvieron variaciones significativas (prueba *t* de *Student*,  $p < 0,05$ ) en la fase al estimular eléctricamente el piso del cuarto ventrículo. La diferencia de fase (**desfase**) observada no superó los 8 grados de retraso en la respuesta. Los mayores desfases se obtuvieron para estímulos acústicos de menores intensidades (figura 22).



**Figura 22.** Retraso de fase en los CM provocado por estimulación eléctrica de la vía eferente en función de la intensidad de la estimulación acústica (tonos de 1 KHz) en cuatro animales.

#### 4. Influencia de la integridad de los músculos del oído medio.

En la cavidad del oído medio existen 2 músculos estriados que cumplen un rol protector ante estímulos acústicos de alta intensidad. El **músculo tensor del tímpano** se origina en la porción cartilaginosa y ósea de la trompa de Eustaquio y se inserta distalmente en el mango del martillo. Su acción desplaza a la membrana timpánica medialmente, tensándola, lo que disminuye la amplitud de las vibraciones que se propagan por la cadena de huesecillos. Está inervado por ramas de la división mandibular del nervio trigémino (V par craneano).

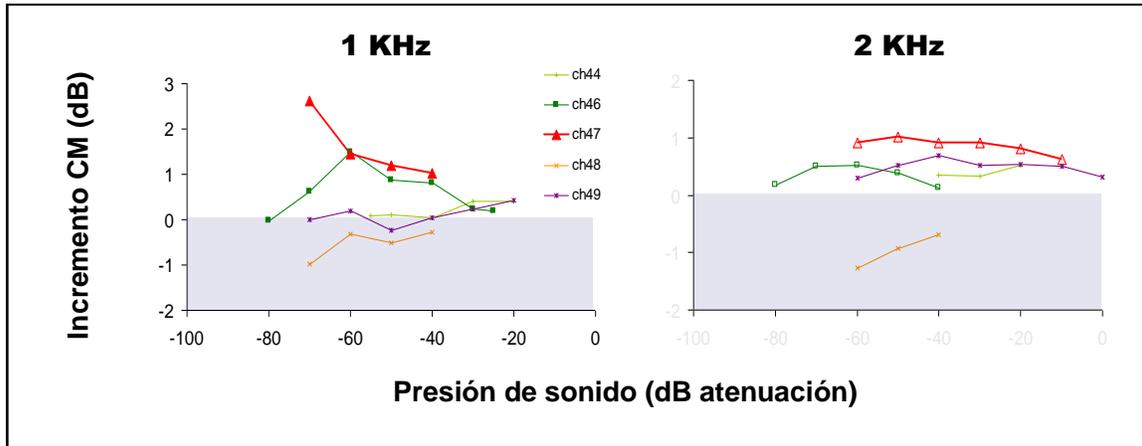
El músculo **estapedio** es el músculo estriado más pequeño del cuerpo. Se inserta, a su vez, en el hueso más pequeño del cuerpo, el estribo, estabilizándolo y evitando una excesiva vibración de éste en presencia de estímulos acústicos de alta intensidad. Está innervado por una rama del VII par craneano, el nervio facial.

Debido a la gran cercanía del haz olivo-coclear en su cruce por la línea media del tronco encefálico con las llamadas “rodillas” del nervio facial (inflexión antero-posterior bilateral sobre los núcleos faciales), en muchas investigaciones se ha planteado la posibilidad de que la estimulación eléctrica aplicada en el piso del cuarto ventrículo pueda excitar fibras del nervio facial y provocar una contracción del músculo estapedio. Si efectivamente la estimulación eléctrica provoca contracciones en los músculos del oído medio, esto potenciaría la reducción de la amplitud del CAP y sería detrimental en el incremento de los CM.

En los primeros cinco experimentos realizados exitosamente en la presente memoria de título, no fue posible desinsertar el músculo estapedio, debido a la gran dificultad quirúrgica y a la necesidad de material quirúrgico adicional.

La figura 23 presenta la variación observada en la amplitud de los CM en respuesta a tonos de 1 y 2 KHz en cuatro animales en que los músculos del oído medio se dejaron intactos y en uno en que fueron cortados en el transcurso del experimento. Es importante notar que los incrementos de CM no superaron 1,5 dB para tonos de 1 KHz en los animales con los músculos intactos, e incluso, en ocasiones se produjeron disminuciones en la amplitud de los CM. Los datos del animal con los músculos del oído medio cortados presentó incrementos superiores en todas las intensidades de estimulación acústica. Esta figura se puede comparar

con los incrementos ligeramente superiores de la figura 21, que presenta a los próximos 5 animales, en los que ambos músculos fueron cortados.



**Figura 23.** Incrementos en la amplitud de los CM en cuatro animales en que los músculos del oído medio permanecieron intactos y en un animal en que fueron desinsertados (ch47, línea roja). Se han marcado los valores negativos (disminuciones de amplitud).

## DISCUSIÓN

### 1. Comentarios Generales.

La presente memoria de título tuvo por objetivo principal describir el comportamiento de los potenciales cocleares cuando la vía eferente es estimulada eléctricamente, algo que se ha estudiado exclusivamente en gatos y cobayos (Galambos, 1956; Fex, 1959, 1967; Desmedt, 1962; Wiederhold y Peake, 1966; Gifford y Guinan, 1987; Patuzzi y Rajan, 1990). Existen actualmente muy pocos estudios relacionados con el sistema eferente auditivo de la chinchilla, pese a la gran importancia de esta especie en la investigación de la audición.

