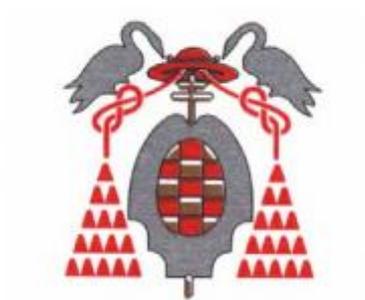


UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales



*CARACTERIZACIÓN DEL COCLEOGRAMA DE RATON CBA EN UN
MODELO DE OTOTOXICIDAD INDUCIDO POR RUIDO*

Tesis Doctoral

Lorena Sanz López

2013



Dña. TERESA RIVERA RODRÍGUEZ, Profesora Asociada en Ciencias de la Salud del Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales de la Universidad de Alcalá

Dña. ISABEL VARELA NIETO, Profesora de Investigación en CSIC

Y

D. CARLOS AVENDAÑO TRUEBA, Catedrático de Anatomía Humana en el Departamento de Morfología de la Universidad Autónoma de Madrid

Como Directores de la presente Tesis Doctoral

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado "CARACTERIZACIÓN DEL COCLEOGRAMA DE RATÓN CBA EN UN MODELO DE OTOTOXIDAD INDUCIDA POR RUIDO" realizado por Dña. Lorena Sanz López reúne los requisitos metodológicos y valor científico adecuados como para ser presentado y defendido para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a ocho de julio de dos mil trece.





D. FERNANDO NOGUERALES FRAGUAS, Catedrático de Cirugía y Director del Departamento de Cirugía y Ciencias Médicas y Sociales de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA

Que el trabajo presentado por **Dña. Lorena Sanz López** titulado "CARACTERIZACIÓN DEL COCLEOGRAMA DE RATÓN CBA EN UN MODELO DE OTOTOXIDAD INDUCIDA POR RUIDO" ha sido realizado, en el Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales y reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos suficientes para poder ser presentado como tesis doctoral ante el tribunal que corresponda.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a ocho de julio de dos mil trece.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y en el Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

La dirección de esta tesis se ha llevado a cabo con la colaboración de:

Dra. Teresa Rivera

Dra. Isabel Varela-Nieto

Dr. Carlos Avendaño

“ Ante los fenómenos que desfilan por los órganos sensoriales, la actividad del intelecto sólo puede ser verdaderamente útil y fecunda, reduciéndose modestamente a observarlos, describirlos, compararlos y clasificarlos, según sus analogías y diferencias, para llegar después, por inducción, al conocimiento de sus condiciones determinantes y leyes empíricas.”

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)
Regla y consejos sobre la investigación científica
Los tónicos de la voluntad.

“El silencio es el ruido más fuerte, quizá el más fuerte de todos los ruidos.”

Miles Davis (1926-1991)

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Teresa Rivera, a la Dra. Isabel Varela-Nieto y al Dr. Carlos Avendaño su esfuerzo, dedicación y comprensión como directores de mi tesis. Gracias por permitirme llevar a cabo este proyecto, por vuestros consejos, conocimientos y apoyo. Espero que muchos otros especialistas tengan la suerte de vivir la ciencia a vuestro lado.

Un especial agradecimiento a Silvia Murillo, Raquel Martínez y Guadalupe Camarero sin su ayuda esta tesis no hubiera sido lo que es. Por su amistad y disponibilidad, gracias a Fernando García-Alcántara, ya veras como tu tesis está al caer.

Agradecer a Julio Contreras y a Rafael Cediél sus enseñanzas técnicas y consejos prácticos.

A Laura Barrios, gracias por ayudarme con el análisis estadístico de los datos. Así como al Dr. José Zubeldia por la ayuda en el análisis de los niveles de IGF-1 y a Rosa Trueba por su asesoramiento bibliográfico.

Gracias a mis padres y a mi hermano por confiar siempre en mí. Tengo mucho que aprender de vosotros.

Y como no, a la persona que más quiero y más paciencia ha tenido conmigo, por todo el tiempo que te he robado por dedicarme a la realización de este trabajo y por estar ahí en esos pequeños momentos de flaqueza, gracias Guille. Es un lujo poder compartir esto contigo y todo aquello que esté por llegar.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y UNIDADES	13
RESUMEN	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Contaminación acústica	25
1.1.1. Reseñas históricas	
1.1.2. Datos epidemiológicos	
1.1.3. Alteraciones fisiológicas del ruido	
1.1.4. Medidas de prevención	
1.2. Hipoacusia inducida por ruido	35
1.2.1. Características del ruido	
1.2.2. Manifestaciones clínicas	
1.2.3. Relación del ruido con la tonotopía coclear	
1.3. Susceptibilidad genética al daño por ruido	39
1.4. Terapéutica de protección del oído interno	41
2. OBJETIVOS	45
2.1. Hipótesis	47
2.2. Objetivos	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1. Animales	51
3.2. Diseño del estudio	51
3.3. Exploración neurofuncional no invasiva	52
3.3.1. Auditory Brainstem Response	
3.3.2. Productos de distorsión de las emisiones otoacústicas	
3.4. Exposición a ruido	58
3.5. Medición de niveles de IGF-1 en suero	60
3.5.1. Canto interno del ojo	
3.5.2. Punción cardiaca	
3.6. Estudio morfológico	63
3.6.1. Histología básica	
3.6.1.1. Perfusión y fijación	
3.6.1.2. Extracción coclear	

3.6.1.3. Postfijación	
3.6.1.4. Inclusión y corte	
3.6.1.5. Tinción	
3.6.2. Recuento celular	
3.6.2.1. Exéresis coclear	
3.6.2.2. Descalcificación coclear	
3.6.2.3. Exéresis del órgano de Corti	
3.6.2.4. Tinción del órgano de Corti	
3.6.2.5. Montaje	
3.6.2.6. Estereología	
3.6.2.6.1. Delimitación de sectores en la región de interés	
3.6.2.6.2. Muestreo de sectores	
3.6.2.6.3. Recuento celular	
3.6.2.6.4. Recogida de datos	
3.7. Estadística	76
4. RESULTADOS	79
4.1. Efecto de la exposición a ruido en la función auditiva	81
4.1.1. Estudio comparativo de los umbrales auditivos y audiogramas tras exposición a ruido	
4.1.2. Estudio comparativo de los umbrales auditivos en respuesta a estimulación con tono puros	
4.1.3. Estudio comparativo de las latencias y amplitudes de los picos de ABR	
4.1.3.1. Latencias pico	
4.1.3.2. Latencias interpico	
4.1.3.3. Amplitudes	
4.1.4. Estudio comparativo de los umbrales auditivos de los DPOAES	
4.2. Evolución serológica de IGF-I tras la exposición a ruido excesivo	104
4.3. Citoarquitectura del órgano de Corti	107
4.3.1. Histología básica	
4.3.1.1. Órgano de Corti	
4.3.1.2. Ligamento espiral	
4.3.1.3. Limbo	
4.3.1.4. Estría vascular	
4.3.1.5. Ganglio	

