



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA DEL OÍDO
CONTRALATERAL EN LA RESPUESTA COCLEAR
DE *Chinchilla laniger*

CRISTIAN RODRIGO VÁSQUEZ ARANDA

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

PROFESOR GUIA: LUIS ROBLES WOBBE

SANTIAGO – CHILE

2010



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ACÚSTICA DEL OÍDO
CONTRALATERAL EN LA RESPUESTA COCLEAR
DE *Chinchilla laniger***

CRISTIAN RODRIGO VÁSQUEZ ARANDA

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

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : LUIS ROBLES
PROFESOR CONSEJERO : RIGOBERTO SOLÍS
PROFESOR CONSEJERO : MARIO PENNA

SANTIAGO – CHILE

2010

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar, quiero agradecer sinceramente a mi tutor, el profesor Luis Robles por su acogida en el laboratorio, su constante ayuda y preocupación en todos los aspectos, tanto personales como en el desarrollo de mi tesis.

También quiero agradecer en forma especial a Diego Elgueda por toda su ayuda y apoyo como amigo. Me gustaría dar las gracias también a Paul Délano por sus valiosos consejos y a Fernando Vergara por toda su ayuda y por brindarme su amistad durante mi estadía en el laboratorio.

Además, quiero destacar el apoyo recibido por la Fundación Guillermo Puelma por medio de la beca de apoyo para la realización de mi memoria y por la ayuda brindada para presentar los resultados de mi tesis en I Congreso IBRO/LARC de Neurociencias realizado en Buzios, Brasil.

Por ultimo, no puedo dejar de agradecer a mi familia por todo el apoyo que me brindaron durante este tiempo.

Dedico esta memoria de título a mi hija Antonia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	4
REVISION BIBLIOGRÁFICA	6
1) Generalidades del sistema auditivo.....	6
2) La cóclea y el órgano de Corti.....	7
3) Respuesta mecánica coclear.....	11
4) Transducción mecano-eléctrica.....	14
5) Vía aferente auditiva.....	16
6) Vía eferente auditiva.....	18
6.1) Anatomía del sistema eferente.....	18
6.2) Neurotransmisores de la vía olivococlear.....	20
6.3) Fisiología del sistema eferente.....	21
6.4) Posibles funciones del sistema eferente.....	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
1) Objetivo principal.....	26
2) Objetivos específicos.....	26

MATERIALES Y MÉTODOS	27
1) Lugar y duración del estudio.....	27
2) Grupo experimental.....	27
3) Procedimientos quirúrgicos.....	28
4) Registro de potenciales cocleares.....	29
5) Protocolo experimental.....	30
6) Análisis de datos.....	31
7) Control con tetrodotoxina (TTX).....	32
RESULTADOS	34
1) Efectos de la estimulación acústica contralateral sobre el CAP.....	36
2) Sintonización del efecto eferente en la respuesta coclear.....	40
3) Efectos en latencia del CAP.....	43
4) Efectos de la tetrodotoxina (TTX).....	44
5) Otros controles realizados.....	46
DISCUSIÓN	48
1) Comentarios generales.....	48
2) Efectos de la estimulación contralateral sobre el CAP.....	49
3) Efectos en los potenciales microfónicos.....	52
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54

RESUMEN

Existen dos tipos de células receptoras en la cóclea de los mamíferos, las células ciliadas internas, innervadas por fibras del nervio auditivo aferente y las células ciliadas externas, que reciben principalmente innervación eferente del tronco cerebral. A pesar de su obvia importancia anatómica, la función de estas fibras eferentes sigue siendo poco conocida. La estimulación de las fibras eferentes auditivas mediante estimulación acústica contralateral se ha intentado en la chinchilla con resultados contradictorios. Dado que la chinchilla posee una distribución anatómica de las fibras eferentes diferente a la de otras especies, se hace necesario indagar más sobre este tema, para así establecer la importancia del sistema eferente en la chinchilla.

Para este estudio se utilizaron 10 chinchillas adultas (*Chinchilla laniger*), anestesiadas con xilazina y ketamina. El abordaje quirúrgico de la cóclea se realizó a través de una craneotomía posterior de la bulla timpánica. Se registró el potencial de acción compuesto del nervio auditivo (CAP), por medio de un electrodo de alambre de plata ubicado en la membrana de la ventana redonda, en respuesta a tonos ipsilaterales de diferentes frecuencias, en presencia y en ausencia de un estímulo acústico contralateral.

La activación de las fibras eferentes a través de estimulación acústica contralateral produjo reducciones en la amplitud del CAP que llegaron hasta 12 dB, las que fueron de mayor magnitud para bajas intensidades de estimulación acústica ipsilateral. Además, se encontró que la supresión del CAP era

dependiente de la frecuencia de los estímulos, siendo mayor para frecuencias similares en ambos oídos. La estimulación acústica contralateral de la vía eferente olivococlear en chinchillas anestesiadas produce una modulación tonotópica de la sensibilidad coclear, es decir, las reducciones del CAP son mayores al usar frecuencias de estímulos contralaterales cercanas o iguales a la de los tonos ipsilaterales. Estos resultados muestran la existencia de una distribución tonotópica de las fibras eferentes olivococleares a lo largo de la cóclea de la chinchilla.

SUMMARY

There are two types of receptor cells in the cochlea of mammals, the inner hair cells, innervated by afferent fibers of the auditory nerve and the outer hair cells, mainly innervated by efferent fibers originating in the brainstem. Despite its obvious anatomical importance, the function of these efferent fibers is still poorly known. Stimulation of the auditory efferent fibers by contralateral acoustic stimulation has been attempted in Chinchilla with conflicting results. Since it is known that the chinchilla displays a different anatomical distribution of efferent fibers from that of other species, it becomes necessary to inquire more about this subject, to establish the importance of the efferent system in the chinchilla.

For this study we used 10 adult chinchillas (*Chinchilla laniger*), anesthetized with xylazine and ketamine. The surgical approach of the cochlea was performed through a craniotomy of the posterior tympanic bulla. Auditory-nerve compound

action potentials (CAP) were recorded, through a silver-wire electrode placed on the round window membrane, in response to ipsilateral tones of different frequencies, in the presence and absence of contralateral acoustic stimuli.

Activation of efferent fibers through the contralateral acoustic stimulation produced decreases in CAP amplitude that reached up to 12 dB, that were larger for low intensity ipsilateral acoustic stimulation. In addition, we found that CAP reductions were dependent on the frequency of stimulation, being maximal for similar frequencies in both ears. Contralateral acoustic stimulation of the olivocochlear efferent pathway in anesthetized chinchillas produces a tonotopic modulation of cochlear sensitivity, that is, CAP reductions are larger when using contralateral stimulation frequencies close or equal to those of ipsilateral tones. These results show a tonotopic distribution of olivocochlear efferent fibers along the chinchilla cochlea.

INTRODUCCIÓN

El sistema auditivo nos permite detectar e interpretar los sonidos, que son transportados por vibraciones mecánicas que se propagan por el ambiente, con gran precisión y sensibilidad. En el oído interno se encuentra la cóclea, órgano receptor donde se produce la transducción mecano-eléctrica, que transforma las vibraciones mecánicas del estímulo en impulsos eléctricos que viajan a través de las vías neuronales aferentes en dirección a la corteza auditiva. La cóclea posee una gran sensibilidad a estímulos mecánicos, la que es alcanzada por medio de un proceso activo, que aumenta la sensibilidad y selectividad de frecuencias de la respuesta mecánica. Este proceso activo se conoce como amplificador coclear y actualmente se acepta que su componente motor estaría radicado en las células ciliadas externas del órgano de Corti

La anatomía coclear muestra que existe una importante inervación eferente, lo que hace posible plantear la hipótesis de que el sistema nervioso central tendría un rol modulador sobre la percepción auditiva aún a nivel coclear. Se han atribuido diversas funciones a este sistema eferente, aunque hacen falta estudios que indiquen su importancia con mayor claridad. Uno de los métodos que se ha utilizado para estudiar el efecto de la activación del sistema eferente ha sido la estimulación acústica contralateral. Este tipo de estimulación tiene ventajas por sobre otros métodos (p. ej. estimulación eléctrica) por ser más fisiológica y menos invasiva. Sin embargo, se han investigado sus efectos en la chinchilla con resultados contradictorios. El presente estudio pretende establecer la influencia de

la estimulación acústica contralateral en forma directa sobre los potenciales cocleares del oído ipsilateral.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1) Generalidades del sistema auditivo

El sistema auditivo esta formado por un conjunto de estructuras altamente especializadas en detectar, transformar, conducir e integrar la información de los estímulos que llevan a la percepción del sonido, y tiene un rol fundamental en el monitoreo del medio ambiente y en la comunicación de los animales con otros seres vivos.

Los componentes del receptor auditivo se dividen en 3 partes; oído externo, medio e interno (figura 1). El oído externo se encuentra formado por la pinna o aurícula, compuesta por cartílago y cubierta de piel. Su función es capturar y dirigir los estímulos acústicos hasta el meato auditivo externo. El oído medio está formado por una cámara de resonancia y una cadena de tres pequeños huesecillos: martillo, yunque y estribo, que transmiten la vibración sonora desde el tímpano hasta la ventana oval de la cóclea. El oído interno esta constituido por la cóclea y el laberinto, órganos especializados en la detección y transducción de vibraciones mecánicas, producidas por sonidos en el primer caso y por aceleraciones del cuerpo en el segundo (Hudspeth, 2000).

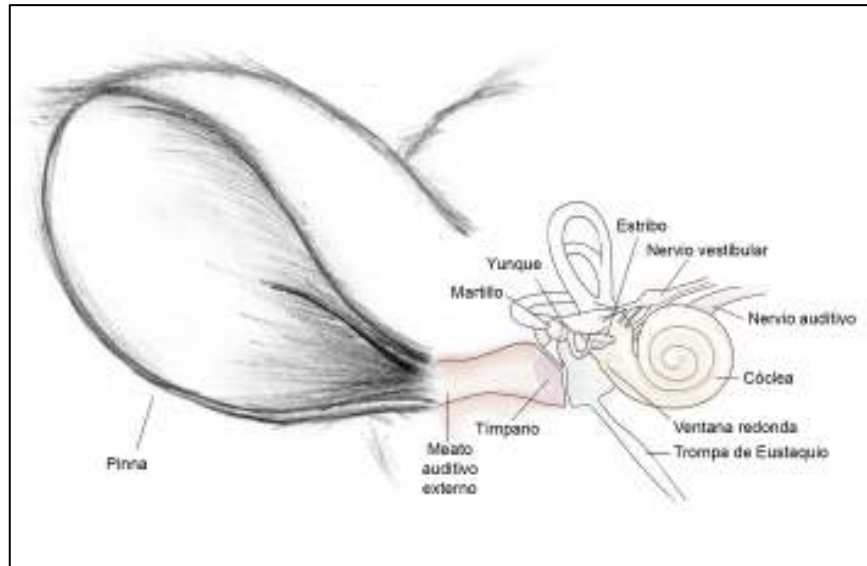


Figura 1. Principales componentes del receptor auditivo en mamíferos.

2) La cóclea y el órgano de Corti

En el oído interno se ubica la cóclea. Esta estructura se encuentra dentro de una cubierta ósea de forma cónica llamada capsula ótica (Robles y Ruggero, 2001), la que posee en su zona basal dos aperturas; la ventana redonda y la ventana oval, sobre la cual está apoyada la base del estribo.

La ventana redonda en la chinchilla posee 3 capas: un epitelio externo que mira al oído medio, una capa media de tejido conectivo, y un epitelio interno que mira hacia el oído interno. El grosor de la ventana redonda en esta especie es de 10-14 micrones. La función de esta membrana es liberar energía mecánica (debido al efecto de pistón del estribo) de los líquidos del oído interno y/o de conducir sonido a la escala timpánica (Schachern *et al.*, 1982)

Al realizar un corte transversal en una de las vueltas de la cóclea se puede ver que se compone de 3 tubos membranosos adyacentes, más conocidos como

rampas, las que se encuentran enrolladas formando una especie de caracol. En la figura 2 se aprecia la rampa vestibular y timpánica, además de la rampa media, que se encuentra separada de la rampa vestibular por la membrana de Reissner y de la rampa timpánica por la membrana basilar. El fluido que llena estas cavidades se denomina perilinfa, en el caso de la rampa vestibular y timpánica; y endolinfa en el caso de la rampa media, y tienen muy diferentes composiciones iónicas. La perilinfa tiene una composición semejante a la del medio extracelular, con baja concentración relativa de potasio y altas concentraciones de sodio y calcio, mientras que la endolinfa tiene un alto contenido de potasio y muy baja concentración de sodio y de calcio. Además, la endolinfa de la rampa media se encuentra a un potencial eléctrico positivo ($\sim +80$ mV) con respecto a las rampas timpánica y vestibular, éste se conoce como potencial endococlear (Hudspeth, 2000).