En 1978 Iurato *et al.* y en 1999 Azeredo *et al.* describieron en la chinchilla la anatomía de las neuronas eferentes olivo-cocleares y su distribución en la cóclea, encontrando grandes similitudes con ratas y cobayos, pero con la característica especial de poseer el mayor porcentaje de fibras olivo-cocleares cruzadas (dirigidas a la cóclea contralateral) entre todas las especies descritas de mamíferos. Posteriormente se estimó la influencia de la estimulación eléctrica de la vía eferente en la mecánica coclear, mediante mediciones de emisiones otoacústicas (Siegel y Kim, 1982). En ese estudio se menciona por primera vez en esta especie un efecto de la estimulación eléctrica del haz olivo-coclear en el CAP, acerca de lo cual sólo se asegura que fue observada una "clara reducción de la onda N1 del CAP". Zheng y colaboradores han estudiado en esta especie el efecto de la sección quirúrgica del haz olivo-coclear en la resistencia a traumas (1997) y en la amplitud de emisiones otoacústicas y CM (2000), observando que las

chinchillas de-eferentadas quirúrgicamente presentaban CM de amplitud menor, sugiriendo que, tal como se ha mostrado en animales anestesiados, el potencial de receptor coclear (CM) se incrementa durante la estimulación del sistema eferente, y que el sistema olivo-coclear medial ejerce una modulación tónica sobre las propiedades eléctricas de las CCE (Zheng *et al.*, 1997, 2000). Recientemente se ha estudiado la influencia de la estimulación del sistema eferente auditivo en las emisiones otoacústicas en la chinchilla y humanos, estimulando las neuronas eferentes de un modo no invasivo mediante estimulación acústica contralateral (James *et al.*, 2005).

## **2. Propiedades basales de los potenciales cocleares.**

Con el fin de conocer las propiedades de los potenciales cocleares (CAP y CM) , fue necesario realizar mediciones en ausencia de estimulación eléctrica de la vía eferente, manipulando parámetros del estímulo acústico como intensidad, frecuencia y tasa de presentación. Los datos obtenidos en esta memoria de título confirman el comportamiento no lineal de la amplitud de CAP y CM dependiente de la intensidad del estímulo acústico documentado en la literatura. Ambos potenciales exhiben un crecimiento exponencial a medida que aumenta la intensidad del estímulo acústico, hasta llegar a intensidades de saturación. Esta mayor sensibilidad de la cóclea frente a estímulos de baja amplitud es producto del "amplificador coclear", mecanismo residente en las CCE, que logra amplificar hasta en 40 dB (100 veces) la amplitud de las vibraciones de la membrana basilar provocadas por estímulos acústicos de intensidad baja o moderada (Hudspeth, 2000).

La latencia del CAP también mostró dependencia en la intensidad de la estimulación acústica, siendo mayor ante estímulos de menor intensidad, es decir, se retrasa la respuesta neural mientras más débil es el estímulo que la provoca.

El análisis de la tasa de presentación de estímulo acústico comprueba que las tasas utilizadas en los experimentos realizados (1 y 3 Hz) no producen reducción en la amplitud del CAP, pues ésta empieza a verse comprometida con tasas superiores a 8 Hz (figura 8).

### **3. Efectos provocados por la estimulación eferente en los potenciales cocleares.**

Los efectos observados en el CAP y en los CM parecen ser, a primera vista, contradictorios. La estimulación eferente tiene una acción inhibitoria en el potencial neural (CAP), mientras incrementa la amplitud del potencial de receptor (CM). Está ampliamente aceptado que esto se debe a la acción directa de las terminaciones sinápticas de las neuronas eferentes mediales sobre la membrana basolateral de las CCE, que provoca un aumento en la conductancia de éstas, mediado principalmente por canales de potasio activados por calcio (razón por la que aumenta la amplitud de los CM). Esto hiperpolariza a la célula y cambia los potenciales de membrana que provocan la motilidad de las CCE, reduciendo así la retroalimentación positiva con que esta motilidad potencia los desplazamientos de la membrana basilar. De este modo, se reduce la amplitud de tales desplazamientos y la amplificación coclear, lo que disminuye la transducción mecano-eléctrica en las CCI que sinaptan con las fibras aferentes del nervio auditivo, lo que explica la reducción de la amplitud del CAP.

#### **4. Efectos observados en el CAP.**

En este estudio se consideró la amplitud del CAP como la máxima diferencia entre las ondas N1 y P1 (figura 6), mientras que en algunos estudios anteriores se había medido solamente la amplitud de la onda N1 (Gifford y Guinan, 1987). Hasta el día de hoy, aún se discute el origen en la vía aferente de cada una de las ondas del CAP. En 1983, Møller registró CAPs en ratas antes y después de lesionar el núcleo coclear ipsilateral a la ventana redonda de la que se obtuvo el registro, proponiendo que la onda N1 sería una sumatoria de los potenciales de acción de las fibras aferentes del nervio auditivo que sinaptan con las CCI, sincronizadas con un estímulo acústico, mientras que la onda P1 correspondería a la propagación electrotónica retrógrada de la activación del núcleo coclear, ya que observó que su presencia era dependiente de la integridad del núcleo coclear. Recientemente, un estudio puso en duda nuevamente el origen de la onda P1 (McMahon *et al.*, 2004), sugiriendo que esta onda también estaría originada en las fibras aferentes primarias del VIII par craneano. Mediante enfriamientos específicos del núcleo coclear y la cóclea, lograron observar que todas las ondas del CAP eran dependientes de la actividad de las neuronas cocleares aferentes y no eran alteradas por el enfriamiento del núcleo coclear, pese a que éste no presentaba actividad eléctrica. Según McMahon y sus colaboradores, entonces, la medición de la amplitud del CAP entre las ondas N1 y P1 es una buena estimación de la actividad aferente de las fibras primarias del nervio auditivo.