4.3.2. Recuento celular	
4.4. Estudio cocleográfico	114
5. DISCUSIÓN	123
5.1. Mecanismos cocleares de daño y muerte celular inducidos por ruido	125
5.1.1. Lesiones cocleares de daño celular	
5.1.2. Procesos de muerte celular	
5.2. Efectos del ruido en la función auditiva	129
5.3. Importancia del IGF-1 en la función auditiva	133
5.4. Efectos del ruido en la morfología coclear	135
5.5. Cocleogramas	141
6. CONCLUSIONES	145
7. BIBLIOGRAFÍA	149
8. ANEXO	165

ABREVIATURAS Y UNIDADES

LISTADO DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
ABR	Auditory Brainstem Response
ATP	Adenosintrifosfato
Ca ²⁺	Calcio
CAE	Conducto auditivo externo
CC	Células ciliadas
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Células ciliadas internas
CE	Coeficiente de error
C.E.E	Comunidad Económica Europea
Cp	Ceruloplasmina
CSIC	Consejo superior de investigaciones científicas
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dB	Decibelios
dB SPL	Decibelios de nivel de presión sonora SPL
DPOAES	Productos de distorsión de las emisiones otoacústicas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Ev	Estría vascular
GER	Greater epithelial ridge
GLAST	Proteína transportadora de glutamato y aspartato
GPX	Glutation peroxidasa
h	Hora
HSF1	Heat Shock Trnscription factor 1
HSP	Heat Shock Protein
Hz	Hercios
IGF-1	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1
IGF1R	Receptor de IGF tipo 1
IHC	Inner hair cells
IPLS	Latencias interpico
K ⁺	Potasio
kHz	Kilohercios
L _{Aeq,d}	Límite de exposición diaria

ABREVIATURAS Y UNIDADES

L _{pico}	Límite pico
LE	Ligamento espiral
LER	Lesser epithelial ridge
Li	Limbo
NIHL	Noise induced hearing loss
NMDA	N-metil-D-aspartato
OC	Órgano de Corti
OD	Oído derecho
OHC	Outer hair cells
OI	Oído izquierdo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
Pmca2	ATPasa 2 Ca ²⁺ de la membrana plasmática
PON	Paraoxonasa
pps	Pulsos por segundos
PR2d	Momento de evaluación 2 días postruido
PR14d	Momento de evaluación 14 días postruido
PR28d	Momento de evaluación 28 días postruido
RATIO E/I	Ratio entre células ciliadas externas e internas
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SOD	Superoxidodismutasa
SSV	Ruido "swept sine violeta"
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores
V	Ruido Violeta.
Vs	Versus

UNIDADES

dB	Decibelios
dB SPL	Decibelios de nivel de presión sonora SPL
g	Gramos
h	Horas
Hz	Hercios
kg	Kilogramos
kHz	Kilohercios
μm	Micras por metro
μm ²	Micras por metro cuadrado
mg	Miligramos
ml	Militros
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
ng	Nanogramos
nV	Nanovoltios

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La pérdida auditiva inducida por ruido es la forma más frecuente de sordera adquirida, especialmente en sociedades industrializadas. Consiste en la exposición a sonidos de intensidad suficiente capaces de producir una pérdida auditiva temporal o permanente. Este efecto es acumulativo a lo largo de la vida, siendo actualmente la prevención la medida más efectiva contra este problema. El ruido puede dañar la mayoría de las poblaciones celulares de la cóclea pero las células ciliadas son la diana más señalada.

Un cocleograma es un registro gráfico donde se representan las células ciliadas a lo largo de la longitud de la membrana basilar, se caracteriza por ser capaz de relacionar el daño celular con variaciones de los umbrales auditivos para frecuencias específicas. Es por ello, que queremos analizar si existe una correlación funcional y anatomohistológica en los cocleogramas de ratones CBA sometidos a un modelo de ototoxicidad inducido por ruido, así como el valor pronóstico del factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF1) en el daño auditivo causado por la exposición a ruido.

MATERIAL Y METODOS: Se establecen cuatro grupos experimentales de ratones CBA machos con dos meses de vida al inicio del ensayo. Según el tipo de exposición a ruido se define un grupo control sin exposición (n=12), grupo de ruido 105 dB SPL (centrado en 2-22 kHz, n=12), grupo de ruido "láser" a 105 dB SPL (centrado en 8-13 kHz, n=12) y grupo de ruido 120 dB SPL (centrado en 2-22 kHz, n=8).

Se realiza en todos los animales una exploración neurofuncional no invasiva (potenciales evocados auditivos de tronco cerebral "ABR" y productos de distorsión de las emisiones otoacústicas "DPOAES") de forma basal para confirmar que son normoyentes y posteriormente en diferentes momentos tras la exposición a ruido (2, 14 y 28 días). Se realiza una extracción sanguínea en tres tiempos (basal, medio y final) para determinar los niveles de IGF-1 en suero mediante un Kit comercial (OCTEIA Rat/Mouse IGF-I ELISA AC18PL).

Al finalizar el ensayo los animales son sacrificados para conocer morfológicamente la citoarquitectura de las células ciliadas mediante técnicas de histología convencional (tinción de Nissl cresil violeta) y de recuento celular del órgano de Corti (tinción de faloidina y dapi). Se diseña un método de recuento celular para estudiar el comportamiento celular a lo largo de la longitud de la cóclea. Mediante el software estereológico "CAST", se define un área de estudio en las cócleas de los ratones y se realiza un muestreo aleatorizado para estudiar la densidad de las células ciliadas en los disectores delimitados. Las células se analizan de forma sistematizada a lo largo de todos los sectores de la cóclea (espira apical, media y basal).

Los datos estadísticos se evalúan con el SPSS V15.0 mediante el modelo lineal general de medidas repetidas y el test de correlación de Pearson.

RESULTADOS: Existe un aumento de los umbrales de ABR para los estímulos tipo click y para tonos puros (8, 16, 20, 28 y 40 Hz). El grupo control se mantiene en el tiempo, pero encontramos diferencias estadísticas altamente significativas con respecto a los otros tres grupos del ruido ($p < 0,000$), encontrando una gradación del daño: ruido 120 > ruido 105 > ruido "láser". Existe una disminución de las latencias pico e interpico (especialmente I-II) y de la amplitud de los picos I y II que se mantienen en el tiempo con diferencias significativas entre el grupo control y los grupos expuestos a ruido ($p < 0,000$). Los DPgramas de los grupos expuestos a ruido experimentan un aumento marcado de umbrales auditivos, con diferencias significativas para todas las frecuencias respecto al control, pero sin diferencias entre ellos.

La concentración media en suero de IGF-1 (ng/ml) obtenida fue de 463,13 +/- 109,315, y observamos que estos valores disminuyen en el tiempo de forma progresiva. Existe una menor concentración de IGF-1 a medida que empeoran los umbrales de audición por encima de 60 dB (Coeficiente de Pearson = -3,95, p : 0,031).