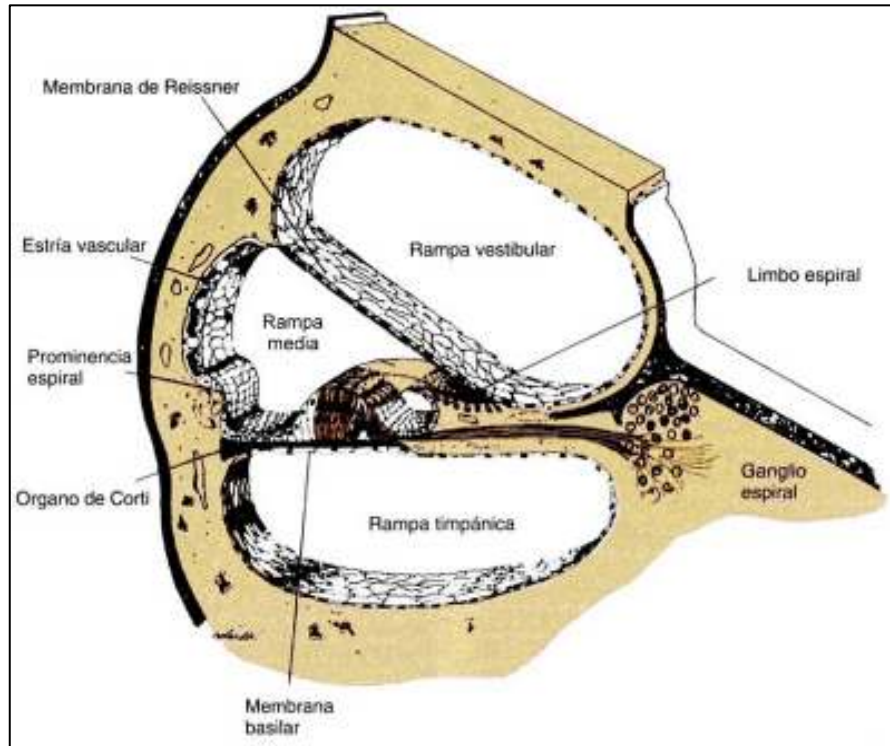


Figura 2. Sección a través de una de las vueltas de la cóclea

Al interior de la rampa media y sobre la membrana basilar se encuentra el órgano de Corti, que corresponde a una estructura compuesta principalmente por células ciliadas y células de soporte. Las células ciliadas son responsables de la transducción mecano-eléctrica y por sus diferencias morfológicas y funcionales se han dividido en células ciliadas internas (CCI) y células ciliadas externas (CCE) (Warr, 1975).

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

Las células ciliadas se caracterizan por tener en su zona apical un manojo de estereocilios, cuya diferencia con los cilios verdaderos radica en la falta de un

sistema de microtúbulos. Los estereocilios poseen un citoesqueleto de actina que aporta rigidez y un estrechamiento en su inserción en la membrana apical de la célula ciliada que funciona como una bisagra, que permite que el estereocilio se pueda flectar.

El conjunto de estereocilios de una célula ciliada mirada al microscopio, muestra una estructura con forma de bisel, en que los estereocilios están ordenados de menor a mayor longitud a medida que se alejan del eje coclear. Estudios electrofisiológicos han revelado que al flectarse el conjunto de estereocilios hacia el estereocilio más alto se produce la despolarización de la célula y de modo inverso, el desplazamiento en dirección al estereocilio de menor altura hiperpolariza la célula.

Por encima del órgano de Corti, existe una estructura llamada membrana tectorial, la que se encuentra adherida sólo a los estereocilios de mayor tamaño de las CCE. La importancia de esta membrana está en el proceso de transducción mecano-eléctrica, ya que participa en la deflexión del conjunto de estereocilios.

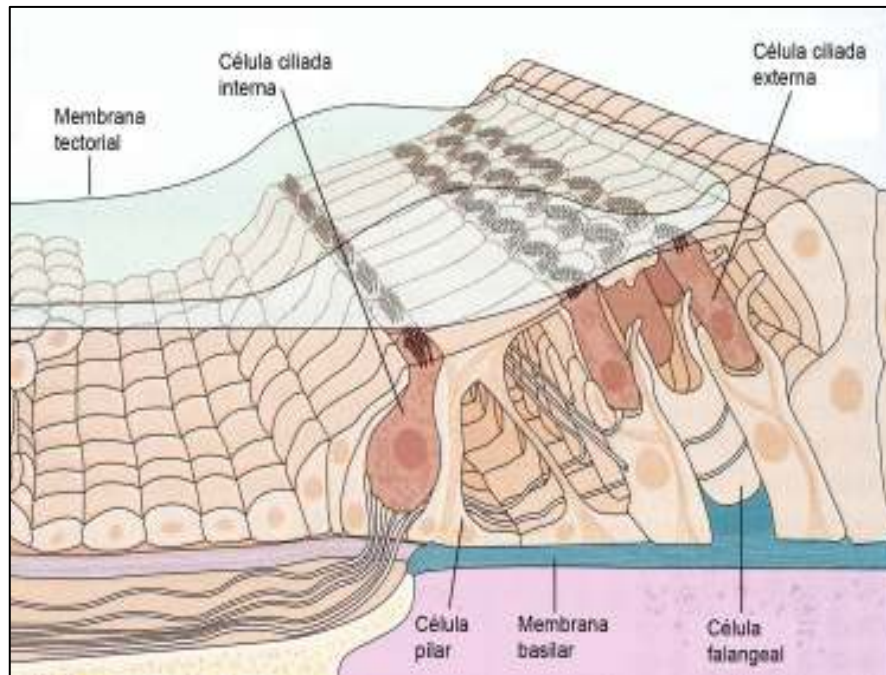


Figura 3. Estructura del órgano de Corti y sus principales componentes.

3) Respuesta mecánica coclear

Una vez que las vibraciones mecánicas llegan a la membrana timpánica, se propagan por los huesecillos del oído medio hacia la ventana oval de la cóclea. Aquí, la base del estribo funciona como un pistón, provocando cambios de presión entre las rampas vestibular y timpánica. Esto produce desplazamientos de la membrana basilar en forma de ondas que viajan desde la base al ápice de la cóclea y que van creciendo en amplitud hasta alcanzar un máximo para luego disminuir repentinamente (Robles y Ruggero, 2001). Este lugar de la membrana basilar donde la “onda viajera” alcanza una máxima amplitud está estrechamente ligado a la frecuencia del estímulo acústico, cada lugar a lo largo de la membrana basilar posee una frecuencia característica, esto es, una frecuencia a la que

responde con máxima amplitud (Békésy, 1960). De esta manera, la respuesta mecánica a estímulos de alta frecuencia será máxima cerca de la zona basal de la cóclea, mientras que la respuesta a frecuencias bajas será máxima cerca del ápice coclear (figura 4). La relación entre la posición anatómica y la frecuencia de estimulación para la cual las células son más sensibles se denomina mapeo tonotópico o tonotopía.

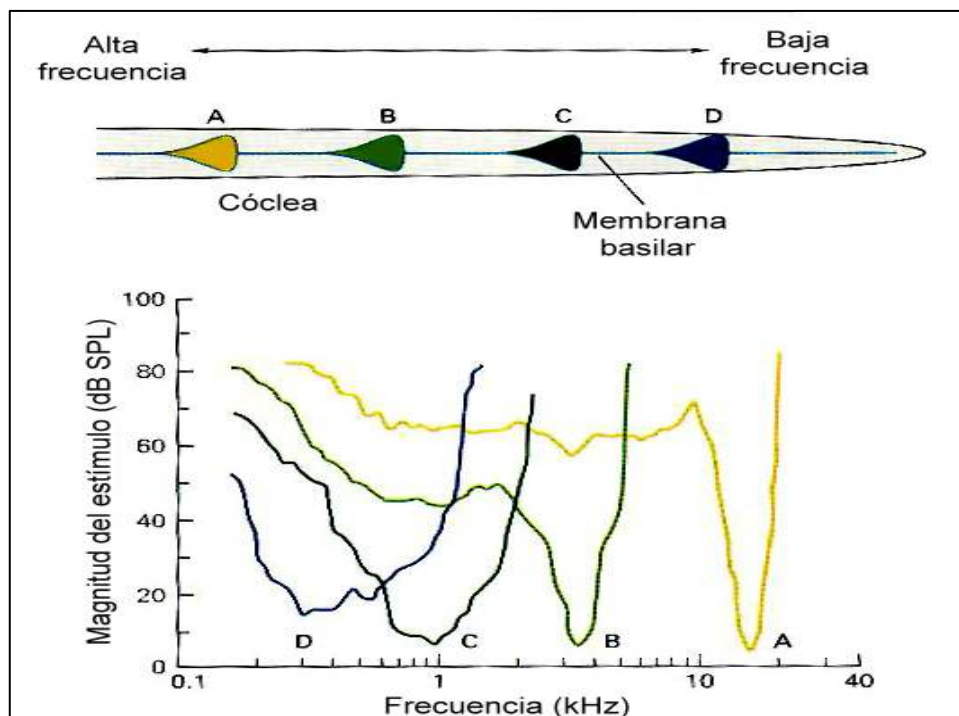


Figura 4. Tonotopía de la respuesta mecánica. En el panel superior se ejemplifica una cóclea desenrollada que muestra la amplitud de la respuesta mecánica ante estímulos acústicos de varias frecuencias. En el panel inferior se muestra la sensibilidad de la respuesta de células ciliadas en diferentes posiciones cocleares a esas frecuencias.

La tonotopía se explica por diferencias anatómicas que posee la membrana basilar en su longitud, ya que en su zona apical es ancha y flexible, mientras que hacia la zona basal es más delgada y rígida. En otras palabras, la membrana se va haciendo más elástica a medida que la onda avanza hacia el ápice de la cóclea. Esto permite que la cóclea funcione como un analizador mecánico de frecuencia, separando cada estímulo sonoro en sus componentes espectrales.

En 1971, se descubrió la existencia de una no-linealidad que modifica la sensibilidad y sintonización de frecuencia de las vibraciones cocleares con la intensidad del estímulo, la cual desaparece con la muerte del animal (Rhode, 1971). Esta no-linealidad se manifiesta como un aumento en la amplitud de la respuesta mecánica para estímulos acústicos de baja intensidad, con frecuencias cercanas a la frecuencia característica.

Por otra parte, en 1978 se descubrieron las llamadas emisiones otoacústicas, que corresponden a sonidos provenientes de la cóclea y que se pueden registrar como cambios de presión en el meato auditivo externo (Kemp, 1978). Este importante descubrimiento llevó a pensar en la posibilidad de un mecanismo biológico activo en la cóclea, el cual se encargaría de amplificar las vibraciones mecánicas cocleares en respuesta a estímulos de baja intensidad. Esto explicaría la extraordinaria sensibilidad y sintonización de frecuencia que caracteriza a la respuesta mecánica coclear para bajos niveles de estimulación acústica. Este mecanismo activo se conoce como amplificador coclear y su origen estaría en las CCEs, ya que se ha observado que éstas presentan motilidad dependiente de voltaje (Brownell *et al.*, 1985).

Estudios recientes han demostrado que esta electro-motilidad estaría dada por una proteína motora llamada prestina (Zheng *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001). Esta es una proteína transmembrana relacionada a la familia de proteínas transportadoras de sulfato/aniones que se encuentra en alta concentración en la membrana latero-basal de las CCEs. Estudios más recientes en una línea de ratones mutantes que no expresan prestina mostraron, *in-vivo*, una notoria pérdida de sensibilidad coclear (40-60 dB), mientras que, *in-vitro*, se vió que sus CCEs carecían de electromotilidad (Liberman *et al.*, 2002).

4) Transducción mecano-eléctrica

El estudio de la transducción mecano-eléctrica se ha llevado a cabo fundamentalmente en preparaciones *in-vitro*, de células ciliadas aisladas de anfibios. De estos experimentos sabemos que en las células ciliadas al desplazar el conjunto de estereocilios se modifica la probabilidad de apertura de canales de transducción mecano-sensibles generando un cambio de potencial de membrana en la célula. En estado de reposo, una célula ciliada posee alrededor del 15% de sus canales de transducción abiertos, lo que determina en parte su potencial de reposo de aproximadamente -60 mV (Hudspeth, 2000).

Las vibraciones de la membrana basilar debido a un estímulo sonoro producen un movimiento radial de la membrana tectorial por sobre el órgano de Corti, lo que produce un movimiento radial de los estereocilios de las células ciliadas. Un estímulo excitatorio se produce cuando el conjunto de estereocilios se desplaza hacia los de mayor altura, ya que esto aumenta la probabilidad de apertura de los canales de transducción y el ingreso de cationes que despolarizan a la célula. De

modo inverso, un estímulo inhibitorio desplaza el conjunto de estereocilios en la dirección de los estereocilios de menor altura, lo que produce el cierre de los canales de transducción que estaban abiertos en reposo y la hiperpolarización de la célula. Los movimientos perpendiculares a la dirección del eje de simetría de la célula no producen efectos en el potencial de membrana. De esta forma, estas células generan un potencial de receptor, el cual tiene una componente alterna con frecuencia igual a la del estímulo acústico y otra componente continua, que se mantiene durante todo el periodo de estimulación. Al registrar inicialmente estos potenciales se vio que se comportaban en forma similar a los de un micrófono, por lo que se les llamó potenciales microfónicos cocleares.

El estudio de estas células ha permitido conocer la existencia de pequeñas estructuras de tipo filamentoso llamados *tip-links* (“uniones de los extremos”) que conectan las puntas de los estereocilios adyacentes. Anteriormente se pensaba que los *tip-links* eran estructuras con características de resorte que se extendían en respuesta a un estímulo excitatorio. Sin embargo, estudios recientes muestran que los principales componentes del *tip-link* corresponden a cadherina-23 y protocadherina-15 (Kazmierczak et al, 2007) que poseen propiedades elásticas muy limitadas. Actualmente, se plantean 2 modelos para la transducción mecano-eléctrica (figura 5), el más aceptado es el modelo de la correa, donde la tensión en el *tip-link* es propagada por interacciones proteína-proteína al canal. Por otro lado, se propone también el modelo de tensión lateral, donde los canales responden a la tensión de la membrana del estereocilio. En este caso, un aumento de tensión en el *tip-link*, aumenta la tensión de la membrana y produce la apertura de los canales (Gillespie, 2009).