Como es bien sabido, el "amplificador coclear" mejora la agudeza y sensibilidad de la respuesta coclear para estímulos sonoros de intensidad baja y moderada. En

ambos potenciales cocleares, los cambios de amplitud provocados por la estimulación de fibras eferentes observados en esta memoria de título fueron superiores a intensidades bajas y moderadas de estimulación acústica, lo que refuerza la idea de que la estimulación de estas fibras provoca una disminución en la ganancia del amplificador coclear y por lo tanto, una disminución en la sensibilidad coclear. Esto puede observarse en las curvas de entrada-salida y en las curvas de reducción del CAP y aumento de CM medidas en dB.

El efecto de la estimulación eferente en el CAP fue similar en todos los animales y a todas las frecuencias utilizadas, observándose disminuciones en la amplitud que variaron entre 2 y 12 dB respecto del control. Sin embargo, se encontró cierta variabilidad entre animales debido a factores difícilmente controlables, como la ubicación del electrodo de registro en diferentes partes de la ventana redonda, la colocación del arreglo de electrodos de estimulación en el piso del cuarto ventrículo, el ajuste del voltaje de estimulación, la duración de la cirugía y el acúmulo de fluido cerebro-espinal en el cuarto ventrículo, entre otros factores.

El anestésico utilizado (ketamina) no debería haber afectado la respuesta coclear, como ya ha sido reportado en la chinchilla (Sahley *et al.* 1991) con dosis aún mayores a las utilizadas en esta memoria de título (50 mg/Kg).

En todos los casos fue posible obtener reducciones mayores al aumentar el voltaje de estimulación eléctrica, pero siempre se intentó trabajar con un voltaje que no provocara grandes movimientos musculares, pues estos interferían en el registro por el aumento de ruido. En publicaciones anteriores se han reportado supresiones en el CAP cercanas a los 20 dB (Desmedt, 1962; Fex, 1967; Konishi y

Kelsey, 1970; Konishi y Slepian, 1971), pero debe considerarse que en esos casos se paralizó farmacológicamente a los animales, y esto permitía el uso de intensidades mayores en la estimulación eléctrica. Esto sugiere que al aumentar la intensidad del voltaje de estimulación se logra estimular un número mayor de fibras eferentes.

El estudio del retraso utilizado en los experimentos de esta memoria de título mostró una diferencia con los estudios que se han realizado en otras especies. En ellos, se encontró que el efecto de la estimulación eléctrica en el piso del cuarto ventrículo sobre la amplitud del CAP llegaba a ser máximo después de 10 ms. de haber aplicado los pulsos eléctricos (Desmedt 1962, Konishi y Slepian, 1971; Gifford y Guinan, 1987) y que éste disminuía a medida que transcurría el tiempo. En esta memoria de título, se probó este parámetro en 3 animales, observando que el máximo efecto se alcanzaba a los 30 ms. después de aplicados los pulsos eléctricos en dos animales, y en otro animal, a los 50 ms. Tras este máximo efecto, la supresión del CAP tendía a disiparse.

En los datos obtenidos, observamos un aumento en la latencia del CAP (figura 16) provocado por la estimulación eléctrica de la vía eferente ante un estímulo acústico de igual intensidad, algo que ya se había comprobado en otras especies (Gifford y Guinan, 1987). Se observó además, que el aumento en la latencia provocado por la estimulación eléctrica eferente no es equivalente a una disminución en la amplitud del estímulo sonoro, pues a una misma amplitud del CAP, la latencia obtenida bajo estimulación eferente es menor que la obtenida en

ausencia de ella (figura 17). Es difícil encontrar una explicación para este fenómeno; sin embargo, Gifford y Guinan (1987) proponen que, ya que en un sistema lineal la respuesta a estímulos se retrasa a medida que aumenta la selectividad de frecuencia de éste, la acción eferente podría disminuir la latencia de la respuesta mecánica local en la cóclea, pues se ha comprobado que la estimulación eferente provoca una disminución de la sintonización en fibras aferentes auditivas (Wiederhold y Kiang, 1970).

## **5. Efectos observados en los CM.**

El efecto de la estimulación eléctrica de la vía eferente presentó un comportamiento mucho más variable sobre el potencial de receptor (CM). Sin embargo, se observó que la acción de las neuronas olivo-cocleares mediales provoca un incremento en la amplitud de los CM, tal como se ha reportado en otras especies (Fex, 1959, 1967; Desmedt, 1962; Wiederhold y Peake, 1966; Konishi y Slepian, 1971; Gifford y Guinan, 1987; Patuzzi y Rajan, 1990). Este efecto es de menor magnitud que el obtenido sobre el CAP, con aumentos que alcanzaron un máximo de sólo 2,5 dB respecto del control.