El estudio morfológico convencional permite ver una pérdida de fibrocitos en el ligamento espiral y en el limbo, junto con una desorganización del órgano de Corti en los grupos expuestos a ruido. El método de recuento celular muestra una pérdida, desorganización y aplastamiento de las células ciliadas e incluso disrupciones de la membrana basilar en los grupos expuestos a ruido (120 dB SPL > ruido 105 dB SPL > ruido "láser" > grupo control), mostrando diferencias significativas en las diferentes espiras de la cóclea ($p < 0,005$) según el tipo de ruido. Los cocleogramas específicos revelan diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

CONCLUSIONES: Los ratones CBA expuestos a ruido experimentan un desplazamiento de los umbrales auditivos. El grupo de ruido 120 dB SPL experimenta un mayor incremento del umbral auditivo, seguido del ruido 105 dB SPL y ruido "láser".

El método de recuento de densidad celular evalúa el número y daño de las CC del OC correlacionándose eficazmente con la tonotopía coclear en cada uno de los grupos del estudio. El descenso de los niveles de IGF-1 es un potencial marcador bioquímico de daño celular tras la exposición a ruido. Existe una correlación entre los niveles de IGF-1 en suero y el umbral auditivo, de manera que a menor nivel de IGF-1, hay un mayor nivel de umbral auditivo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTAMINACIÓN ACÚSTICA

La información que recibimos del medio ambiente nos llega a través de múltiples vías, pero es el órgano sensorial auditivo el que nos permite obtener la percepción para alcanzar una comprensión necesaria de los sonidos y poder actuar de una forma determinada. Desde el punto de vista social, gracias al sistema auditivo somos capaces de discriminar los sonidos correspondientes al lenguaje y la comunicación oral, la música o cualquier información sonora de nuestro entorno que se encuentre dentro de nuestro espectro de captación acústica. Pero, junto con estas sensaciones auditivas agradables, estamos expuestos a ruido y sonidos desagradables que son perjudiciales y pueden limitar nuestra vida diaria (1,2).

El ruido se define como un sonido no deseado o una sensación auditiva desagradable. Se compone de una parte subjetiva que es la molestia y una parte objetiva que puede cuantificarse, que es el sonido propiamente dicho. El estudio del ruido es complejo porque se produce por movimientos vibratorios no periódicos comprendidos en la mayoría de las frecuencias del espectro audible.

Los ruidos se pueden clasificar en función del tiempo o la frecuencia. Según el **tiempo** existen ruidos *continuos* (cuyo nivel de presión sonora permanece constante), *fluctuantes* (cuyo nivel de presión sonora fluctúa a lo largo del tiempo de forma periódica o aleatoria) e *impulsivos* (cuyo nivel de presión sonora se presenta por impulsos. Se caracteriza por un ascenso brusco del ruido y una duración total del impulso muy breve con relación al tiempo que transcurre entre impulsos). En cuanto a los tipos de ruido en función de la **frecuencia**, cabe destacar el ruido *blanco* como aquel ruido cuyo nivel de presión sonora permanece constante en un amplio ancho de banda de frecuencias, en la que todas tienen la misma intensidad.

El ruido es considerado un “estresante ambiental”, con el transcurrir de los años, con la industrialización y la falta de conciencia del daño producido por el ruido en las sociedades altamente desarrolladas, podemos decir que las hipoacusias inducidas por ruido son un problema que ha ido incrementándose día a día. Se estima que un tercio de la población mundial padece algún grado de hipoacusia causada por exposición a ruidos de alta intensidad (3,4).

1.1.1. Breve reseña histórica

Desde hace ya más de 2.500 años el ruido ha sido reconocido como perjudicial para el hombre. En el año 600 a.C. en el Golfo de Taranto en Calabria se prohibió a los trabajadores del metal el golpeteo continuo con los martillos sobre los materiales de hierro y bronce dentro de los límites de la ciudad.

La primera referencia escrita sobre los efectos del ruido en la audición se reflejó en el siglo primero de nuestra era, por Plinio el Viejo en su libro "La Historia Natural", que relataba como la gente que vivía cerca de las cataratas del Nilo, acababa quedándose sorda (5).

En 1627 Francis Bacon describió varios de los efectos que acontecen tras una exposición prolongada a una intensa fuente sonora. Bacon escribió literalmente frases como estas: "Un ruido intenso y próximo es la semilla de muchas sorderas", "Yo mismo, estando cerca de un ruido estridente, (similar al usado para llamar a un halcón) tuve, de repente, una sensación como si algo se hubiese roto o dislocado en mi oído, e inmediatamente después un zumbido intenso,... Yo temí alguna sordera. Pero, tras aproximadamente un cuarto de hora, desapareció..." (6).

En 1713 Ramazzini describió el riesgo de sordera que padecían los trabajadores del bronce en "De morbisartificum Diatriba", introduciéndose por primera vez el concepto de enfermedad laboral (7).

La historia da cuenta de oficiales que padecían sordera permanente por los repetidos disparos de sus cañones así como relató Rodney en 1782 en la batalla de Copenhague (8).

En la época de la revolución industrial existen más ejemplos históricos de las alteraciones auditivas producidas por el ruido: Parry en 1825, describió casos de pérdida parcial o total de la audición de forma temporal o permanente en personas expuestas a ruido de fábricas de metalurgia. Y Fosbroke en 1830, definió la "enfermedad de los caldereros" como la hipoacusia que presentan los trabajadores de las fraguas (9,10).

En 1950, fue Kryter quién estableció un límite de intensidad sonora a partir del cual y en función de las horas semanales a las que un individuo estaba expuesto, presentaría más riesgo de padecer hipoacusia. El límite de presión sonora fue 85 decibelios (dB), por lo que un

trabajador expuesto durante 8 horas (h) diarias en 50 semanas al año durante 5 años consecutivos presentaba un probabilidad de padecer un daño auditivo bajo. Por el contrario siempre que se aumentara el límite de 85 dB, aunque fuera en periodos de tiempo inferiores a los 5 años, habría un mayor riesgo de presentar un daño permanente (11).

El dB es la principal unidad de medida utilizada para el nivel de potencia y el nivel de intensidad del sonido. Es una unidad de medida adimensional y relativa, es una función logarítmica y es la décima parte del belio. Cabe precisar que cuando en el texto se mencione dB, nos referiremos a dB *Hearing Level*, es decir, dB de umbral auditivo. Es importante recalcar, que existe otro tipo de dB conocidos como *Sound Pressure Level*, dB del nivel de presión sonora (dB SPL), que toma como referencia el menor nivel de presión sonora que el oído puede detectar; a lo largo de los experimentos será a estos dB a los que se hará referencia.

A partir del siglo XX, con la culminación del desarrollo industrial, el incremento de los medios de transporte, la utilización del ruido en las actividades lúdicas, las nuevas tecnologías y el aumento de densidad de la población, han hecho que los niveles sonoros hayan ido creciendo, convirtiendo la contaminación acústica en un importante problema medioambiental.

A partir de los últimos 30 años es cuando la sociedad ha dejado más patente la preocupación por la exposición al ruido. En 1975, apareció la primera “*Norma ISO 1999*” donde se pretende normalizar la determinación del riesgo auditivo por exposición a ruido. Se establecía un criterio para valorar el riesgo auditivo, se utilizó 25 dB para el promedio del aumento del umbral auditivo de las frecuencias conversacionales, y se estableció como nivel sonoro continuo el equivalente referido a una semana laboral de 40 h. Es decir, se proporcionaba una definición de pérdida auditiva global en función de las características de la exposición (12).