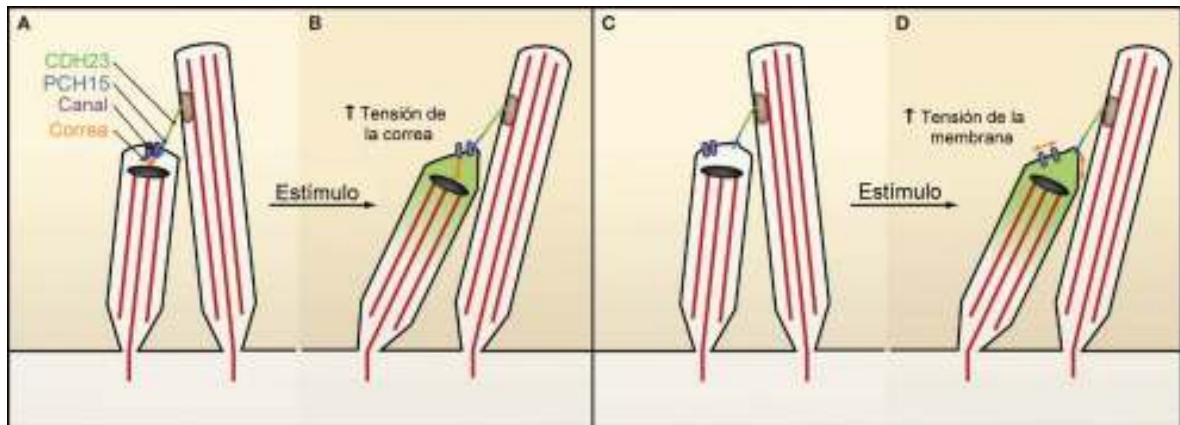


Figura 5. Modelos de transducción mecano-eléctrica en células ciliadas. A y B: Modelo de la correa. Aquí, los canales de transducción se unen directamente a protocadherina-15, cadherina-23 y a la correa, probablemente por fuertes interacciones. El color verde corresponde al flujo de iones derivado de la apertura de los canales. C y D: Modelo de tensión de membrana. Los canales de transducción no están unidos a PCH15 y ante un estímulo positivo se aumenta la tensión de la membrana lateral del estereocilio lo que abre los canales (Modificado de Gillespie, 2009)

5) Vía aferente auditiva

Las neuronas aferentes de los órganos auditivos de todas las especies de vertebrados se caracterizan por ser bipolares, o sea, extienden una rama periférica hacia las células ciliadas internas y otra central hacia el tronco encefálico. El soma de estas neuronas se encuentra en el ganglio espiral el cual es parte de la porción coclear del nervio auditivo (VIII par craneano).

Existen 2 tipos de estas neuronas, el tipo I (90 a 95% de las neuronas aferentes) se caracteriza por poseer axones mielinizados, que no se ramifican y toman contacto con una célula ciliada interna. También existe un pequeño número de

neuronas aferentes tipo II, con axones no mielinizados que se ramifican para contactar varias células ciliadas externas (figura 6).

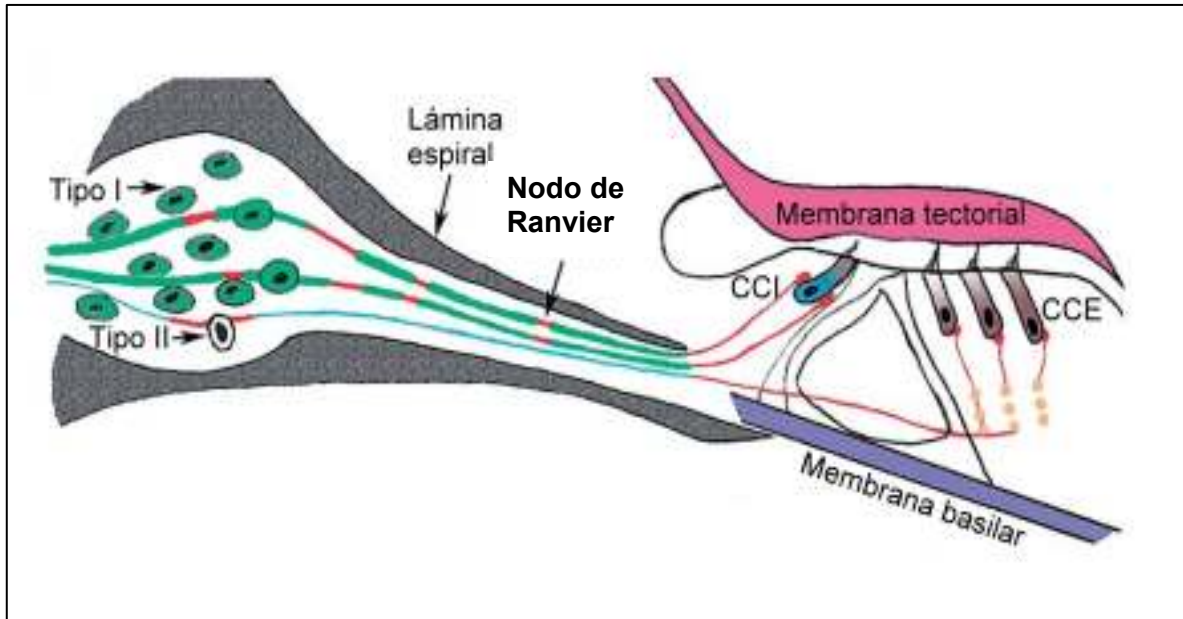


Figura 6. Esquema de la innervación aferente del órgano de Corti. A la izquierda se muestran los somas bipolares de las neuronas aferentes, con axones que van hacia las células ciliadas y hacia el tronco encefálico. En mamíferos, la mayoría de los axones son de neuronas aferentes tipo I, es decir, son mielinizados (verde), no ramificados y toman contacto sináptico con una sola CCI. Mientras que los axones de neuronas tipo II no son mielinizados (celeste) y se ramifican para hacer sinapsis con varias CCEs (Modificado de Rutherford y Roberts, 2008).

Cada CCI hace contacto sináptico con 5 a 30 axones de neuronas aferentes tipo I (Sewell, 1996). Esta variación depende de la especie y la posición de la CCI en el eje tonotópico coclear. Las sinapsis de las células ciliadas con las neuronas aferentes son de tipo químico glutamatérgicas.

6) Vía eferente auditiva

El sistema auditivo posee una compleja vía eferente que comienza en la corteza, específicamente en neuronas piramidales ubicadas en la quinta capa de la corteza auditiva primaria (Mulders y Robertson, 2000), que luego de inervar varios núcleos de la vía auditiva, finalmente se proyecta mediante las vías olivococleares, incluso hasta las células ciliadas de la cóclea. Esta importante vía corticofuga nos muestra que las neuronas corticales podrían ejercer un rol activo en la modulación de la sensibilidad coclear.

6.1) Anatomía del sistema eferente

El estudio de la anatomía de la vía eferente coclear se inició con los estudios realizados por Rasmussen (1946), que pudo identificar un conjunto de fibras eferentes que se originaban en la cara ventral del tronco encefálico, en la región medial del complejo olivar superior. A estas fibras las llamó el haz olivococlear cruzado ya que atraviesan el piso del cuarto ventrículo llegando a la cóclea contralateral. Posteriormente, Rasmussen (1960), describió un segundo grupo de delgadas fibras que se originan en la misma región y se proyectan a la cóclea ipsilateral, conocido como el haz olivococlear no-cruzado.

Los experimentos posteriores realizados por Warr (1975) lograron dilucidar el origen y la distribución de los haces olivococleares cruzados y no-cruzados. De éste y otros estudios (Warr y Guinan, 1979) surgió una nueva clasificación de las fibras olivococleares, en la que de acuerdo a su origen central en el tronco cerebral, las fibras se dividen en un sistema olivococlear medial (MOC) y otro olivococlear lateral (LOC).

Las fibras del MOC poseen axones mielinizados de gran calibre con neuronas que se originan en la región medial del complejo olivar superior, en tanto que las fibras del LOC son más delgadas, con axones amielinizados y provienen de pequeñas neuronas localizadas en la región lateral del complejo olivar superior (figura 7).

Además de la diferencia en el origen de estos dos grupos de fibras olivococleares, también llegan a distintas zonas de la cóclea. Las fibras MOC se proyectan principalmente de forma contralateral haciendo contacto sináptico con las 3 filas de CCE, mientras que las fibras LOC se proyectan mayoritariamente de forma ipsilateral, haciendo sinapsis de tipo axoaxonal con las fibras aferentes provenientes del ganglio espiral que sinaptan a las CCI (Warr y Guinan, 1979).

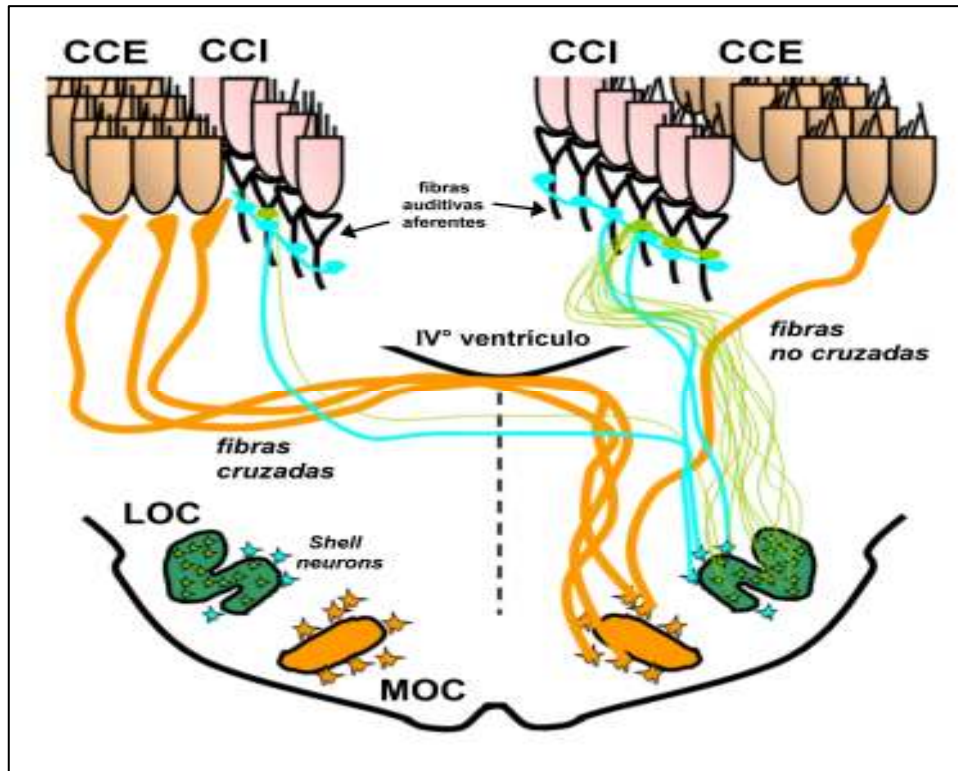


Figura 7. Anatomía y distribución de las fibras eferentes olivococleares en mamíferos. Se han identificado 3 grupos de neuronas eferentes en el complejo olivar superior: Neuronas LOC intrínsecas (verde), neuronas Shell de la oliva superior lateral (celeste) y neuronas MOC de la oliva superior medial (naranja). (Modificado de Robles y Delano, 2008)

6.2) Neurotransmisores de la vía olivococlear

Las sinapsis entre las fibras eferentes olivococleares MOC y las células ciliadas externas son químicas de tipo colinérgico. La acetilcolina activa receptores nicotínicos ubicados en la membrana basolateral de las CCEs (Elgoyhen *et al.*, 1994). Estos receptores están formados por las recientemente identificadas subunidades heteroméricas alfa-9, alfa-10 (Elgoyhen *et al.*, 2001). La liberación de acetilcolina produce el ingreso de calcio lo que activa canales de potasio dependientes de Ca^{++} , generándose una corriente de salida que hiperpolariza la

CCE. En algunas especies también es posible encontrar sinapsis de fibras MOC mediadas por GABA y péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP)

La acetilcolina también está presente en la sinapsis de las fibras LOC con las fibras aferentes, sin embargo existe también evidencia de otros neurotransmisores, como GABA, encefalinas, dopamina y CGRP.

6.3) Fisiología del sistema eferente

El estudio de la fisiología del sistema eferente se ha realizado principalmente a través de dos métodos. Uno es la activación, que puede realizarse mediante estimulación eléctrica de la vía eferente o por estimulación acústica contra o ipsilateral. El otro método es el bloqueo, que puede ser a través de lesiones quirúrgicas, farmacológicamente con neurotransmisores antagonistas o con la supresión genética de genes relevantes.

La fisiología del sistema eferente auditivo, comenzó a estudiarse en 1956 por Galambos, quien logró estimular fibras eferentes aplicando pulsos eléctricos en el piso del cuarto ventrículo. Los resultados de este estudio mostraron una reducción en la amplitud del potencial de acción compuesto del nervio auditivo (CAP) provocado por clics (estímulos acústicos de corta duración con un amplio espectro de frecuencias).

Este efecto supresor es ampliamente conocido y ha sido corroborado en numerosos experimentos (Desmedt, 1962; Wiederhold y Peake, 1966; Gifford y Guinan, 1987). El mecanismo que subyace a este efecto involucra una disminución de la amplitud de los movimientos de la membrana basilar, lo que

muestra una acción inhibitoria del sistema eferente medial sobre el amplificador coclear, disminuyendo la respuesta de las células ciliadas externas (Delano *et al.*, 2005). Este sería el principal mecanismo por el que la estimulación eferente reduce la amplitud del CAP, ya que al disminuir la amplitud de los movimientos de la membrana basilar, se reduce el movimiento de los estereocilios de las células ciliadas internas y por ende la respuesta eléctrica en estas células

Otro de los efectos de la estimulación eferente consiste en la alteración de potenciales cocleares no neurales. Investigaciones realizadas por Fex (1959, 1967) mostraron un aumento en la amplitud del potencial microfónico coclear (CM) registrado desde la ventana redonda de la cóclea. Los CM se producen por una caída de potencial en el circuito coclear, producida por la vibración mecánica que modifica la conductancia en los estereocilios de las células ciliadas externas y, en consecuencia, la corriente que fluye a través de estas células. La estimulación eferente aumenta la conductancia basolateral de las células ciliadas externas y las hiperpolariza, aumentando el flujo de corriente a través de ellas y por lo tanto el potencial microfónico coclear (Robles y Delano, 2007).