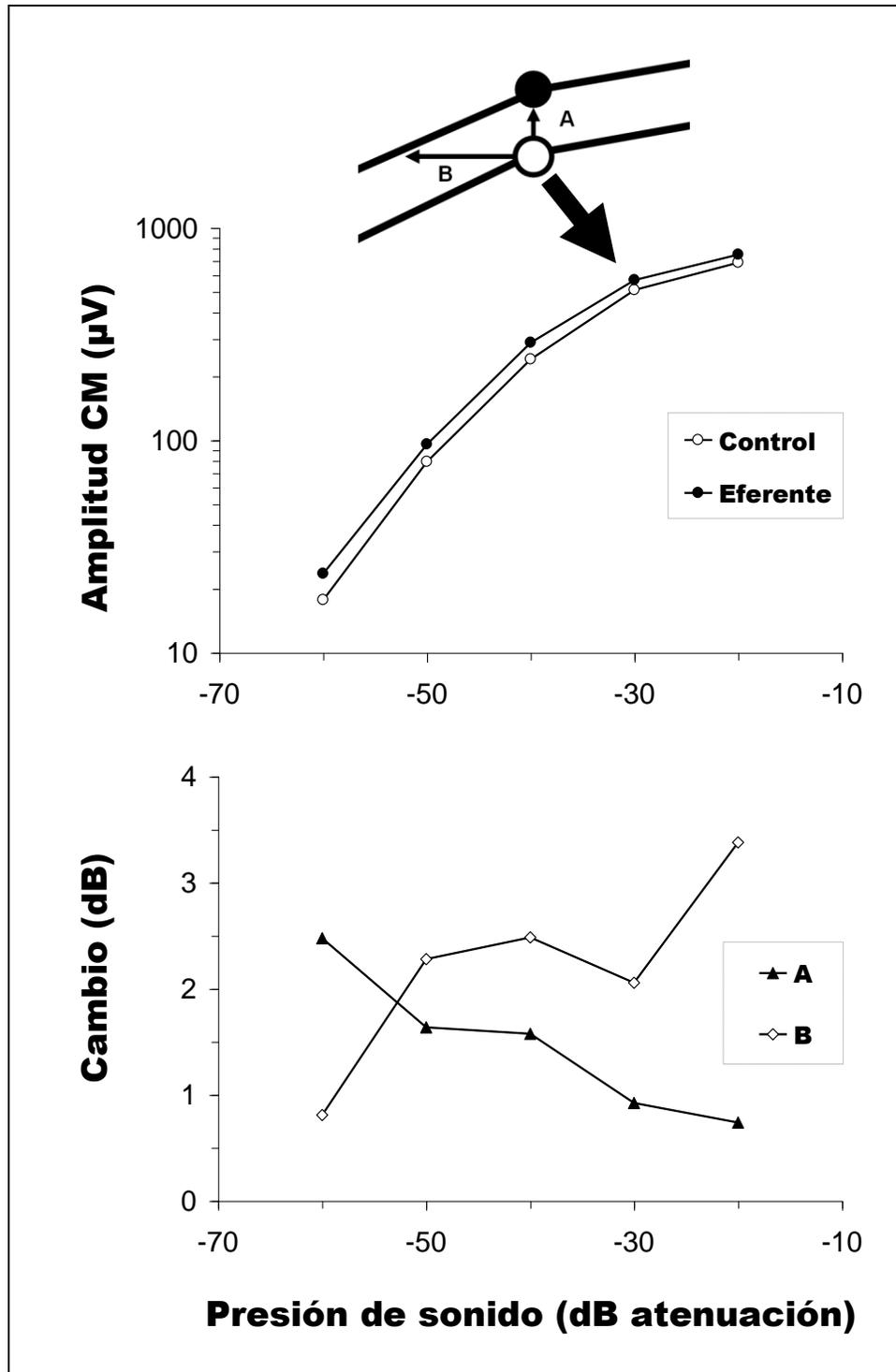
Si bien en algunos estudios se ha reportado que el incremento de los CM es mayor mientras más alta sea la intensidad del estímulo acústico (Konishi y Slepian, 1970; Gifford y Guinan, 1987), en esta memoria de título se encontró que, al igual que en el efecto sobre el CAP, el cambio era mayor a menor intensidad de estímulo acústico. Esta diferencia se debe principalmente al método usado por estos autores para medir el cambio provocado por la estimulación eferente, ya que ellos estiman la atenuación o ganancia del estímulo acústico equivalente para

obtener potenciales de la amplitud obtenida bajo estimulación eléctrica (cálculo también llamado cambio horizontal). Al estimar el cambio de amplitud mediante este método, es posible observar diferencias mayores a intensidades altas de estímulo acústico (figura 24). Además, en esos estudios se utilizaron principalmente clics y tonos de altas frecuencias ( $\geq 6$  KHz), estímulos que actualmente se sabe que no son los ideales para estudiar los CM. Concordando con nuestros datos, Rajan en 1990 encontró que los incrementos de CM producidos por estimulación eferente eran mayores mientras menor fuese la intensidad de los tonos de bajas frecuencias (200 Hz). Asimismo, Gifford y Guinan (1987) demostraron que el cambio de amplitud en referencia al control era mayor a menores intensidades de clic.

Antes de esta memoria de título, nunca se había explorado la posibilidad de algún cambio en la fase de los CM provocado por la estimulación de la vía eferente. En los datos obtenidos se observó un retraso de fase que puede tener directa relación con un cambio en la fase de la respuesta mecánica coclear. Murugasu y Russell (1996), reportaron no haber observado cambios en la fase de la respuesta mecánica coclear al variar la frecuencia o intensidad del estímulo acústico. Posteriormente, Cooper y Guinan (2003), con un mejoramiento en el paradigma de experimentación y en la técnica de registro, encontraron cambios significativos en la fase de la respuesta coclear al estimular eléctricamente el piso del cuarto ventrículo.

La información obtenida en este estudio es de gran importancia para futuros experimentos que se realizarán en el laboratorio, que abordarán la influencia de la

estimulación eléctrica de la vía eferente auditiva en la respuesta mecánica coclear.



**Figura 24.** Arriba: diferentes formas de medir el efecto de la estimulación eferente sobre el potencial de receptor (CM) en una curva de entrada-salida. Abajo: comportamiento del efecto eferente de los CM a diferentes intensidades de estimulación acústica de acuerdo a los dos métodos de medición. (ch50, tonos de 1 KHz).

## **6. Posible influencia de la integridad del oído medio.**

La influencia de los músculos del oído medio (tensor del tímpano y estapedio) ha sido controversial en este tipo de experimentos. Pese a que generalmente en los estudios realizados se intenta eliminar el factor de los músculos del oído medio (mediante la sección de éstos o parálisis farmacológica), también se han realizado experimentos en que los músculos se han dejado intactos mientras se monitorea la actividad de estos (Cooper y Guinan, 2003).