La Comunidad Económica Europea (C.E.E.) decidió que 1987 fuera el Año Europeo del Medio Ambiente, y se creó una serie de normas para la prevención y medios de protección del mismo, incluyéndose un apartado que hace relación al ruido como uno de los agentes contaminantes medioambientales de mayor importancia.

Posteriormente en 1990 apareció la segunda edición, actualmente en vigor, la “Norma ISO 1999-1990”, que propone determinar cómo se distribuye el daño auditivo, expresado como los desplazamientos del umbral medio de audición. La diferencia entre ambas es que en la edición original (1975) se establecía un criterio para valorar el riesgo auditivo, es decir, se proporcionaba una definición de pérdida auditiva global en función de las características de la exposición, mientras que en la edición de 1990 se limitaba a decir cuál es el desplazamiento del umbral esperable ante determinadas condiciones de exposición, dejando a cada usuario la responsabilidad de definir cuánto se considera aceptable y cuánto no (12).

Cabe resaltar como en el siglo XXI, la norma directiva del Parlamento Europeo “2003/10/CE” hace referencia a las normas de seguridad de los trabajadores en cuanto a los riesgos derivados del ruido y sus medidas de seguridad. Además también recalca la importancia de la salud ambiental en relación con el ruido, tanto es así que el Tribunal Supremo de Sentencia 13/10/2008 en la ciudad de Santo Domingo reconoce la lesión de los derechos fundamentales de integridad física por razón del sobrevuelo de baja altura de aeronaves (13).

1.1.2. Datos epidemiológicos

Se ha estimado que entre el 17 y 22 % de la población de la Unión Europea, es decir cerca de 80 millones de personas, sufre niveles de ruido que se consideran inaceptables. Se exponen a ruidos superiores al límite de tolerancia de 65 dB, que es la tolerancia permitida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3,4,14) (FIGURA 1).

Se calcula que el ruido, bien de forma directa o indirecta, es el responsable del 11 % de los accidentes laborales, y que la hipoacusia que desencadena ocupa el tercer lugar en lo que a enfermedades profesionales se refiere (15,16).

Se estima que 170 millones de ciudadanos viven en las denominadas “zonas grises del ruido”, donde los niveles de ruido son 55-65 dB durante la mayor parte del día. Japón es el país más ruidoso del mundo, seguido de España y posteriormente de México. Es importante recalcar que nuestro país es el más ruidoso del continente europeo: durante el día nos encontramos entre 62 y 72 dB de niveles de “ruido equivalente” (4,17,18). El riesgo de pérdida auditiva empieza a ser significativo a partir de un nivel equivalente diario de 80 dB suponiendo

varios años de exposición. El promedio diario del nivel de presión sonora asignable a un puesto de trabajo es lo que conocemos como “ruido equivalente”.

Usualmente el ruido que normalmente soportamos, varía desde los 20 dB de un dormitorio durante la noche, los 40-50 dB de una vivienda durante el día, los 90 dB producidos por el paso de un camión o un tren suburbano e, incluso los 100-125 dB que escuchamos ante un ruido industrial, el motor de un avión o el de un motor de explosión a escape libre, como se refleja en la siguiente figura.

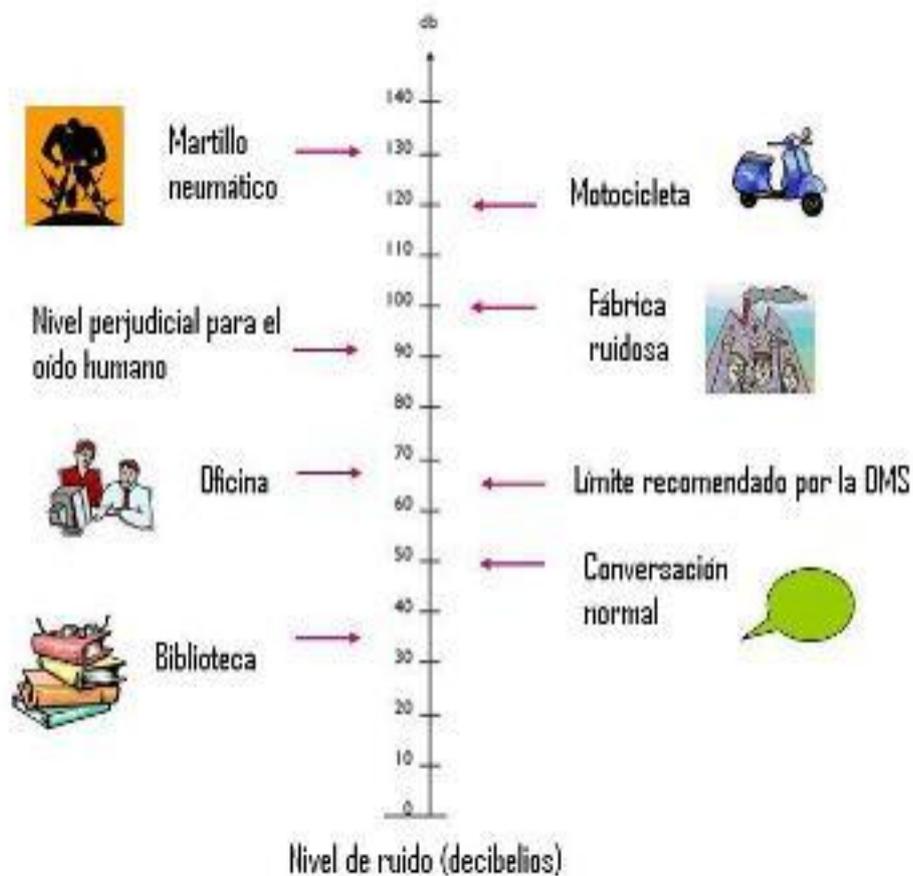


Figura 1. Niveles de ruido en el medio ambiente. Imagen disponible en: (19)

1.1.3. Alteraciones fisiológicas producidas por el ruido

El ruido ambiental genera efectos nocivos importantes sobre la salud y la calidad de vida de la población. Los efectos auditivos pueden ser consecuencia directa del efecto de la energía del sonido en el oído interno, sin embargo los efectos no auditivos (que afectan a otros

órganos o sistemas, además del aparato auditivo) se inician antes de que el sonido sea suficientemente alto como para causar daños en el sistema auditivo (>85 dB) (15,20).

Estudios epidemiológicos y en modelos animales han relacionado los **efectos adversos no auditivos** del ruido con alteraciones en el sistema neuroendocrino, en el sistema cardiovascular y en los patrones normales de sueño entre otros (3,21), pero resulta difícil distinguir entre los efectos primarios del ruido como agente estresante y sus efectos secundarios en otros sistemas como consecuencia de la respuesta a estrés (FIGURA 2). El ruido produce las siguientes alteraciones (22,23) :

- *Alteraciones hormonales:* a partir de niveles de ruido superiores a 60 dB se produce aumento de secreción de adrenalina y noradrenalina, así como aumento de prostaglandinas. También se sabe que afecta al eje hipotálamo-hipofisario con aumento de gonadotropinas y producción de estrógenos.
- *Alteraciones cardíacas:* aceleración del ritmo cardíaco, aumento de la tensión arterial, aumento de frecuencia cardíaca y aumento de flujo vascular periférico.
- *Alteraciones en el ciclo vigilia-sueño:* a partir de 45 dB de ruido, se producen alteraciones del sueño que pueden convertirse en crónicas como hipersomnia diurna, sueño no reparador, cansancio, cefalea, irritabilidad y aumento de la agresividad.
- *Alteraciones digestivas:* aumento de la secreción gástrica, riesgo de ulcus péptico.
- *Alteraciones neurológicas:* dificultad para el aprendizaje, problemas de comunicación y memorización, disminución del rendimiento intelectual y falta de concentración.
- *Alteraciones psicológicas:* El ruido ambiental no causa directamente enfermedades mentales, pero se presume que puede acelerar e intensificar el desarrollo de trastornos mentales latentes. La exposición a altos niveles de ruido ocupacional se ha asociado con el desarrollo de neurosis y estados de ansiedad.