La estimulación acústica contralateral constituye una forma más fisiológica de activar el sistema eferente que la estimulación eléctrica. Además, es menos invasiva que la estimulación eléctrica, lo que permite evaluar la función eferente incluso en animales despiertos y en humanos. La mayoría de los experimentos usando estimulación acústica contralateral se han realizado en animales anestesiados. En un estudio efectuado en gatos (Buño, 1978) se demostró que esta estimulación reduce la amplitud del CAP y que el efecto supresor es

altamente dependiente de la intensidad y la frecuencia del estímulo. Posteriormente se comprobó que el efecto supresor se eliminaba con la sección completa del haz olivococlear, pero se mantenía después de cortar las fibras olivococleares cruzadas a nivel del piso del cuarto ventrículo, por lo que debía estar mediado por fibras no cruzadas del MOC (Warren y Liberman, 1989).

Se han descrito dos circuitos para el reflejo MOC (figura 8). La vía anatómica del reflejo MOC ipsilateral posee un doble cruzamiento de fibras a través de la línea media, una proveniente de la cóclea ipsilateral, que a través del núcleo coclear, va a las neuronas MOC contralaterales; y otra que viene desde las neuronas MOC contralaterales a la cóclea ipsilateral (Brown et al, 2003). Por otra parte, el reflejo MOC contralateral tiene sólo un cruce de la línea media, de fibras aferentes desde el núcleo coclear contralateral hacia el conjunto de neuronas MOC no cruzadas que se proyectan a la cóclea ipsilateral (De Venecia et al., 2005).

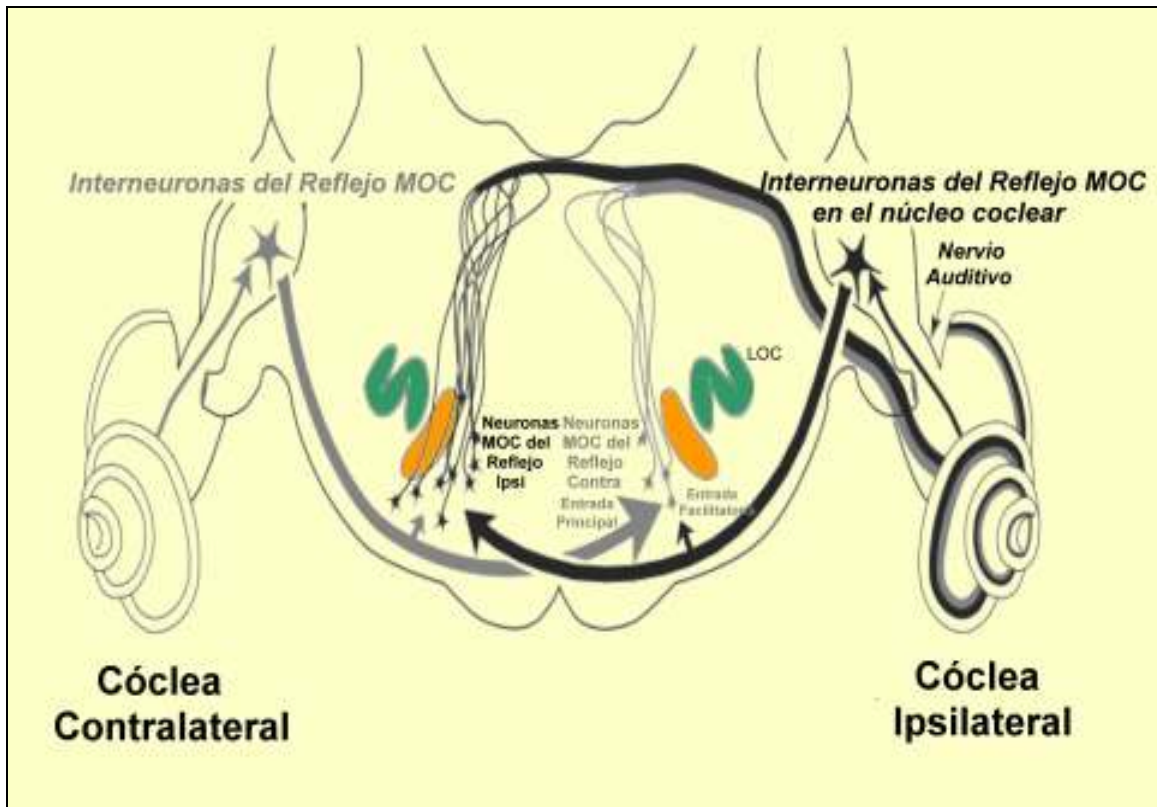


Figura 8. Anatomía del reflejo MOC. Este reflejo se encuentra dividido en dos circuitos, uno **ipsilateral** que va desde la cóclea ipsilateral, a través del núcleo coclear hacia las neuronas MOC contralaterales y desde estas neuronas MOC hacia la cóclea ipsilateral, por lo que posee un doble cruzamiento de fibras a través de la línea media (negro). Por otro lado, el circuito **contralateral** posee un solo cruce a través de la línea media (gris). (Modificado de Robles y Delano, 2008).

Se ha visto que la magnitud del efecto supresor del CAP por estimulación acústica varía considerablemente entre animales de una misma especie. Esto podría explicarse principalmente por la variabilidad que existe en el nivel de actividad de las neuronas eferentes olivococleares (Liberman, 1989).

Otra forma de estudio de la actividad eferente es mediante el registro de las emisiones otoacústicas de productos de distorsión (DPOAEs). Recientemente, se ha investigado su modulación en la chinchilla y en humanos, estimulando las neuronas eferentes mediante estimulación acústica contralateral. Los resultados muestran que las DPOAEs pueden ser suprimidas por un aumento en la estimulación acústica contralateral, y por otro lado, estas emisiones pueden ser aumentadas por una disminución en la estimulación acústica contralateral (James *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 2008).

6.4) Posibles funciones del sistema eferente

La función del sistema eferente en la audición sigue siendo una incógnita hasta el día de hoy. Sin embargo, en base a la evidencia experimental existente se han propuesto las siguientes funciones para este sistema:

- a) Reduce el efecto de enmascaramiento producido por ruido u otros tonos (Winslow y Sachs, 1987; Kawase y Liberman, 1993).
- b) Previene la pérdida de sensibilidad causada por la exposición a sonidos de alta intensidad (Rajan, 1995).
- c) Modula las aferencias auditivas durante el ciclo sueño-vigilia (Velluti, 1997).
- d) Controla la sensibilidad de la cóclea de acuerdo al estado de atención del sujeto (Oatman, 1971; Delano *et al.*, 2007).
- e) Establece un balance de la sensibilidad interaural a través del LOC (Darrow *et al.*, 2006).

HIPÓTESIS

En la cóclea de mamíferos existe una modulación de la respuesta coclear a través del sistema nervioso eferente y esta modulación actúa en forma tonotópica.

Específicamente, se postula que: La estimulación acústica contralateral, en animales anestesiados, reduce la amplitud de la vibración mecánica y del potencial de acción compuesto de la cóclea ipsilateral. Este efecto supresor eferente es tonotópico, esto es, mayor para tonos contralaterales de frecuencia similar a la del tono ipsilateral.

OBJETIVOS

1) Objetivo General

Determinar el efecto de la activación de la vía eferente, por medio de estimulación acústica del oído contralateral, en las respuestas cocleares de la chinchilla.

2) Objetivos Específicos

- Medir los efectos inducidos por la estimulación acústica contralateral en el potencial de acción compuesto coclear.
- Medir los efectos inducidos por la estimulación acústica contralateral 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Lugar y duración del estudio

La presente Memoria de Título se realizó en el laboratorio de Neurobiología de la audición, el cual es parte del programa de Fisiología y Biofísica del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), que pertenece a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Este estudio se llevó a cabo durante el período mayo de 2007 a Junio de 2008.

2) Grupo experimental

El proyecto y sus métodos fueron aprobados por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (FONDECYT 1080227). Se utilizaron 10 chinchillas adultas (*Chinchilla laniger*) con pesos entre 400 y 600 gramos.

El protocolo anestésico fue el mismo en cada experimento, comenzando con una dosis de atropina (0,04 mg/kg I.M.) y xilazina (3-8 mg/kg I.M.) como preanestésicos y después de 5-10 minutos se anestesiaba con ketamina (20-40 mg/kg, I.M.). Luego se repetía la mitad de la dosis de ketamina cada 60 minutos y en algunas ocasiones, con intervalos mas cortos de tiempo, tomando en cuenta factores como la presencia de movimientos o respuestas positivas a las pruebas de dolor (Anderson, 1996). En algunos experimentos fue necesario rehidratar a los animales con suero fisiológico principalmente por vía intraperitoneal.

Se usó un colchón calefactor debajo del animal y un termómetro vía rectal (YSI-43TD) con el fin de mantener un control constante de la temperatura entre 35° y 37° C (Spotorno *et al.*, 2004). Luego de finalizado cada experimento se procedía a la eutanasia del animal con una sobredosis de tiopental sódico (120 mg/kg.), tres veces mayor a la dosis anestésica, la cual se administraba por vía intracardiaca, sin recuperación del estado de anestesia general.

3) Procedimientos quirúrgicos

Para obtener un adecuado acceso al meato auditivo y a la membrana timpánica fue necesario extirpar ambas orejas en todos los animales utilizados. Posteriormente se realizó una craneotomía dorsal en la *bulla* con el fin de cortar el músculo tensor del tímpano. La aproximación a la ventana redonda de la cóclea se realizó por medio de una apertura en el aspecto posterior de la *bulla* timpánica. Por esta misma apertura fue posible, además desinsertar el músculo estapedio. Estos procedimientos se realizaron en la gran mayoría de los experimentos mediante bisturí, tijeras, pinzas hemostáticas y suturas, aunque posteriormente se usó un bisturí eléctrico (WEM HF-120), lo que disminuyó considerablemente el tiempo de cirugía. Todo el procedimiento quirúrgico se realizó usando una lupa (Zeiss, *OpMi- 1*) con aumento de hasta 40x. Los experimentos se realizaron en una cámara construida con doble muralla, con cierre de doble puerta y tapizada con un material absorbente al sonido, para así evitar la contaminación del interior de la habitación con ruido o vibraciones provenientes del exterior.

4) Registro de potenciales cocleares

La adquisición de los potenciales eléctricos cocleares se realizó mediante la inserción de un electrodo de alambre de plata de 80 μm de diámetro, el cual se introducía por la apertura en la *bulla* y se fijaba sobre la membrana de la ventana redonda. Este electrodo se conectaba a un pre-amplificador construido en el laboratorio que amplificaba 100 veces la señal recogida y a un filtro *Krohn-Hite* modelo 3323 que amplificaba el registro 100 veces más, con una ganancia total de 10000X. El filtro se ajustó para una banda de frecuencias de entre 300 y 10000 Hz para tonos de hasta 8 kHz; y de entre 300 y 20000 Hz para tonos de frecuencias más altas que 8 kHz. Finalmente estas señales se digitalizaron a una tasa de 40000 muestras por segundo con una tarjeta de adquisición análogo-digital *National Instruments* PCI-6071E instalada en un computador.

Los estímulos acústicos fueron generados digitalmente con una tarjeta de conversión análogo-digital *National Instruments*® PCI-6071E a una tasa de 100000 puntos por segundo y se atenuaron con un atenuador programable PA-5, parte de un equipo *Tucker-Davis Technologies (TDT) System 3*.

La estimulación fue principalmente con tonos puros (aunque también se probó con clicks y ruido), los cuales tenían una duración de 15 ms y fueron presentados con frecuencias que variaron entre 1 y 9 kHz. En todos los 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 con un programa ad-hoc (Prescal). Los potenciales de estímulo y de respuesta también se desplegaron en un osciloscopio, lo que permitía llevar un control de lo que se estaba generando y una visión general de los potenciales de respuesta adquiridos.

5) Protocolo experimental

Luego de la calibración y una vez que se establecían los parámetros óptimos de estimulación acústica se comenzaba el registro de los potenciales cocleares con tonos a diferentes niveles de presión de sonido y a diferentes frecuencias para así obtener los datos que permitieran la elaboración de curvas de entrada y salida y de sintonización, necesarias para el análisis posterior. La generación de estímulos y adquisición de los registros se hizo bajo control computacional utilizando el programa CONTRA (creado por Diego Elgueda), escrito en lenguaje de programación C en un ambiente *Labwindows/CVI (National Instruments)*.

Para cada intensidad de estimulación acústica se presentaron 3 series consecutivas de 64 ensayos. Primero, sólo estimulación ipsilateral, luego estimulación contralateral (500 ms) seguida (después de un desfase de 5-10 ms) de estimulación ipsilateral (15 ms) y finalmente un control posterior sólo con estimulación ipsilateral (Figura 9).