En el presente estudio, los primeros experimentos se realizaron con ambos músculos intactos, debido principalmente a la gran dificultad técnica que significa cortar el músculo estapedio y a la carencia de instrumental quirúrgico para tal procedimiento. Posteriormente, se pudo incorporar la sección de ambos músculos en el protocolo experimental, lo que nos dio la oportunidad de comparar los datos obtenidos en ambas situaciones. Pese a que no obtuvimos grandes diferencias entre ambas situaciones, cabe destacar que la máxima disminución que obtuvimos en el CAP (26 dB) ocurrió en un experimento con ambos músculos intactos. También, en algunos de estos mismos experimentos, se observaron reducciones en vez de los esperados incrementos en la amplitud de los CM.

## **7. Controles efectuados.**

A lo largo del estudio, varias situaciones apoyaron la idea de que los efectos observados corresponden a una actividad biológica, y que efectivamente se estimuló el haz olivo-coclear:

- Al cambiar la ubicación o profundidad del electrodo de estimulación los efectos observados fueron de menor magnitud o incluso desaparecían.
- Algunos experimentos fallaron simplemente porque, pese a haber estimulado eléctricamente el tronco encefálico, no se encontró la ubicación correcta de los electrodos de estimulación.
- En algunos experimentos en que se dañó accidentalmente el tronco encefálico no fue posible encontrar efectos.
- Se utilizaron varios pre-amplificadores, lo que descarta que los efectos observados fueran producto de un artefacto eléctrico propio del pre-amplificador en uso.

## CONCLUSIONES

- La activación de las fibras eferentes olivo-cocleares mediales por estimulación eléctrica en la chinchilla produjo cambios en el CAP y CM en respuesta a clics y a tonos de varias frecuencias.
- La estimulación de la vía eferente provocó reducciones en la amplitud del CAP que llegaron hasta 12 dB respecto del control. Tales reducciones son dependientes de la intensidad de la estimulación eléctrica y acústica.
- La estimulación de la vía eferente provocó incrementos en la amplitud del potencial de receptor (CM), que llegaron hasta 2,5 dB respecto del control. Tales incrementos son superiores a intensidades bajas de estimulación acústica.
- La estimulación eléctrica de la vía eferente provocó aumentos en la latencia del CAP y retardos en la fase de los CM, ambos superiores a intensidades bajas de estimulación acústica.
- No se observaron efectos atribuibles al componente lateral del sistema eferente olivo-coclear.
- El periodo óptimo entre la entrega del estímulo acústico tras la estimulación eléctrica (retraso) fue igual o superior a los 30 ms, lo que constituye una diferencia con estudios realizados en otras especies.
- Los músculos del oído medio afectaron la respuesta eléctrica coclear al estimular eléctricamente el piso del cuarto ventrículo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, N. L. 1996. Alojamiento básico y medicina de animales de compañía de bolsillo. In: S. J. Birchard; R. G. Sherding (Eds.). Manual Clínico de Pequeñas Especies. McGraw-Hill Interamericana, México, D.F. pp. 1629-1659.
- AZEREDO, W. J.; KLIMENT, M. L.; MORLEY, B. J.; RELKIN, E.; SLEPECKY, N. B.; STERNS, A.; WARR, W. B.; WEEKLY, J. M.; WOODS, C. I. 1999. Olivocochlear neurons in the chinchilla: a retrograde fluorescent labelling study. *Hear Res* 134: 57-70.
- BÉKÉSY, G. VON 1960. *Experiments in Hearing*. McGraw-Hill, Nueva York, NY, Estados Unidos.
- BROWN, M. C. 1987. Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J Comp Neurol* 260: 605-618.
- BROWN, M. C.; NUTTALL, A. L. 1984. Efferent control of cochlear inner hair cell responses in the guinea-pig. *J Physiol* 354: 625-646.
- BROWN, M. C.; SMITH, D. I.; NUTTALL, A. L. 1983. The temperature dependency of neural and hair cell responses evoked by high frequencies. *J Acoust Soc Am* 73: 1662-1670.

BROWNELL, W. E.; BADER, C. R.; BERTRAND, D.; DE RIBAUPIERRE, Y. 1985.

Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227: 194-196.

COOPER, N. P.; GUINAN, J. J., JR. 2003. Separate mechanical processes underlie fast and slow effects of medial olivocochlear efferent activity. *J Physiol* 548: 307-312.

COREY, D. P.; SOTOMAYOR, M. 2004. Hearing: tightrope act. *Nature* 428: 901-903.

DÉLANO, P.; ROBLES, I.; ROBLES, L. 2005. Sistema eferente auditivo. *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* 65: 55-62.

DESMEDT, J. E. 1962. Auditory-evoked potentials from cochlea to cortex as influenced by activation of the efferent olivo-cochlear bundle. *J Acoust Soc Am* 34: 1478-1496.

ELGOYHEN, A. B.; JOHNSON, D. S.; BOULTER, J.; VETTER, D. E.; HEINEMANN, S. 1994. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79: 705-715.

FEX, J. 1959. Augmentation of cochlear microphonic by stimulation of efferent fibres to the cochlea; preliminary report. *Acta Otolaryngol* 50: 540-541.