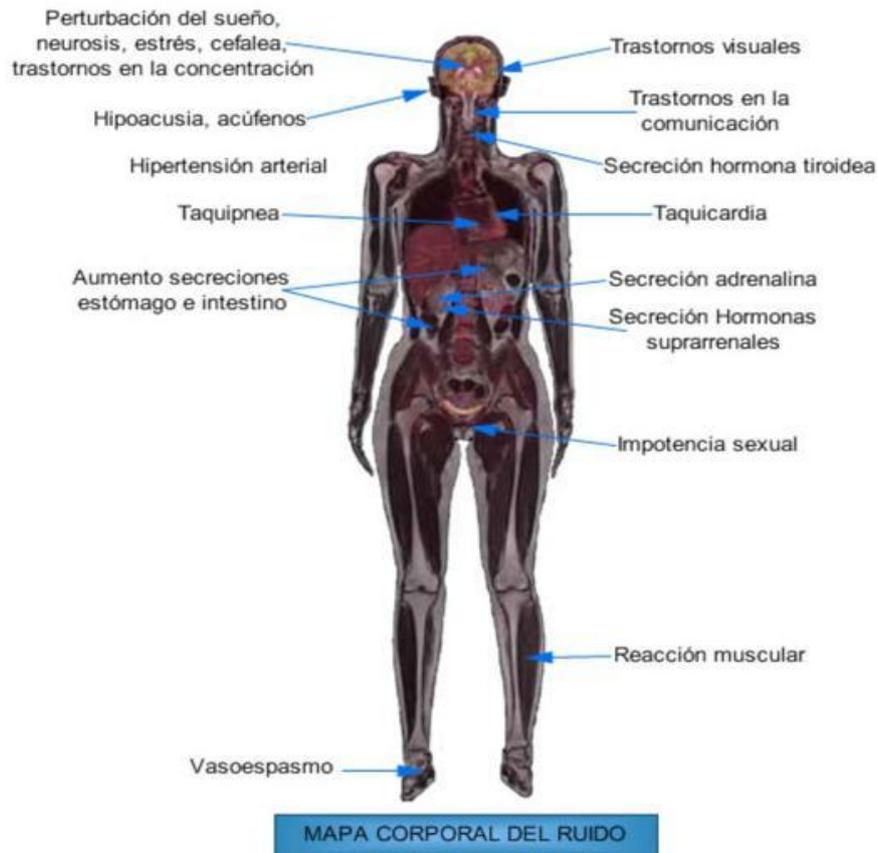


Figura 2. Mapa corporal del ruido. Imagen disponible en: (24).

Las **cambios fisiopatológicos auditivos** ocasionados por el ruido fueron especificados) por Eldredge (25,26) quién desarrolló una escala con nueve niveles para explicar el grado de lesión celular del oído interno ocasionado por la exposición a ruido, reflejando de menos a más todas las lesiones histopatológicas que pueden deberse a un daño acústico:

- Estructuras macroscópicamente dentro de la normalidad
- Tumefacción moderada y picnosis de las células ciliadas (CC) con redistribución de sus estereocilios
- Desplazamiento de los núcleos de las CC, con formación de vacuolas en las células de sostén (células de Deiters, Hensen y Claudius)
- Desplazamiento de las células mesoteliales de la membrana basilar
- Desintegración, picnosis con cariorrexis de las células ciliadas externas (CCE)
- Desplazamiento y fractura de los estereocilios o incluso fusión de cilios
- Vacuolización de las células de sostén
- Desaparición de las células mesoteliales

- Ausencia de células CCE
- Ausencia de células ciliadas internas (CCI)
- Colapso del órgano de Corti (OC)
- Ausencia de membrana basilar

El ruido puede dañar la mayoría de las poblaciones de la cóclea pero las CC son la diana más señalada. Las células de la base de la cóclea son más vulnerables y se pierden primero. Además, esta pérdida aumenta con el tiempo continuando incluso hasta 30 días después de la exposición. Los estereocilios de las CC pueden romperse, fusionarse o perder las uniones *tip-link* que llevan a la pérdida de integridad estructural (27). Estos cambios están directamente relacionados con la presencia de elevaciones permanentes de umbral (28). Tras la sobreestimulación del OC se destruyen las CC en la región de amplitud máxima de movimiento de la membrana basilar; las CCE son las primeras en sucumbir, y más tarde las CCI como consecuencia de una exposición más intensa; a continuación se produce una degeneración de las fibras nerviosas y las células ganglionares en áreas de las cuales han sido eliminadas todas las CC (29-31).

Ante un daño acústico agudo de gran intensidad se han descrito diferentes alteraciones anatómicas que van desde una redistribución grave de los estéreocilios de las CCI y CCE hasta la completa ausencia del OC y la ruptura de la membrana de Reissner; incluso la endolinfa puede contener residuos de CC destruidas después de la exposición (32). Existe una tumefacción y edema de la estría vascular que puede durar varios días (33), junto con un incremento del potasio (K^+) de la perilinfa (34,35).

El daño en las células de soporte afecta a la impedancia de la vibración de la membrana basilar y provoca fallos en la vibración correcta del OC. Además la pérdida de estas células también puede contribuir a la pérdida de CC (36).

El balance iónico también puede alterarse por efecto del ruido debido a la pérdida de fibrocitos tipo II y tipo IV, que puede llevar a alteraciones en la circulación del K^+ a través de la cóclea, así como también una disminución de los niveles de enzimas que participan en el intercambio iónico activo de sodio (Na^+), $Na^+-K^+-ATPasa$ y calcio (Ca^{2+})- $ATPasa$ (27,32,37).

El circulación del Ca^{2+} intracelular en las CC, es importante ya que se sabe que el ruido es capaz de despolarizar neuronas en ausencia de cualquier otro estímulo. Estudios al respecto

han demostrado que las alteraciones o distorsiones que sufre la onda de propagación del Ca^{2+} intracelular en las neuronas son debidas a cambios en los canales del Ca^{2+} . Los niveles bajos de Ca^{2+} en las CCI, parecen intervenir en la prevención de la hipoacusia inducida por ruido (38-40).

Otros efectos del ruido incluyen ruptura de los terminales dendríticos de las neuronas aferentes primarias, aumento de tamaño de la estría vascular en agudo y encogimiento a largo plazo, cambios en el potencial endococlear y reducciones en el flujo de sangre coclear, que aunque sean temporales, pueden llevar a daños permanentes en los tejidos de la cóclea.