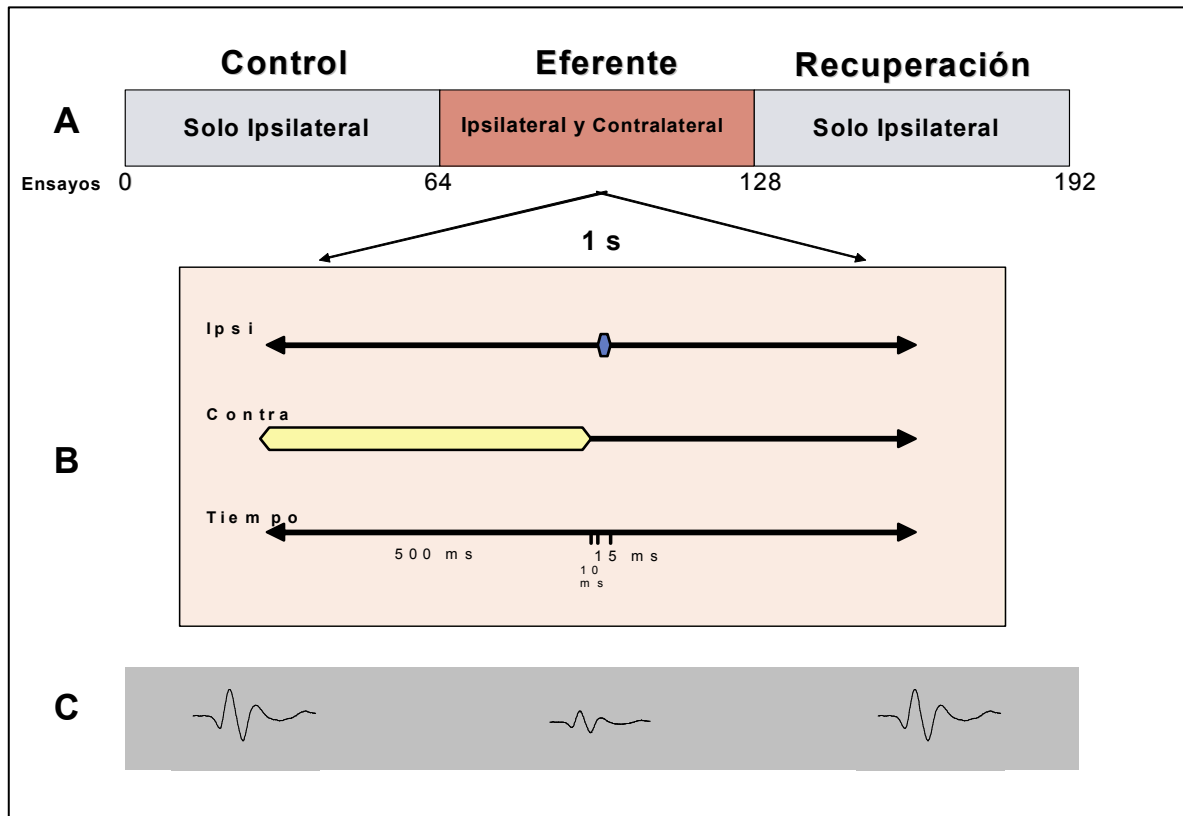


Figura 9. Paradigma experimental. A: Los estímulos se presentaron en 3 series consecutivas de 64 ensayos, primero sólo con estimulación ipsilateral, luego estimulación contralateral seguida de ipsilateral y finalmente sólo estimulación ipsilateral. B: Secuencia de tiempo de un ensayo con estimulación ipsilateral y contralateral C: Promedio de los potenciales de acción compuestos (CAPs) registrados con un electrodo en la ventana redonda en cada serie de ensayos.

6) Análisis de datos

La amplitud del CAP se midió entre el máximo de la primera y segunda onda (N1 y P1, Figura 10) del registro promedio de 64 respuestas y la latencia del CAP como el periodo entre la presentación del estímulo acústico y el máximo valor de la primera onda del CAP (N1). Las amplitudes de los potenciales microfónicos (CM) se obtuvieron por medio de la transformada de Fourier, que entrega la magnitud

de los distintos componentes de frecuencia de la señal. De esta forma, es posible entregar un valor más confiable, tanto en amplitud como en fase de la respuesta a la frecuencia en estudio. Los valores de amplitud del CAP y CM se determinaron con un programa ad hoc (CONTRA) y los de latencia del CAP con otro programa (*CMtool*, Diego Elgueda); ambos escritos en lenguaje C.

Los valores obtenidos con estos programas fueron tabulados en planillas Excel, junto a los parámetros de cada registro individual y luego graficados. Se utilizó la prueba *t* de *Student* con el fin de verificar la significancia de las diferencias entre las series experimental y control.

7) Control con Tetrodotoxina (TTX)

La tetrodotoxina (TTX) es una potente neurotoxina que se encuentra naturalmente en las vísceras de algunas especies de peces, tales como el pez globo o el pez erizo. La potencia de esta toxina es 10 veces mayor al veneno de la cobra real y entre 10 a 100 veces mayor al veneno de la viuda negra. Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo específico de los canales de sodio dependientes de voltaje presentes en la membrana de las neuronas (Narahashi, 2008), por lo que inhibe la generación de potenciales de acción. El máximo efecto de esta toxina se alcanza a los 30-120 minutos de la administración, extendiéndose su efecto por más de 3 horas. El efecto desaparece por completo después de alrededor de 24 horas.

Esta neurotoxina se inyectó en la cóclea contralateral en dos animales como control con el fin de confirmar que el efecto supresor obtenido en los potenciales de acción cocleares era atribuible a la activación del sistema eferente por estimulación acústica contralateral. Al comenzar el experimento control se

realizaron curvas de sintonización a frecuencias e intensidades definidas sin presencia de toxina para posteriormente repetirlas después de la inoculación de TTX. La toxina se inyectó con una jeringa Hamilton (Microliter 7001 de 1 μ l, punta en bisel) a una concentración de 3 micromolar, a través de la ventana redonda en la cóclea contralateral. Luego de esperar unos minutos para el efecto de la toxina, se repitieron las mediciones iniciales utilizando los mismos parámetros de estimulación y se compararon con las obtenidas en ausencia de la toxina.

RESULTADOS

Como ya se especificó en la sección materiales y métodos, por medio de un electrodo fijado en la ventana redonda se registró los potenciales CAP y CM en respuesta a tonos puros de diferentes frecuencias, presentados a varios niveles de intensidad.

Para cada una de las condiciones de estimulación se determinó la amplitud y latencia del CAP (Figura 10). La estimulación acústica de las fibras olivococleares con tonos contralaterales provocó, principalmente, reducciones en la amplitud del CAP e incrementos en su latencia. Estos efectos fueron sintonizados en frecuencia, esto es, fueron mayores a las frecuencias del estímulo contralateral cercanas a la del estímulo ipsilateral, lo que muestra una organización tonotópica de la inervación eferente.

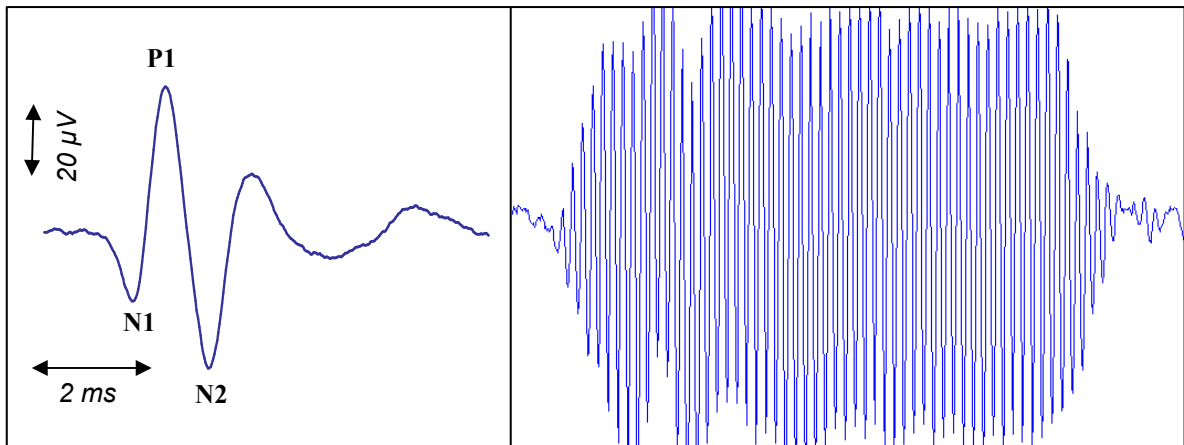


Figura 10. Ejemplos de potenciales cocleares registrados con un electrodo en la ventana redonda de la cóclea. A la izquierda (ch116), se especifican las tres deflexiones principales del CAP (N1, P1 y N2). La amplitud del potencial se mide entre N1 y P1. A la derecha se muestra un potencial microfónico (ch117) producido por un tono de 4 kHz (70 dB SPL).

La amplitud del CAP es dependiente de modo no lineal de la intensidad del estímulo acústico (presión de sonido), aumentando inicialmente en forma aproximadamente lineal hasta alcanzar un *plateau* a mayores intensidades. Asimismo, las amplitudes de los CM muestran una relación no lineal con la intensidad del estímulo, con un aumento inicial rápido a medida que aumenta la presión de sonido y saturación para estímulos de alta intensidad (figura 11).

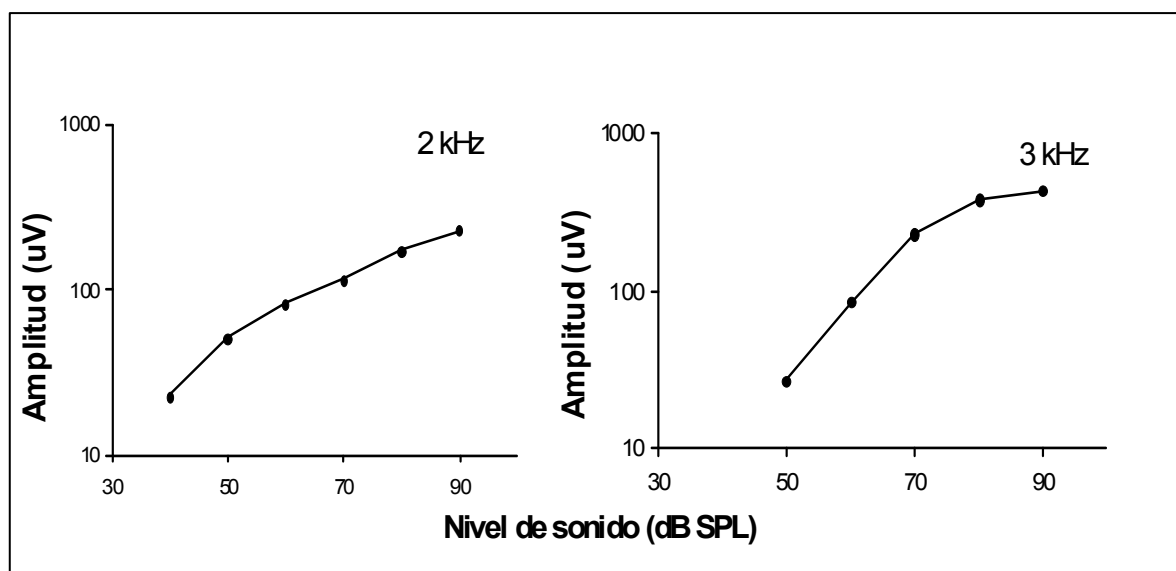


Figura 11. Curvas de amplitud del CAP (izquierda) y CM (derecha) en función de la intensidad del estímulo acústico (funciones de entrada-salida). A la izquierda (ch116) se observan los resultados obtenidos con tonos de 2 kHz, mientras que a la derecha (ch117) con tonos de 3 kHz.

Como se mencionó en la sección materiales y métodos, la latencia del CAP se midió como el tiempo entre la presentación del estímulo y el máximo valor de la onda N1. Valores de latencia obtenidos en dos chinchillas, a varias intensidades de estimulación, se muestran en la figura 12.

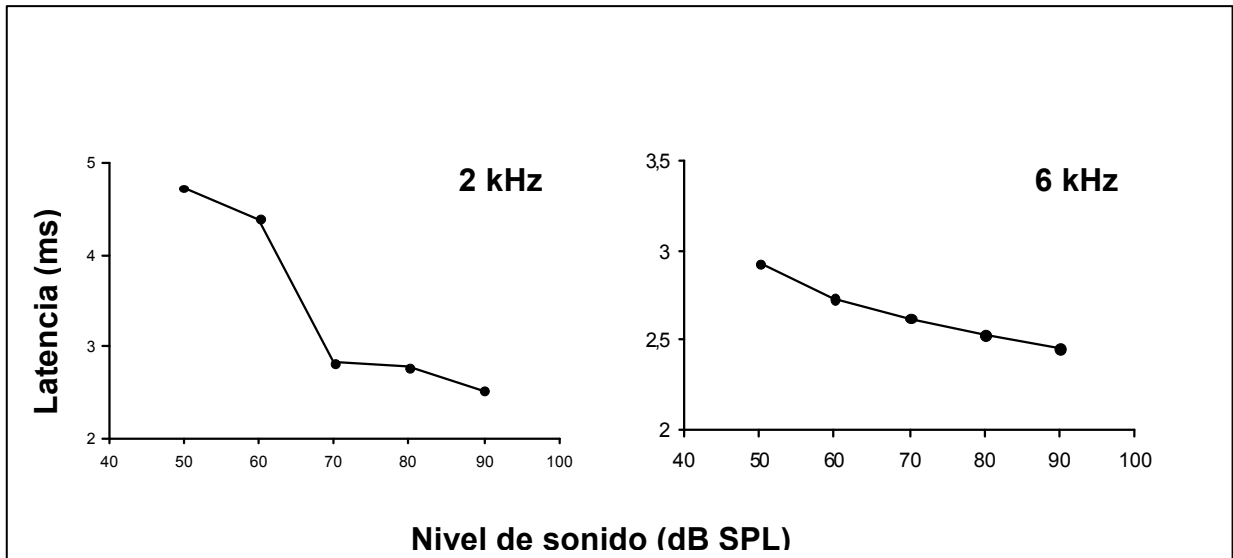


Figura 12. Ejemplos de latencias de CAPs obtenidos con tonos de 2 y 6 kHz a varias intensidades en dos chinchillas.

1) Efectos de la estimulación acústica contralateral sobre el CAP

Los principales efectos de la estimulación acústica contralateral sobre el potencial de acción compuesto del nervio auditivo en respuesta a estímulos acústicos ipsilaterales fueron reducciones en la amplitud y aumentos en la latencia de las respuestas. Estos efectos sobre el CAP se producían al iniciarse la estimulación acústica contralateral y se recuperaban al finalizar ésta (Figura 13).