- FEX, J. 1967. Efferent inhibition in the cochlea related to hair-cell dc activity: study of postsynaptic activity of the crossed olivocochlear fibres in the cat. *J Acoust Soc Am* 41: 666-675.
- GALAMBOS, R. 1956. Suppression of auditory nerve activity by stimulation of efferent fibers to cochlea. *J Neurophysiol* 19: 424-437.
- GIFFORD, M. L.; GUINAN, J. J., JR. 1987. Effects of electrical stimulation of medial olivocochlear neurons on ipsilateral and contralateral cochlear responses. *Hear Res* 29: 179-194.
- GUINAN, J. J., JR. 1996. Physiology of olivocochlear efferents. **In:** P. Dallos; A. Popper; R. Fay (Eds.). *The Cochlea*. Springer-Verlag, Nueva York, NY, Estados Unidos. pp. 435–502.
- GUINAN, J. J., JR.; STANKOVIC, K. M. 1996. Medial efferent inhibition produces the largest equivalent attenuations at moderate to high sound levels in cat auditory-nerve fibers. *J Acoust Soc Am* 100: 1680-1690.
- HEFFNER, R. S.; HEFFNER, H. E. 1991. Behavioral hearing range of the chinchilla. *Hear Res* 52: 13-16.
- HUDSPETH, A. J. 2000. Hearing. **In:** E. Kandel; J. H. Schwartz; T. M. Jessell (Eds.). *Principles of Neural Science*. 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill, Nueva York, NY, Estados Unidos. pp. 590-613.

- IURATO, S.; SMITH, C. A.; ELDREDGE, D. H.; HENDERSON, D.; CARR, C.; UENO, Y.; CAMERON, S.; RICHTER, R. 1978. Distribution of the crossed olivocochlear bundle in the chinchilla's cochlea. *J Comp Neurol* 182: 57-76.
- JAMES, A. L.; HARRISON, R. V.; PIENKOWSKI, M.; DAJANI, H. R.; MOUNT, R. J. 2005. Dynamics of real time DPOAE contralateral suppression in chinchillas and humans. *Int J Audiol* 44: 118-129.
- KAWASE, T.; DELGUTTE, B.; LIBERMAN, M. C. 1993. Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J Neurophysiol* 70: 2533-2549.
- KAWASE, T.; LIBERMAN, M. C. 1993. Antimasking effects of the olivocochlear reflex. I. Enhancement of compound action potentials to masked tones. *J Neurophysiol* 70: 2519-2532.
- KEMP, D. T. 1978. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 64: 1386-1391.
- KONISHI, T.; KELSEY, E. 1970. Effect of calcium deficiency on cochlear potentials. *J Acoust Soc Am* 47: 1055-1062.
- KONISHI, T.; SLEPIAN, J. Z. 1971. Effects of the electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on cochlear potentials recorded with intracochlear electrodes in guinea pigs. *J Acoust Soc Am* 49: 1762-1769.

- LIBERMAN, M. C.; GAO, J.; HE, D. Z.; WU, X.; JIA, S.; ZUO, J. 2002. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419: 300-304.
- MCMAHON, C. M.; BROWN, D. J.; PATUZZI, R. B. 2004. Transient focal cooling at the round window and cochlear nucleus shows round window CAP originates from cochlear neurones alone. *Hear Res* 190: 75-86.
- MILLER, J. D. 1970. Audibility curve of the chinchilla. *J Acoust Soc Am* 48: 513-523.
- MØLLER, A. R. 1983. On the origin of the compound action potentials (N1, N2) of the cochlea of the rat. *Exp Neurol* 80: 633-644.
- MURUGASU, E.; RUSSELL, I. J. 1996. The effect of efferent stimulation on basilar membrane displacement in the basal turn of the guinea pig cochlea. *J Neurosci* 16: 325-332.
- NELSON, D. A.; KIESTER, T. E. 1978. Frequency discrimination in the chinchilla. *J Acoust Soc Am* 64: 114-126.
- OATMAN, L. C. 1971. Role of visual attention on auditory evoked potentials in unanesthetized cats. *Exp Neurol* 32: 341-356.
- OLIVER, D.; HE, D. Z.; KLOCKER, N.; LUDWIG, J.; SCHULTE, U.; WALDEGGER, S.; RUPPERSBERG, J. P.; DALLOS, P.; FAKLER, B. 2001. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science* 292: 2340-2343.

- PATUZZI, R.; RAJAN, R. 1990. Does electrical stimulation of the crossed olivo-cochlear bundle produce movement of the organ of Corti? *Hear Res* 45: 15-32.
- RAJAN, R. 1995. Involvement of cochlear efferent pathways in protective effects elicited with binaural loud sound exposure in cats. *J Neurophysiol* 74: 582-597.
- RASMUSSEN, G. L. 1946. The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 84: 141-220.
- RASMUSSEN, G. L. 1960. Efferent fibers of the cochlear nerve and cochlear nucleus. **In:** G. L. Rasmussen; W. F. Windle (Eds.). *Neural mechanisms of the auditory and vestibular systems*. Thomas, Springfield, IL, Estados Unidos. pp. 105-115.
- RHODE, W. S. 1971. Observations of the vibration of the basilar membrane in squirrel monkeys using the Mossbauer technique. *J Acoust Soc Am* 49: Suppl 2:1218+.
- RHODE, W. S.; ROBLES, L. 1974. Evidence from Mossbauer experiments for nonlinear vibration in the cochlea. *J Acoust Soc Am* 55: 588-596.
- ROBLES, L. 2001. Respuesta mecánica y amplificación coclear. **In:** H. Suárez; R. Velluti (Eds.). *La Córlea Fisiología y Patología*. Ediciones Trilce, Montevideo, Uruguay. pp. 39-58.