Entre los posibles mecanismos que pueden causar estos cambios patológicos destacan los daños directos mecánicos sobre los estereocilios de las CC. Gravendeel (41) sugirió que el daño auditivo inducido por ruido a largo plazo representa una acumulación gradual de microtraumatismos por ruido. Si en un ruido con un nivel promedio moderado se añadiera un pico irregular de mayor intensidad, se podrían lesionar las CC de manera irreversible. Incluso con los ruidos más continuos existiría una pérdida celular de forma progresiva, por lo que si bien no puede medirse el efecto de la exposición de un sólo día, después de varios años la pérdida acumulada de CC por estos microtraumatismos pasa a ser significativa.

Existen unos cambios bioquímicos asociados como la disminución de los ácidos nucleicos de las células y adenosintrifosfato (ATP), disminución del glucógeno, y el aumento de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS) como los superóxidos, peróxidos y radicales hidroxilo que favorecen una fatiga auditiva tras la exposición a ruido que conlleva a un agotamiento de metabolitos, y en definitiva a una muerte celular por mecanismos de apoptosis o necrosis (27,42,43).

1.1.4. Medidas de prevención

Las lesiones auditivas inducidas por la contaminación acústica son la forma de hipoacusia más fácil de prevenir mediante la regulación de la fuente emisora, bien en el ámbito laboral como en el social y urbano. Sin embargo, las medidas para reducir el ruido ambiental han tenido menos prioridad en la sociedad que las encaminadas a hacer frente a otros problemas medioambientales del aire o del agua (15,44).

Dentro del campo de la medicina laboral es obligatorio la realización de controles audiométricos periódicos para detectar precozmente los posibles cambios en el umbral

auditivo. La medida más importante es la protección personal ante el agente nocivo. Es por ello que queda reflejada en el *Real Decreto del 10 de Marzo 286/2006* una serie de disposiciones que tienen como objetivo la protección de los trabajadores contra los riesgos para su seguridad que puedan derivarse de la exposición al ruido. Regula las disposiciones encaminadas a evitar o a reducir la exposición, de manera que los riesgos derivados de la exposición al ruido se eliminen en su origen o se reduzcan al nivel más bajo posible. También se incluye la obligación del empresario a establecer y ejecutar un programa de medidas técnicas y organizativas destinadas a reducir la exposición al ruido, así como la necesidad de formación y de información de los trabajadores (1,4).

El Real Decreto 286/2006 dicta que los valores límites acumulativos de exposición diaria, junto con los valores de exposición que dan lugar a una acción, se fijen entre 80-87 dB y se dicta que el límite de un pico de intensidad sonora no sea mayor de 140 dB (45).

Para ello se establece el **nivel de exposición diario equivalente** ($L_{Aeq,d}$), se define como el nivel de dB a los que es un trabajador es expuesto a una presión acústica en un día. Se considerarán todos los ruidos existentes en el trabajo, incluidos los ruidos de impulsos. Y el **nivel de exposición pico** (L_{pico}), es valor máximo de la presión acústica instantánea en decibelios al que está expuesto el trabajador.

- a. Valores límite de exposición:

$$L_{Aeq,d} = 87 \text{ dB y } L_{pico} = 140 \text{ dB}$$

- b. Valores superiores de exposición que dan lugar a una acción:

$$L_{Aeq,d} = 85 \text{ dB y } L_{pico} = 137 \text{ dB}$$

- c. Valores inferiores de exposición que dan lugar a una acción:

$$L_{Aeq,d} = 80 \text{ dB y } L_{pico} = 135 \text{ dB}$$

En el campo urbano y social se establecen como medida preventiva una serie de niveles máximos auditivos permisibles que se ajustan según cada actividad específica. Por ejemplo, en áreas hospitalarias y áreas residenciales debe oscilar entre 45 y 55 dB por el día, disminuyendo ambos 10 dB por la noche, y en zonas comerciales y almacenes no superar los 65-70 dB, respectivamente. En relación con los dispositivos musicales, los auriculares no deberían

superar los 85 dB. Y en salas de conciertos o discotecas no superar los 110 dB en ruido ambiente; en referencia a este último dato, se aconseja no estar expuesto durante un periodo de cuatro horas consecutivas ya que la exposición podría generar deficiencia auditiva significativa.

1.2. HIPOACUSIA INDUCIDA POR RUIDO

La pérdida auditiva inducida por ruido o '*noise induced hearing loss*' (NIHL) es la forma más frecuente de sordera adquirida, especialmente en sociedades industriales. Consiste en la exposición a sonidos de intensidad suficiente como para dañar el oído y provocar una pérdida auditiva temporal o permanente. El daño auditivo inducido por ruido puede ser causado de forma instantánea, por un único ruido impulsivo o explosivo, de gran intensidad que normalmente supera los 140 dB; o bien de forma crónica por un nivel base de ruido elevado, como resultado de la exposición en el ambiente de trabajo a un ruido continuo o intermitente de intensidad moderada o alta (9,46,47).

La NIHL, se caracteriza por ser de comienzo insidioso y presentación bilateral y simétrica. Al igual que todas las hipoacusias sensorineurales, se trata de una afección irreversible, pero a diferencia de éstas, la NIHL puede ser prevenida.

1.2.1. Características del ruido

Las consecuencias de la exposición a ruido en la función auditiva varían dependiendo de varios factores que incluyen el tipo de ruido, la intensidad, la cronicidad y la susceptibilidad individual (1,48).

- *Frecuencia*: la sensibilidad que tiene la cóclea en función de la frecuencia es dependiente de la función de transmisión del oído externo y del oído medio, que son quienes modulan, actúan de caja de resonancia y amplifican las frecuencias en la región de 2-3 kilohertzios (kHz) unos 10-15 dB. En la especie humana las células ciliadas más susceptibles a la acción del ruido son las encargadas de percibir frecuencias entre 3 y 6 kHz, convirtiéndose en el primer

signo de alarma de NIHL el escotoma de 4 kHz. Los ultrasonidos con frecuencias superiores a 20 kHz e inaudibles para el oído humano, deben superar los 110 dB para causar daño (47).

- *Intensidad, tiempo e intermitencia:* La pérdida auditiva inducida por un ruido promedio en un grupo de trabajadores, aumenta con la intensidad del ruido y el tiempo de exposición casi de forma lineal. En un lugar de trabajo en el cual la intensidad del ruido es constante, el aumento de la pérdida auditiva inducida por ruido con el tiempo se aproxima a una función exponencial. Se considera que el límite para evitar la hipoacusia es de 80 dB para una exposición de 40 h semanales a un ruido constante. Por lo tanto, el daño aumenta con rapidez al principio, pero luego se hace más lento de manera gradual. La mayor parte de la pérdida auditiva inducida por ruido es producida en los primeros 5 años de exposición (49,50).

En cuanto a la relación con el tiempo, si las exposiciones son interrumpidas se reduce el daño, debido a una recuperación de la fatiga auditiva. Se puede tolerar una mayor cantidad de energía si la exposición es intermitente en lugar de constante ante un único impulso de ruido corto e intenso (51).