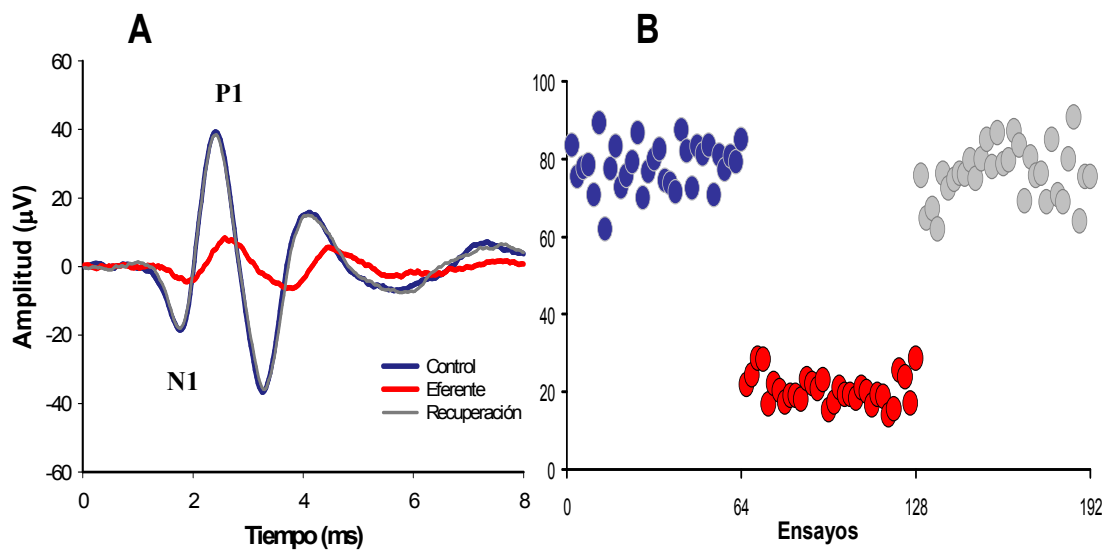


Figura 13. Reducción del CAP por estimulación acústica contralateral de fibras eferentes. A: Promedio de 64 respuestas en ausencia (azul y gris) y en presencia (rojo) de estimulación eferente. La amplitud del CAP se midió entre los picos de las ondas N1 y P1. B: Amplitud de los potenciales de acción obtenidos en respuesta a tonos ipsilaterales de 6 kHz y 90 dB SPL. Cada punto representa la amplitud promedio de 2 ensayos consecutivos y los puntos rojos corresponden a respuestas precedidas por estimulación acústica contralateral.

La reducción en la amplitud del CAP fue mayor para intensidades bajas y moderadas del estímulo acústico ipsilateral. Al aumentar la intensidad del estímulo ipsilateral, se observaba un menor efecto supresor sobre el CAP. La figura 14 muestra curvas de entrada-salida, donde se grafican, en función de la intensidad de estímulo acústico ipsilateral, las amplitudes promedio de CAPs obtenidos en ausencia y en presencia de estimulación contralateral. Para obtener las curvas en presencia de estimulación contralateral, ésta se mantuvo a una intensidad fija.

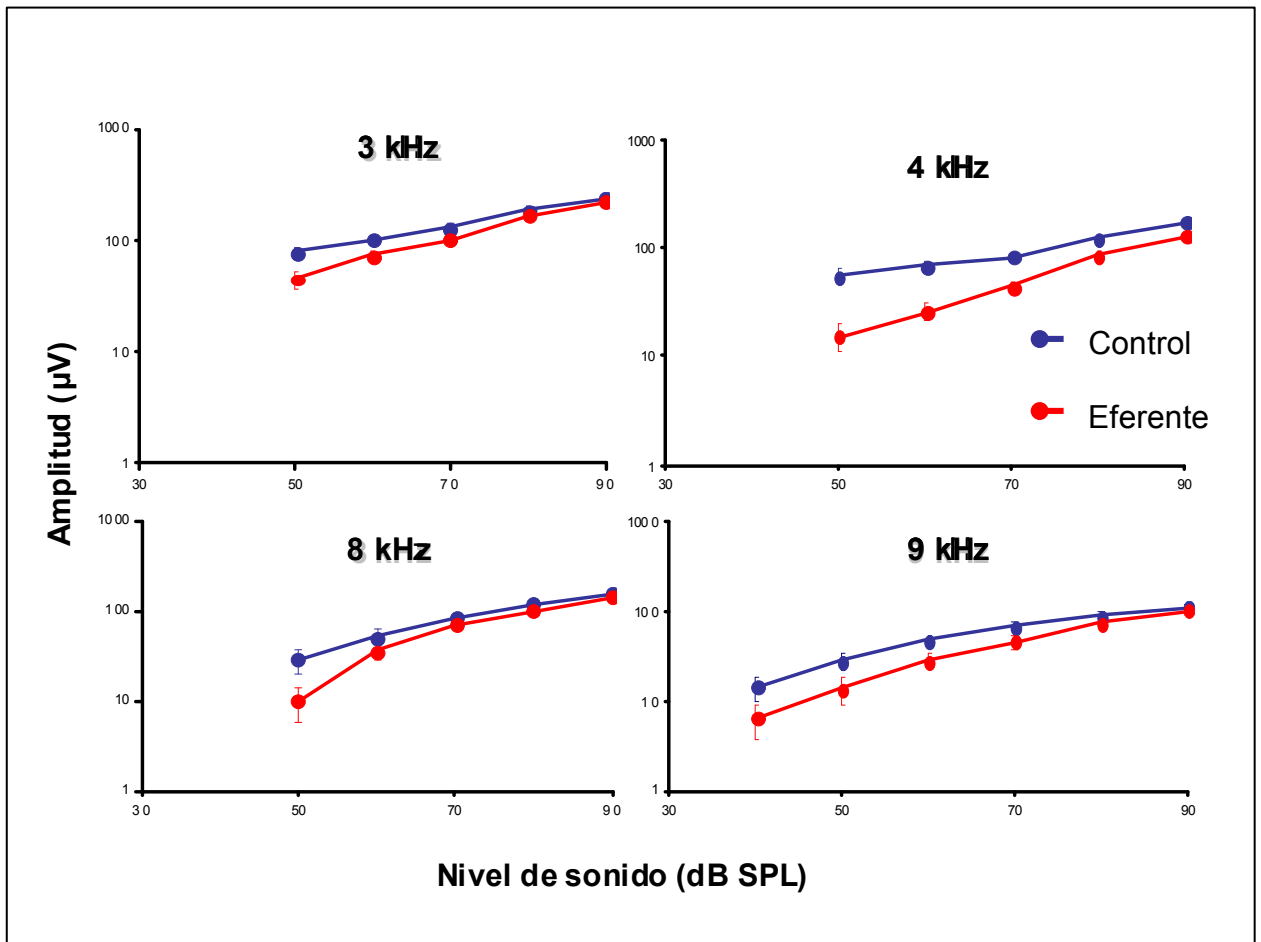


Figura 14. Curvas de entrada – salida de CAP. Amplitud del CAP en función de la intensidad del estímulo acústico ipsilateral, en presencia y en ausencia de estimulación eferente contralateral. Con un estímulo contralateral fijo, las reducciones de amplitud del CAP fueron mayores para estímulos ipsilaterales de baja intensidad. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de cada punto. Resultados obtenidos en 4 chinchillas.

Con el fin de realizar comparaciones entre diversos ensayos y experimentos la razón entre la amplitud del CAP control y bajo estimulación contralateral se

expresó en decibeles. Este valor se obtiene calculando el logaritmo decimal de la razón entre las amplitudes de los CAP obtenidos bajo estimulación acústica contralateral y su correspondiente control, con 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 acústica contralateral y A_{ref} es la amplitud promedio de los ensayos sin estimulación acústica contralateral, o sea los controles.

La supresión calculada de este modo permitió la comparación del efecto eferente en diferentes condiciones experimentales y diferentes animales. La figura 15 muestra gráficos de la supresión eferente en dB en función del nivel de presión de sonido del tono ipsilateral, a diferentes frecuencias. En estas curvas se puede observar más claramente la influencia de la intensidad del estímulo acústico sobre el efecto de la estimulación eferente, ya que las reducciones de amplitud del CAP son mayores a medida que se reduce la intensidad de los estímulos ipsilaterales.

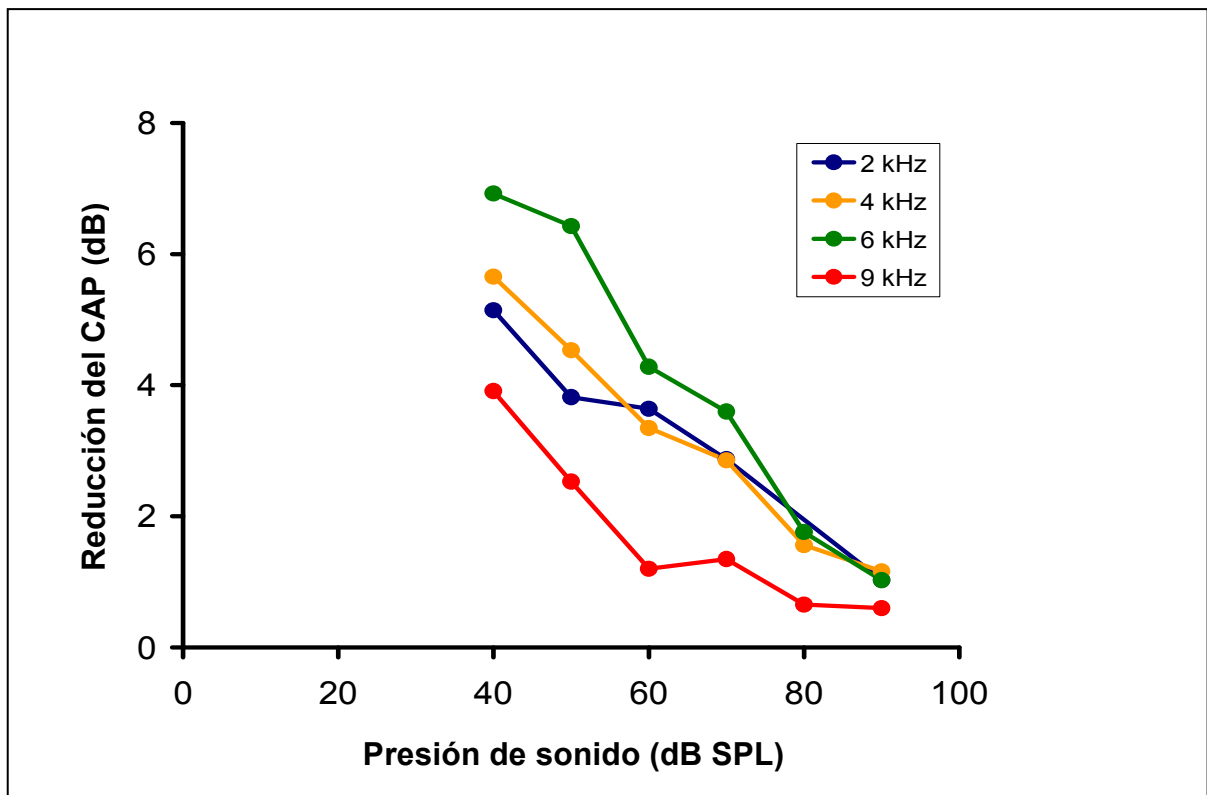


Figura 15. Reducción del CAP (en decibeles) provocada por estimulación acústica de la vía eferente en función de la intensidad del estímulo ipsilateral para 4 frecuencias distintas, en 3 animales. A medida que aumenta la intensidad del estímulo acústico ipsilateral, disminuye el efecto supresor eferente sobre el CAP.

2) Sintonización del efecto eferente en la respuesta coclear

Con el fin de evaluar la especificidad en frecuencia del efecto supresor eferente se realizaron mediciones que permitieran construir curvas de sintonización. Para esto se estimuló el oído ipsilateral con un tono de frecuencia e intensidad fija y se aplicaron tonos contralaterales a distintas frecuencias e intensidades.

Los resultados muestran que la magnitud y extensión del efecto supresor del CAP dependen de la frecuencia e intensidad del estímulo contralateral. La reducción en la amplitud del CAP es mayor a medida que la frecuencia del tono contralateral se

aproxima a la frecuencia ipsilateral. La máxima reducción no necesariamente se produce cuando la frecuencia contralateral es igual a la ipsilateral, sino que puede estar levemente desplazada hacia otra frecuencia cercana, tanto mayor como menor que la frecuencia ipsilateral. Además, la disminución en el CAP del nervio auditivo fue mayor y abarcó un rango de frecuencias más amplio, mientras más intenso fue el estímulo acústico contralateral. Esto es, al disminuir la intensidad de la estimulación contralateral, la reducción del CAP se hace cada vez menor y más limitada en frecuencia, siendo casi inexistente alrededor de 50 dB SPL.

El gráfico de la figura 16 muestra la dependencia de frecuencia e intensidad del efecto supresor; en este caso la mayor reducción del CAP se obtiene a una frecuencia contralateral cercana a la ipsilateral.