- ROBLES, L.; RUGGERO, M. A. 2001. Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81: 1305-1352.
- SAHLEY, T. L.; KALISH, R. B.; MUSIEK, F. E.; HOFFMAN, D. W. 1991. Effects of opioid drugs on auditory evoked potentials suggest a role of lateral olivocochlear dynorphins in auditory function. *Hear Res* 55: 133-142.
- SEWELL, W. F. 1996. Neurotransmitters and Synaptic Transmission. **In:** P. Dallos; A. Popper; R. Fay (Eds.). *The Cochlea*. Springer-Verlag, Nueva York, NY, Estados Unidos. pp. 503–533.
- SIEGEL, J. H.; KIM, D. O. 1982. Efferent neural control of cochlear mechanics? Olivocochlear bundle stimulation affects cochlear biomechanical nonlinearity. *Hear Res* 6: 171-182.
- SIEMENS, J.; LILLO, C.; DUMONT, R. A.; REYNOLDS, A.; WILLIAMS, D. S.; GILLESPIE, P. G.; MULLER, U. 2004. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 428: 950-955.
- SÖLLNER, C.; RAUCH, G. J.; SIEMENS, J.; GEISLER, R.; SCHUSTER, S. C.; MULLER, U.; NICOLSON, T. 2004. Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells. *Nature* 428: 955-959.
- SPOENDLIN, H. 1974. Neuroanatomy of the cochlea. **In:** E. Zwicker; E. Terhardt (Eds.). *Facts and Models in Hearing*. Springer-Verlag, Nueva York, NY, Estados Unidos. pp. 18-36.

- SPOTORNO, A. E.; ZULETA, C. A.; VALLADARES, J. P.; DEANE, A. L.;  
JIMÉNEZ, J. E. 2004. Chinchilla laniger. Mammalian Species 758: 1-9.
- VELLUTI, R. A. 1997. Interactions between sleep and sensory physiology. J Sleep Res 6: 61-77.
- WARR, W. B. 1975. Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. J Comp Neurol 161: 159-181.
- WARR, W. B. 1992. Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. In: D. B. Webster; A. N. Popper; R. R. Fay (Eds.). The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy. Springer-Verlag, Nueva York, NY, Estados Unidos. pp. 410-448.
- WARR, W. B.; GUINAN, J. J., JR. 1979. Efferent innervation of the organ of corti: two separate systems. Brain Res 173: 152-155.
- WIEDERHOLD, M. L.; KIANG, N. Y. 1970. Effects of electric stimulation of the crossed olivocochlear bundle on single auditory-nerve fibers in the cat. J Acoust Soc Am 48: 950-965.
- WIEDERHOLD, M. L.; PEAKE, W. T. 1966. Efferent inhibition of auditory-nerve responses: dependence on acoustic-stimulus parameters. J Acoust Soc Am 40: 1427-1430.

WINSLOW, R. L.; SACHS, M. B. 1987. Effect of electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle on auditory nerve response to tones in noise. J Neurophysiol 57: 1002-1021.

ZHENG, J.; SHEN, W.; HE, D. Z.; LONG, K. B.; MADISON, L. D.; DALLOS, P. 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. Nature 405: 149-155.

ZHENG, X. Y.; HENDERSON, D.; HU, B. H.; DING, D. L.; MCFADDEN, S. L. 1997. The influence of the cochlear efferent system on chronic acoustic trauma. Hear Res 107: 147-159.

ZHENG, X. Y.; HENDERSON, D.; MCFADDEN, S. L.; DING, D. L.; SALVI, R. J. 1999. Auditory nerve fiber responses following chronic cochlear de-efferentation. J Comp Neurol 406: 72-86.

ZHENG, X. Y.; HENDERSON, D.; MCFADDEN, S. L.; HU, B. H. 1997. The role of the cochlear efferent system in acquired resistance to noise-induced hearing loss. Hear Res 104: 191-203.

ZHENG, X. Y.; MCFADDEN, S. L.; HENDERSON, D.; DING, D. L.; BURKARD, R. 2000. Cochlear microphonics and otoacoustic emissions in chronically de-efferented chinchilla. Hear Res 143: 14-22.