- *Edad:* Si bien podría suponerse que los oídos de los jóvenes fueran más resistentes al ser más elástica su membrana basilar, no hay datos aún concluyentes que permitan constatar esta hipótesis. Se estima que en la edad media de la vida hay más posibilidades de lesión, existiendo mucha controversia por la interrelación que pueda haber con la presbiacusia propia de la edad (23,52,53).
- *Sexo:* no hay un claro predominio de sexo, pero las mujeres tienen una agudeza auditiva superior a la del hombre, y son más resistentes al ruido que el hombre (10).
- *Susceptibilidad individual:* La susceptibilidad al ruido puede ser hereditaria, incluso debida a ototóxicos, meningitis, diabetes mellitus e hipertensión arterial entre otras (54,55).
- *Trastornos del oído medio:* Las alteraciones del oído medio reducen el flujo de energía a la cóclea disminuyendo por tanto la cantidad de pérdida auditiva por

ruido. Se necesita una mayor presión acústica para estimular el oído interno, pero cuando la intensidad es lo suficientemente elevada provoca el daño esperado (10).

- *Otros:* Algunos estudios han demostrado la relación de la hipoacusia inducida por ruido en relación con fármacos como ácido salicílico, quinina, y diversos antibióticos aminoglucosídicos, como dihidroestreptomicina, kanamicina y neomicina (56,57). Sin embargo, no se ha visto una relación significativa con el déficit vitamínico, la alimentación o el consumo de tabaco (58-60).

1.2.2. Manifestaciones clínicas

Los pacientes con NIHL pasan por diferentes etapas (24,47,61) (FIGURA 3). Inicialmente se encuentran asintomáticos, pero una vez que las lesiones se han establecido, pueden comenzar a referir acúfenos de predominio vespertino coincidiendo con el final de la jornada laboral, que se asocian a una hipoacusia selectiva de la frecuencia 4 kHz sin afectación de las frecuencias conversacionales. Es lo que se conoce como fase 1 “*de instalación*”, en la que los síntomas son recuperables al cesar la exposición y la pérdida es de hasta 40 dB en la zona de 4 kHz.

Posteriormente aparecen síntomas subjetivos en la fase 2 “*de latencia*”, los pacientes perciben la pérdida de audición, elevan el volumen de los aparatos electrónicos y pueden presentar mala inteligibilidad verbal, ya que existe una pérdida de 20-30 dB en la zona de 4 kHz, pero también se afectan las frecuencias de 3 y 6 kHz, quedando de nuevo conservado el umbral conversacional en rango de normalidad. La fase 2 suele suceder entre los 2 y 10 años de exposición y no hay reversibilidad del daño.

Cuando la hipoacusia se manifiesta como una disminución de 50-70 dB en las frecuencias de 4 ó 6 kHz, y el escotoma se profundiza y se transforma en la “*cubeta traumática*” nos encontramos es la fase 3 “*de latencia subtotal*”.

Por último, la fase 4 “*de hipoacusia manifiesta o terminal*” de la NIHL evoluciona a una pérdida que se extiende a 500 Hz, afectando a las frecuencias graves, conversacionales y sin recuperación de las frecuencias agudas. Se acompaña de acúfenos continuos e incluso vértigo en menor proporción.

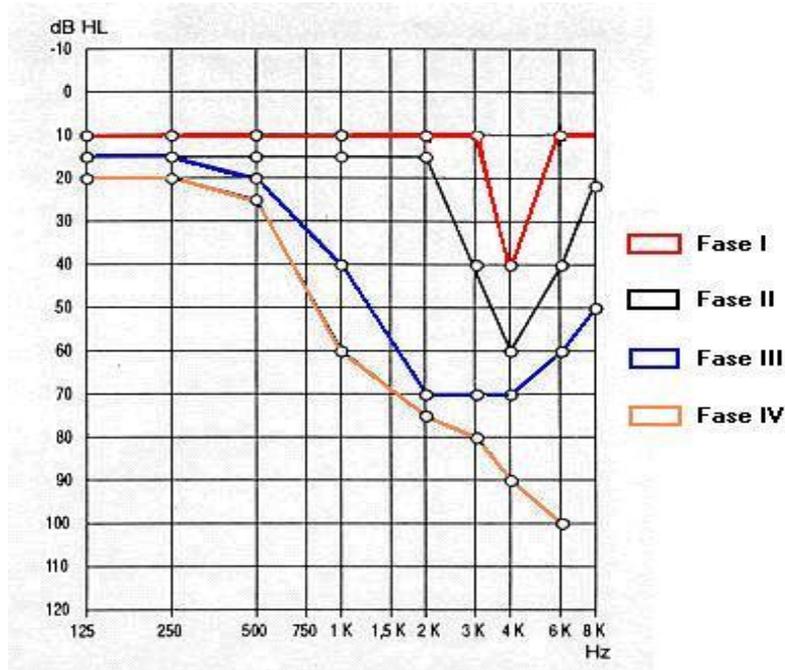


Figura 3. Evolución en el tiempo de las alteraciones audiométricas producidas en NIHL. Imagen disponible en: (24)

1.2.3. Relación del ruido con la tonotopía coclear

Un tono puro de alta intensidad da origen a ondas que viajan desde la ventana oval hacia el ápice de la cóclea, aumentando gradualmente en amplitud a medida que avanzan en dirección apical hasta alcanzar un máximo, a partir del cual la amplitud desciende de manera precipitada; en consecuencia, la distribución espacial de la amplitud del movimiento es asimétrica (62).

El punto de máxima amplitud depende de la frecuencia: el máximo de las frecuencias altas ocurre hacia el extremo basal; el de las frecuencias bajas ocurre hacia el ápice. En consecuencia, no sorprende que los estudios iniciales demostraran que en general los sonidos de alta frecuencia producen mayor daño cerca de la ventana oval, mientras que los sonidos de baja frecuencia afectan más a las porciones más apicales; más aún, debido a la asimetría de la distribución de las amplitudes, la dispersión del daño por la exposición continua tiende a ser mayor en dirección basal. Normalmente, los tonos puros de frecuencias bajas, en el rango de 250-500 Hz, provocan lesiones en la espira apical de la cóclea, mientras que los tonos puros de frecuencias altas superiores a 4 kHz producen lesiones en las CC de la espira basal (34,63,64).

1.3. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL DAÑO POR RUIDO

Entre los individuos expuestos a ruidos similares unos llegan a desarrollar NIHL mientras que otros no, lo que apunta a que la variabilidad individual juega un importante papel en la NIHL. La NIHL es por tanto una patología compleja que depende de factores genéticos, médicos y ambientales. En la especie humana se sabe relativamente poco de los factores genéticos implicados en el NIHL. En teoría, cualquier gen que debilite el oído, funcional o estructuralmente, podrá hacerlo más susceptible al daño por ruido.

El estudio de polimorfismos genéticos humanos ha evidenciado diferencias significativas entre sujetos resistentes y vulnerables a ruido. Los sujetos seleccionados pertenecían a una población de trabajadores expuestos a ruido de forma ocupacional y se comparaban con un grupo control. Los genes estudiados se han relacionado con la susceptibilidad individual a presentar NIHL. Hay estudios donde un mismo genotipo puede conferir una susceptibilidad diferente al NIHL dependiendo del nivel de ruido al que se ve expuesto el sujeto (65,66).