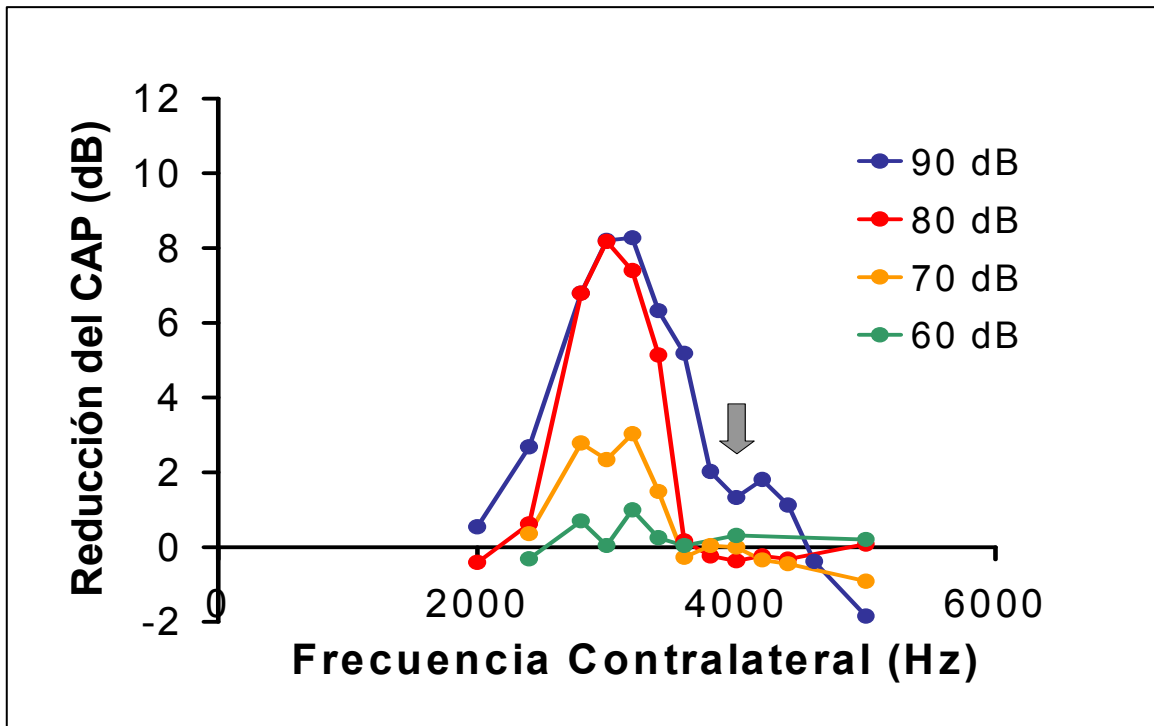


Figura 16. Curvas de sintonización de la reducción del CAP ipsilateral producidas por tonos contralaterales a distintas intensidades. La magnitud y extensión de la reducción del CAP depende de la intensidad y frecuencia del estímulo contralateral. En este caso, para un tono ipsilateral a 4 kHz (indicado por la flecha), las mayores reducciones se obtuvieron con frecuencias contralaterales entre 3000 – 3500 Hz. Resultados obtenidos en una chinchilla.

Se obtuvieron curvas de sintonización para ver el comportamiento de este efecto supresor a otras frecuencias en varios animales (figura 17). Las reducciones del CAP llegaron a ser de hasta casi 12 dB con variaciones dependientes del animal y de la frecuencia ipsilateral usada.

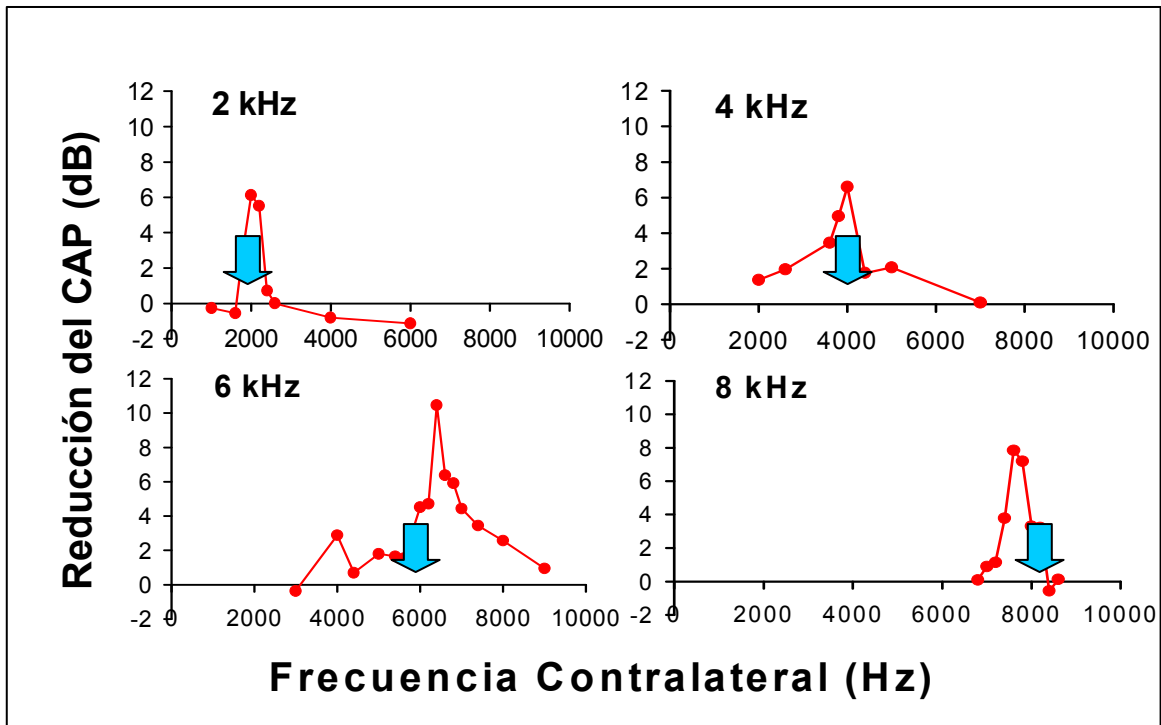


Figura 17. Sintonización de la reducción del CAP ipsilateral producida por estimulación contralateral. Curvas de sintonización obtenidas a cuatro frecuencias ipsilaterales diferentes (indicadas por flechas). En todos los casos, las mayores reducciones se obtuvieron con frecuencias contralaterales de estimulación cercanas (no necesariamente iguales) a la frecuencia ipsilateral. Tonos contralaterales a 80 dB SPL. Los resultados corresponden a efectos individuales en 3 chinchillas.

3) Efectos en latencia del CAP

Además de la reducción en amplitud descrita anteriormente, en algunos experimentos la estimulación acústica contralateral provocó aumento en la latencia del CAP. Estos cambios no fueron tan notorios como las reducciones registradas en la amplitud del CAP, sin embargo también fueron mayores cuando la estimulación ipsilateral fue de menor intensidad. La figura 18 muestra ejemplos de

cambios en latencia del CAP en función de la intensidad del estímulo acústico ipsilateral obtenidos en dos animales a frecuencias de 3 y 4 kHz.

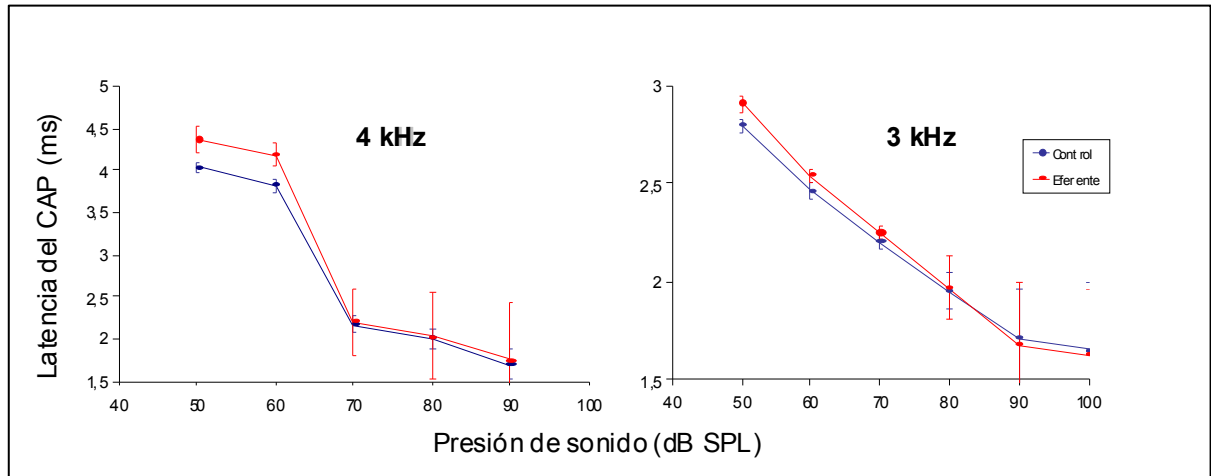


Figura 18. Curvas de latencia del CAP en función de la intensidad del estímulo ipsilateral en presencia (rojo) y ausencia (azul) de estimulación acústica contralateral de la vía eferente. En 4 experimentos, la latencia aumentó en presencia de estimulación contralateral y este aumento fue mayor a intensidades bajas de estimulación ipsilateral. (Cambios estadísticamente significativos. Prueba de t. $P = <0,001$).

4) Efectos de la tetrodotoxina (TTX)

Para confirmar el origen eferente de la supresión producida con la estimulación contralateral se realizaron experimentos de control en que se inyectó TTX en la cóclea contralateral. Como se sabe, la tetrodotoxina (TTX) es una neurotoxina muy potente que inhibe la generación de potenciales de acción. Por lo tanto, al inyectarla ésta debiera eliminar la respuesta neural en la cóclea contralateral y por consiguiente, el efecto eferente sobre el CAP de la cóclea ipsilateral.

En dos animales se realizaron curvas de sintonización del efecto eferente pre y post-inyección de TTX, utilizando los mismos parámetros de estimulación. En

ambos animales la tetrodotoxina inhibió las respuestas neurales contralaterales y por lo tanto también su efecto supresor sobre los CAP ipsilaterales. La figura 19 compara las curvas de sintonización pre y post-inyección de TTX obtenidas en uno de los animales y muestra como la reducción de la amplitud del CAP disminuyó significativamente luego de la inyección de la toxina en la cóclea contralateral.

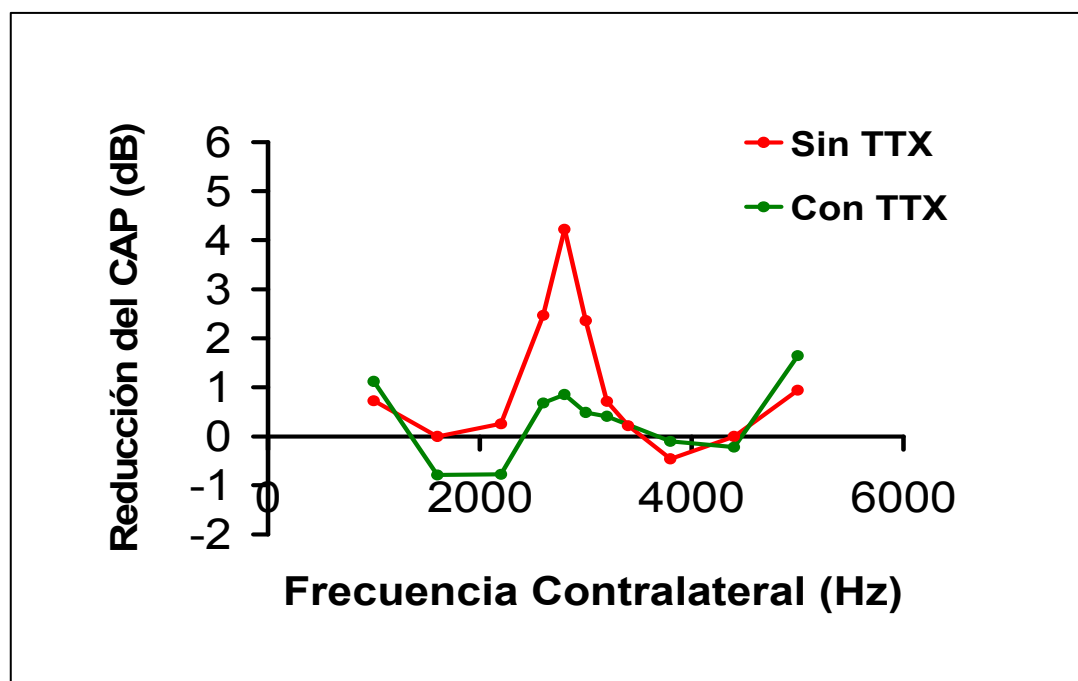


Figura 19. Efecto de una inyección de tetrodotoxina (TTX) en la cóclea contralateral. Curvas de sintonización antes (rojo) y después (verde) de la inyección de TTX en la cóclea contralateral. Resultados obtenidos en una chinchilla con tonos ipsilaterales a 3 kHz, 50 dB SPL y contralaterales a 3 kHz, 70 dB SPL.

5) Otros controles realizados

En el momento de realizar las calibraciones acústicas se llevó a cabo una serie de registros de presiones de sonido con el fin de estimar el nivel de sonido que pasaba desde el oído contralateral al ipsilateral. Esta propagación directa del sonido entre los dos oídos se conoce como *crosstalk* y, en este caso, muestra el grado de atenuación que existe en el cráneo de la chinchilla.

En seis animales se realizaron mediciones de la atenuación interauricular a diferentes frecuencias. Los resultados de este control muestran curvas que poseen una forma similar en los 6 animales (figura 20), con valores que van desde 20-45 dB para frecuencias medias, hasta entre 30-60 dB para frecuencias bajas y altas. Esta diferencia de atenuación entre las distintas frecuencias concuerda con la obtenida en experimentos en gatos (Warren y Liberman, 1989).

Los niveles altos de estimulación contralateral podrían haber estimulado la cóclea ipsilateral, sin embargo, en este caso, para evitar esto, el estímulo ipsilateral se entregó con un retardo respecto al fin del estímulo contralateral.

Además, en cada experimento se seccionaron los músculos del oído medio (tensor del tímpano y estapedio) con el fin de evitar alguna posible supresión producida por el reflejo del oído medio al usar estímulos de alta intensidad (Warren y Liberman, 1989). Aunque, hay estudios que indican que no existirían diferencias significativas al seccionar estos músculos (Liberman, 1989).

Por último, en algunos experimentos se llevó un registro comparativo de los efectos eferentes antes y después de cada aplicación de ketamina con el fin de evaluar posibles alteraciones en los potenciales cocleares producto de la

anestesia. Esto permitió determinar que no hubo variaciones en la supresión del CAP que fueran atribuibles al anestésico.