# APÉNDICE Nº 1

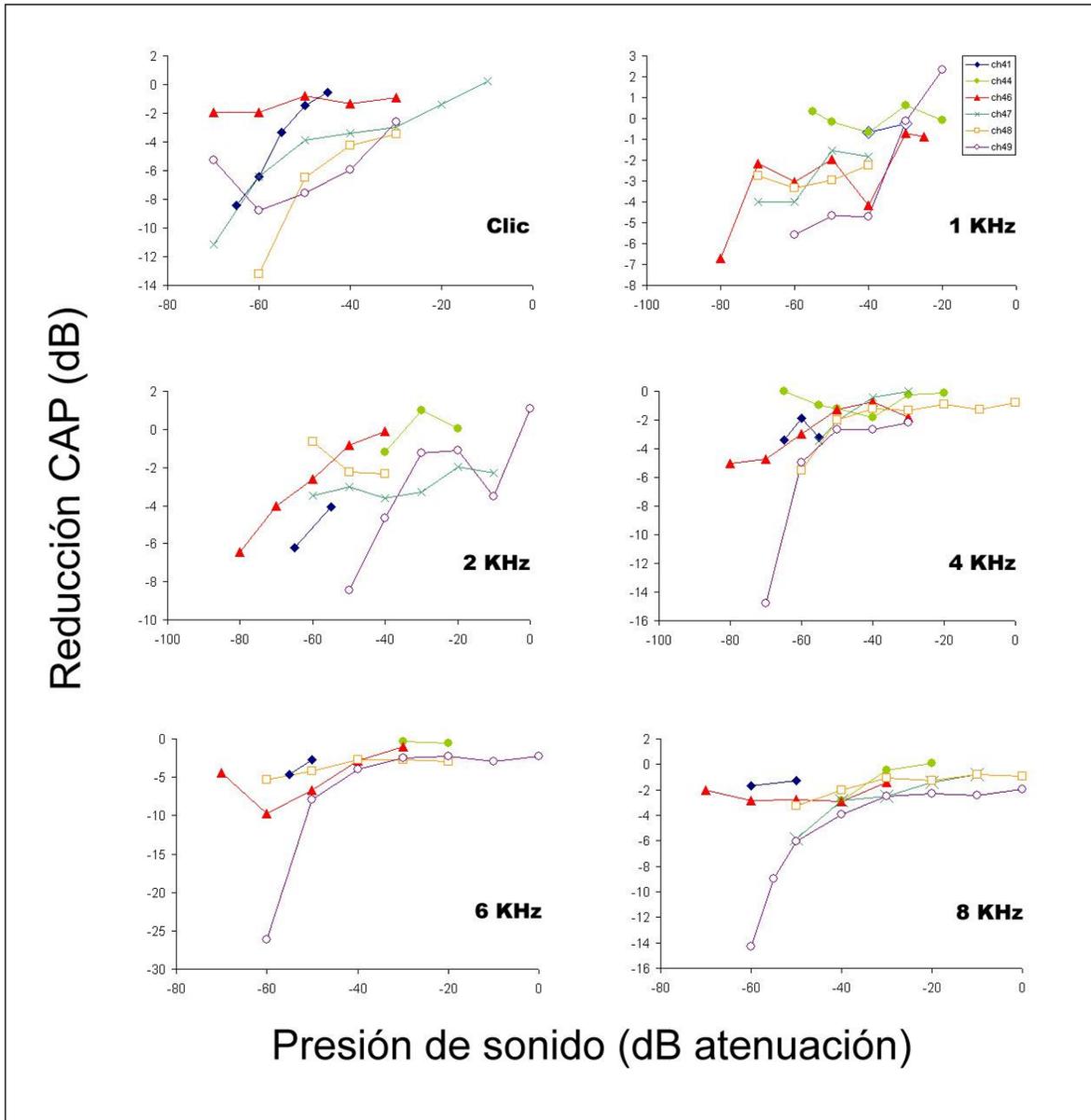


Figura 25. Reducción de CAP en animales en que los músculos del oído medio permanecieron intactos.

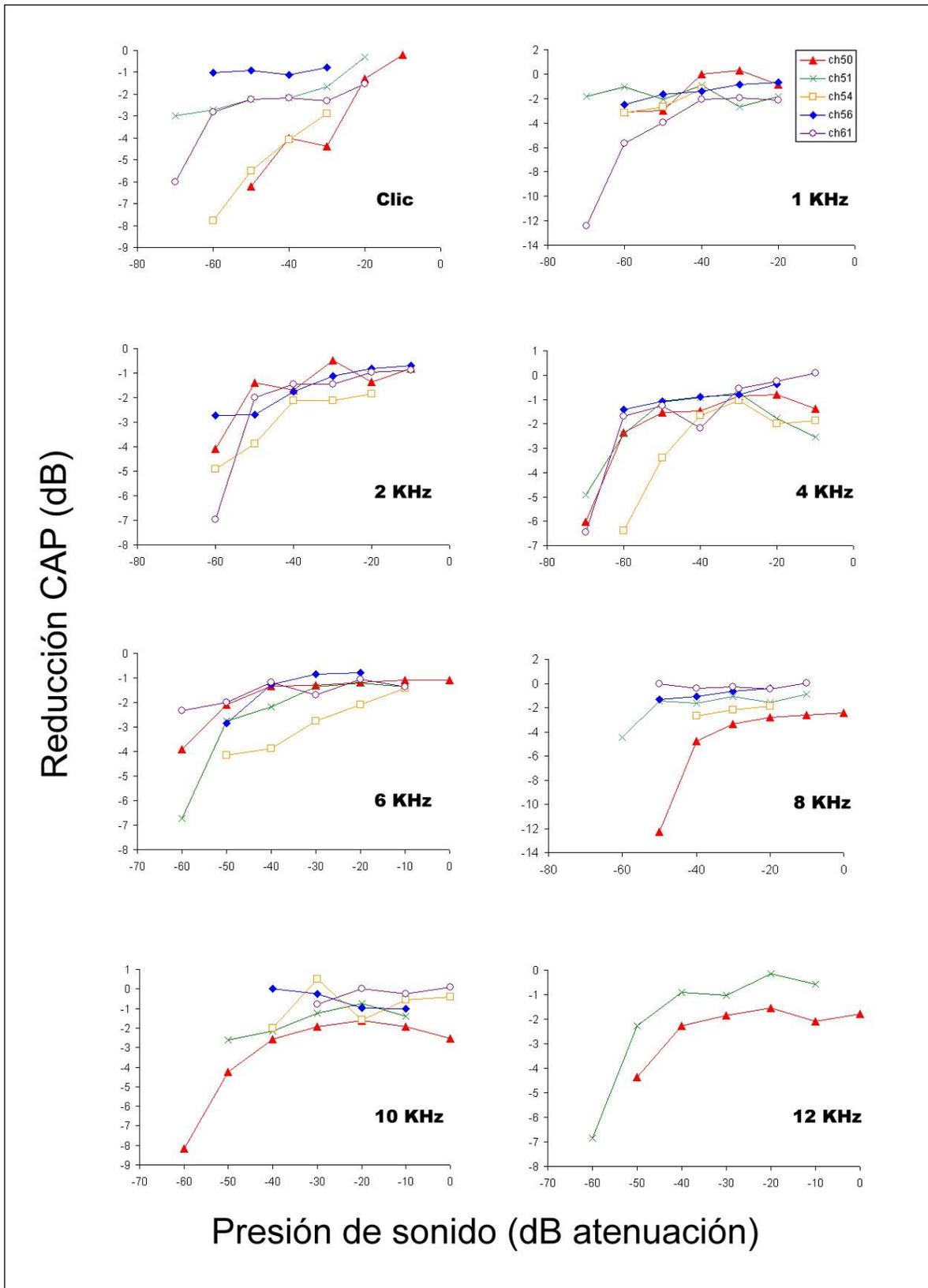


Figura 26. Reducción de CAP en animales en que los músculos del oído medio fueron seccionados.