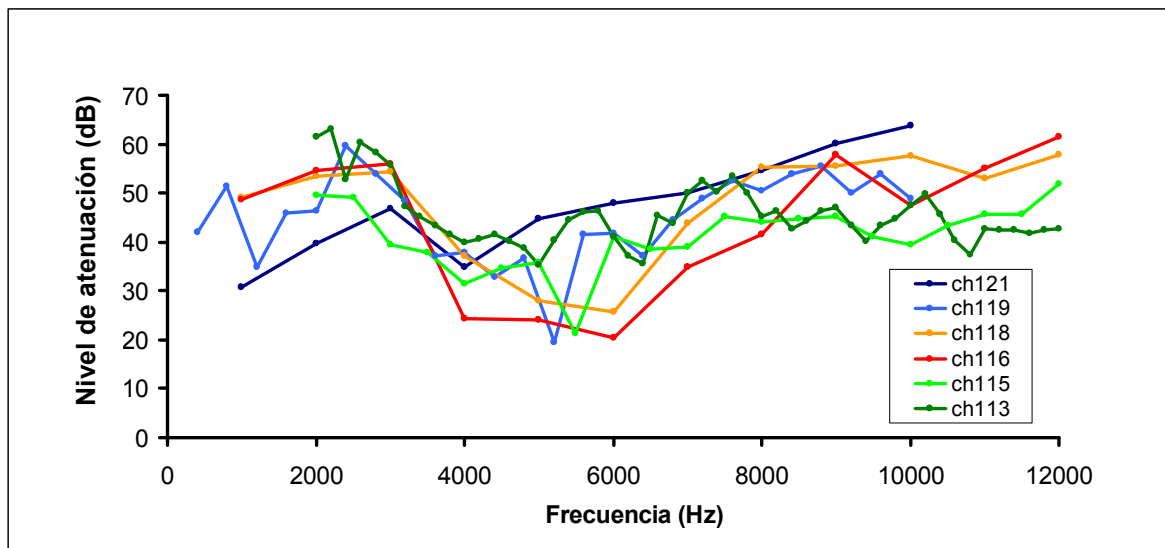


Figura 20. Curvas de atenuación interaural en función de la frecuencia medidas en 6 chinchillas.

DISCUSIÓN

1) Comentarios Generales

El objetivo principal de esta memoria de título fue determinar el efecto que tiene la activación de la vía eferente, por medio de estimulación acústica del oído contralateral, en las respuestas cocleares de la chinchilla. Esta especie ha sido ampliamente usada en la investigación del sistema auditivo, principalmente debido a que a través de diversos estudios psicofísicos (Miller, 1970; Nelson y Kiestler, 1978; Heffner y Heffner, 1991) se ha comprobado que su curva de umbrales auditivos es muy similar a la humana.

La estimulación acústica contralateral es uno de los métodos existentes para estimar la funcionalidad del sistema eferente. Experimentos realizados en gatos anestesiados, han demostrado que la estimulación del oído contralateral por medio de ruido y tonos puede reducir significativamente el potencial de acción del nervio auditivo (Lieberman, 1989). Esta supresión, que se activa en respuesta a sonidos contralaterales, está mediada por el reflejo MOC contralateral, que en su parte eferente, es conducido vía neuronas mediales olivococleares que se proyectan hacia las células ciliadas externas (Brown *et al*, 2003).

Por otro lado, la actividad del sistema eferente también puede ser evaluada a través del estudio de las emisiones otoacústicas (DPOAE), que poseen la ventaja de ser un método de medición más fisiológico y no invasivo. Estudios recientes muestran que la estimulación acústica contralateral reduce la amplitud de las DPOAE en chinchillas y humanos (James *et al*, 2007; Harrison *et al*, 2008).

Con respecto a las características de las fibras olivococleares en la chinchilla, actualmente son pocos los estudios disponibles, sin embargo hay algunas diferencias importantes que vale la pena destacar. Las neuronas MOC de la chinchilla poseen la proporción más alta de fibras cruzadas en relación a las no cruzadas de entre todas las especies descritas (4:1) (Azeredo *et al.*, 1999), lo que quiere decir que sus neuronas MOC se proyectan en un 80% a la cóclea contralateral (vía cruzada) y sólo un 20% a la cóclea ipsilateral (vía no cruzada). Esto cobra especial importancia si tomamos en cuenta que el reflejo MOC contralateral ejerce su efecto supresor de la sensibilidad coclear ipsilateral, principalmente a través de la vía eferente medial no cruzada (Brown, 2003).

2) Efectos de la estimulación contralateral sobre el CAP

El efecto supresor en el CAP se observó en la mayoría de nuestros experimentos, con reducciones que variaron entre 1 y 12 dB, dependiendo principalmente de la frecuencia e intensidad de la estimulación contralateral. Sin embargo, como se ha visto en otros estudios (Liberman, 1988), las diferencias en el grado de supresión entre animales también podrían explicarse por variaciones en el nivel de actividad de las neuronas eferentes olivococleares, e incluso también existe evidencia de diferencias en el nivel de supresión del CAP dentro de un mismo animal en función del tiempo (Liberman, 1989).

Existen varios estudios en otras especies en que se logró este efecto supresor usando estimulación acústica contralateral. En gatos anestesiados con uretano se obtuvieron supresiones del CAP de entre 1 y 10 dB, en la mayoría de las

frecuencias usadas, siendo de mayor magnitud a 6 kHz (Lieberman, 1989). Estudios en cobayo muestran que la estimulación contralateral provocó una reducción en las DPOAEs de 6 dB en animales despiertos y de casi 2 dB en animales anestesiados con uretano (Guitton, 2004). En humanos también se han realizado estudios midiendo la supresión de DPOAEs, en los que se obtuvieron resultados que en promedio bordeaban 1 dB de supresión (James, 2005).

La magnitud de la supresión obtenida en esta Memoria de Título depende fuertemente de la frecuencia contralateral usada, siendo mayor el efecto al estimular contralateralmente con un tono de frecuencia similar (no necesariamente igual) a la del tono ipsilateral. Esta supresión sintonizada en frecuencia es concordante con resultados de experimentos en otras especies en que usando tonos contralaterales se redujo el CAP (Lieberman, 1989) y la respuesta de fibras del nervio auditivo (Buño, 1978). Esta sintonización de frecuencia del efecto eferente muestra concordancia entre las características tonotópicas de las neuronas eferentes comprometidas en el reflejo MOC y las fibras nerviosas aferentes cocleares. Por otra parte, demuestra que en la chinchilla, a pesar de tener solo un 20% de fibras MOC no cruzadas, existe una distribución tonotópica de las fibras eferentes olivococleares a lo largo de toda la cóclea.

Esta ampliamente descrito que los cambios provocados por el sistema eferente sobre el CAP se deben a la acción de las terminaciones sinápticas de las neuronas MOC sobre las CCEs, que hiperpolarizan a estas células y cambian los potenciales de membrana que provocan su motilidad, disminuyendo la vibración de la membrana basilar. Lo anterior reduce la magnitud de la respuesta de las CCI

y de las fibras aferentes del nervio auditivo, produciéndose una reducción del CAP.

A pesar de que los resultados obtenidos muestran una relación directamente proporcional entre la intensidad de estimulación acústica contralateral con el efecto supresor logrado en el CAP, en los experimentos se trató siempre de buscar la mínima intensidad de estimulación acústica que generara cambios significativos en el CAP. Esto a veces se lograba usando intensidades de 60 o 70 dB SPL con reducciones que en promedio bordeaban 1 dB de supresión. Sin embargo, generalmente los mayores efectos se obtenían a intensidades de 80 y 90 dB SPL con reducciones del CAP que llegaron hasta los 12 dB. El hecho de haber tenido que usar intensidades de estimulación acústica contralateral relativamente altas para lograr efectos supresores significativos, podría explicarse por la relación anatómica de fibras cruzadas y no cruzadas, que en la chinchilla es de 4:1, ya que si tomamos en cuenta que el reflejo MOC contralateral actúa a través de la vía no cruzada, la baja proporción de estas fibras en la chinchilla haría más difícil su activación con intensidades bajas de estimulación acústica contralateral.

Para confirmar que los resultados logrados correspondían efectivamente a un efecto del reflejo MOC se inyectó una dosis de tetrodotoxina (TTX) a través de la ventana redonda de la cóclea contralateral y, midiendo el CAP contralateral, se corroboró la supresión de la actividad aferente de la cóclea contralateral. Luego se midieron curvas de sintonización de la supresión eferente pre y post TTX y la comparación de estas curvas mostró claramente que la supresión desapareció

casi por completo luego de la inyección de TTX, demostrando que la supresión del CAP era mediada por el sistema eferente.

3) Efectos en los potenciales microfónicos (CM)

A pesar de que el aumento en la amplitud de los CM constituye uno de los efectos esperados de la estimulación del sistema eferente (Fex, 1959), en esta Memoria de Título no fue posible obtener este efecto en forma consistente. El comportamiento de los CM fue más bien errático, aumentando ligeramente en algunas oportunidades, mientras que en la mayoría de las ocasiones se mantuvieron sin variaciones significativas.

En estudios anteriores en que se obtuvieron aumentos en los CM se utilizó estimulación eléctrica como medio de activación de la vía eferente (Fex, 1959, 1967; Wiederhold y Peake, 1966; Gifford y Guinan, 1987). En esta Memoria de Título se usaron intensidades altas de estimulación acústica, lo que podría ser una posible causa de los resultados obtenidos para CM.

CONCLUSIONES

- La estimulación acústica del oído contralateral en chinchillas anestesiadas activa la vía eferente olivococlear disminuyendo la sensibilidad coclear ipsilateral.
- Las reducciones en la amplitud del CAP fueron sintonizadas en frecuencia, siendo mayores para tonos contralaterales de frecuencias cercanas o iguales a las del tono ipsilateral.
- La tetrodotoxina inyectada en la cóclea contralateral abolió la respuesta neural contralateral en el reflejo MOC y por lo tanto disminuyó significativamente la reducción de la sensibilidad coclear ipsilateral.
- Estos resultados muestran la existencia de una distribución tonotópica de las fibras eferentes olivococleares a lo largo de la cóclea de la chinchilla.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON, N. L. 1996. Alojamiento básico y medicina de animales de compañía de bolsillo. **En:** 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.; DE VENECIA, R. K.; GUINAN, J. J. 2003. Responses of medial olivococlear neurons: Specifying the central pathways of the medial olivocochlear reflex. *Exp Brain Res* 153: 491-498.

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.

BUÑO, W. 1978. Auditory nerve fiber activity influenced by contralateral ear sound stimulation. *Exp Neurol* 59: 62-74.

- DELANO, P. H.; ELGUEDA, D; HAMAME, C. M.; ROBLES, L. 2007. Selective attention to visual stimuli reduces cochlear sensitivity in chinchillas. *J Neurosci* 27: 4146-4153
- DELANO, P. H.; 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.
- DE VENECIA, R. K.; LIBERMAN, M. C.; GUINAN, J. J. JR; BROWN, M. C. 2005. Medial olivocochlear reflex interneurons are located in the posteroventral cochlear nucleus: a kainic acid lesion study in guinea pigs. *J Comp Neurol* 487: 345-60.
- 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.
- ELGOYHEN, A. B.; VETTER, D. E.; KATZ, E.; ROTHLIN, C. V.; HEINEMANN, S. F.; BOULTER, J. 2001. Alpha 10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci* 98: 35013506.

- 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.
- GILLESPIE, P. G.; MULLER, U. 2009. Mechanotransduction by hair cells: models, molecules, and mechanisms. *Cell* 139: 33-44.
- GUITTON, M. J.; AVAN, P.; PUEL, J. L.; BONFILS, P. 2004. Medial olivocochlear efferent activity in awake guinea pigs. *Neuroreport* 15: 1379-1382.
- HEFFNER, R. S.; HEFFNER, H. E. 1991. Behavioral hearing range of the chinchilla. *Hear Res* 52: 13-16.
- HUDSPETH, A. J. 2000. Hearing. **En**: E. Kandel; J. H. Schwartz; T. M. Jessell (Eds.). *Principles of Neural Science*. 4^a ed. McGraw-Hill, Nueva York, NY, Estados Unidos. pp. 590-613.

- 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.
- HARRISON, R. V.; SHARMA, A.; BROWN, T.; JIWANI, S.; JAMES, A. L. 2008. Amplitude modulation of DPOAEs by acoustic stimulation of the contralateral ear. *Acta Oto-Laryngologica* 128: 404 – 407.
- 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.
- KAZMIERCZAK, P.; SAKAGUCHI, H.; TOKITA, J.; WILSON-KUBALEK, E.; MILLIGAN, R.; MÜLLER, U.; KACHAR, B. 2007. Cadherin 23 and protocadherin 15 interact to form tip-link filaments in sensory hair cells. *Nature* 449:87–91.
- KEMP, D. T. 1978. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 64: 1386-1391.
- LIBERMAN, M. C. 1989. Rapid assessment of sound-evoked olivocochlear feedback: suppression of compound action potentials by contralateral sound. *Hear Res* 38: 47-56.

- 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.
- MILLER, J. D. 1970. Audibility curve of the chinchilla. *J Acoust Soc Am* 48: 513-523.
- NARAHASHI, T. 2008. Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84: 147-54.
- 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.
- 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. **En:** 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+.
- ROBLES, L.; RUGGERO, M. A. 2001. Mechanics of the mammalian cochlea. Physiol Rev 81: 1305-1352.
- ROBLES, L.; DELANO, P. 2008. Efferent System. **En:** P. Dallos; D. Oertel (Eds.). Handbook of the Senses. Elsevier: Londres, Inglaterra. pp. 413-446.
- RUTHERFORD, M. A.; ROBERTS, W. M. 2008. Afferent Synaptic Mechanisms. **En:** P. Dallos; D. Oertel (Eds.). Handbook of the Senses. Elsevier: Londres, Inglaterra. pp. 365-396.
- SCHACHERN, P. ; PAPARELLA, M. M. ; DUVALL, A. J. 1982. The normal chinchilla round window membrane. Arch Otolaryngol Head Neck Sug 108: 550-554.
- SEWELL, W. F. 1996. Neurotransmitters and Synaptic Transmission. **En:** P. Dallos; A. Popper; R. Fay (Eds.). The Cochlea. Springer-Verlag, Nueva York, NY, Estados Unidos. pp. 503–533.

- 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.
- WARREN, E. H.; LIBERMAN, M. C. 1989. Effects of contralateral sound on auditory-nerve responses. I. Contributions of cochlear efferents. *Hear Res* 37: 89-104.
- 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.