En 2006 en la Universidad de Amberes se encontraron diferencias significativas entre los trabajadores expuestos a ruido en la secuencia de tres genes, *KCNE1*, *KCNQ1* y *KCNQ4* que estaban presentes en los sujetos más sensibles al ruido. El *KCNE1* mostró la relación entre el aumento de vulnerabilidad ante el ruido con un canal codificador de K^+ que se abría más rápidamente que de forma fisiológica (67).

Se han encontrado polimorfismos en los genes relacionados con el estrés oxidativo, en los genes paraoxonasa 1 (*PON1*), paraoxonasa 2 (*PON2*), y superóxido dismutasa 2 (*SOD2*) en 94 trabajadores expuestos a ruido (68). Los polimorfismos encontrados en *PON2* y *SOD2* revelaron una asociación significativa con la pérdida de la audición.

Abreu-Silva y colaboradores estudiaron las mutaciones de genes más frecuentes en familias con hipoacusia *35delG*, *167delT* en *GJB2*, D (*GJB6-D13S1830*), D (*GJB6-D13S1854*), *A1555G* en *MTRNR1*, secuencias *SNP rs877098* en *DFNB1*, *GSTM1* y *GSTT1*, y encontraron que la delección del gen *GSTM1* y *GSTT1* producía una alteración de la glutatión-S-transferasa que hace que esas familias sean menos resistentes a los efectos del ruido (55). Sin embargo,

Carlsson et al en 2005 no pudieron confirmar la asociación entre *GSTM1* y NIHL en un conjunto de 1.261 trabajadores suecos expuestos a ruido. También se analizaron otros genes implicados en el estrés oxidativo en el mismo estudio (*GSTT1*, *SGPC*, *CAT*, *SOD*, *GPX1* y *GSR*), pero no se hallaron asociaciones significativas (56).

En la TABLA 1 se recogen algunos de los genes que intervienen en la susceptibilidad individual de la NIHL; cabe resaltar que todos estos genes están relacionados con procesos de estrés oxidativo, con vías de reciclaje de K^+ , proteínas de choque térmico (*heat-shock*, HSP) y también con proteínas motoras y de adhesión celular.

Tabla 1. Genes y alelos en humanos relacionados con NIHL. (Tabla adaptada de Konings et al ,2009) (65).

Ámbito	Gen/Alelo	Producto	Referencias
<i>Genes relacionados con estrés oxidativo</i>	<i>SOD2</i> polimorfismo	Superóxido dismutasa	Fortunato et al. , 2004
	<i>PON2</i> polimorfismo	Paraoxonasas	Fortunato et al. , 2004
	<i>CAT</i> SPN	Catalasa	Konings et al. , 2007
	<i>GSTT1</i> delección	Glutation S-transferasa theta-1	Abreu-Silva et al. , 2010
	<i>GSTM1</i> delección	Glutation S- tranferasa Mu 1	Rabinowitz et al. 2002 Abreu-Silva et al. , 2010
<i>Genes relacionados con reciclaje de K^+</i>	<i>KCNE1</i> SPN	Subunidad β canal K^+	Van Laer et al. , 2006
	<i>KCNQ1</i> SPN	Subunidad α canal K^+	Van Laer et al. , 2006
	<i>KCNQ4</i> SPN	Canal de K^+ Voltaje dependiente	Van Laer et al. , 2006
<i>Genes relacionados con adhesión celular</i>	<i>PCDH15</i> SNP	Protocadherina 15	Konings et al. , 2009
<i>Genes relacionados con proteínas motoras</i>	<i>MYH14</i> SNP	Miosina, cadena pesada 14	Konings et al. , 2009
<i>Genes relacionados con respuesta a estrés celular</i>	<i>HSP70-1</i> , <i>HSP70-2</i> y <i>HSP70-hom</i> SPN	Proteínas Heat-Shock	Konings et al. , 2009b

Una importante contribución al estudio de los factores genéticos deriva de la investigación en modelos animales donde destacan los ratones genéticamente modificados y también las diferentes cepas de ratones. En cepas de ratones C57BL/6J B6 y DBA/2J D2, se ha determinado la presencia del alelo recesivo “*Ahl*” que se mapea en el cromosoma 10, e incrementa la susceptibilidad al daño por ruido con respecto a cepas como los CBA/J y los CBA/CaJ. Además otros loci se han visto implicados tanto en NIHL como en susceptibilidad a la presbiacusia. La acción de los productos de estos genes no es totalmente conocida pero se sabe que incluye mediadores de señal como fosfoproteína estimulada por vasodilatadores

(*VASP*), y de manera similar a los estudios en humanos, genes implicados en la regulación iónica (*Pmca2*, *Cp*) o en mecanismos protectores (*HSF1*, *SOD1*, *GPX1*) (69-71).

Se sabe que ratones deficientes en *Sod1* y *Gpx1*, dos genes implicados en los mecanismos antioxidantes de la célula, son más susceptibles a NIHL que los wildtype (23,72).

Estos genes estudiados apuntan al Ca^{2+} , al hierro y a las especies ROS como mediadores del daño por ruido y sugieren un posible papel protector de antioxidantes y HSP (73). Otros modelos animales estudiados implican a proteínas transportadoras (GLAST) y del citoesqueleto (distrofina) en la susceptibilidad al ruido (74,75).

1.4. TERAPÉUTICA DE PROTECCIÓN DEL OIDO INTERNO

En la clínica diaria existe una serie de limitaciones a la hora de indicar un tratamiento medico efectivo a los pacientes que presentan NIHL. Como se ha mencionado antes la prevención es la única medida electiva que evita las lesiones asociadas ante la exposición a ruido junto con los dispositivos auriculares que suponen una barrera física de protección acústica.

Actualmente existen varias líneas de investigación que abogan por tratamientos médicos farmacológicos que disminuyen los efectos lesivos del ruido y protegen el oído interno, tales como : antioxidantes (44,76-81), antagonistas de glutamato (10,82-84), bloqueantes de los receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) (74,85-87), quelantes de hierro (10,88), neutralizantes de los ROS (89-91) y factores neurotróficos como el TGF β (factor de crecimiento transformante beta) (92,93) y el factor de crecimiento semejante a la insulina de tipo 1(IGF-1) (94-96).

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF) son una serie de péptidos que están involucrados en procesos celulares como la proliferación, la supervivencia, la migración celular y la diferenciación.

El IGF-1 es una cadena única de 70 aminoácidos, secretada fundamentalmente por el hígado, pero también por otros órganos y ejerce acciones autocrinas o paracrinas. Las acciones

biológicas de los IGF están mediadas por receptores de distintos tipos. El receptor de insulina y el receptor de IGF-1 (IGF1R) son receptores transmembrana con actividad tirosinquinasa (FIGURA 4). El IGF1R es un receptor tetrámero y puede unir IGF-1 y también insulina con mucha menor afinidad. Por otra parte, está el receptor tipo II que carece de actividad tirosinquinasa, el cual es un receptor monomérico que une manosa-6-fosfato que se encarga principalmente de controlar los niveles de los IGF en el medio (97).

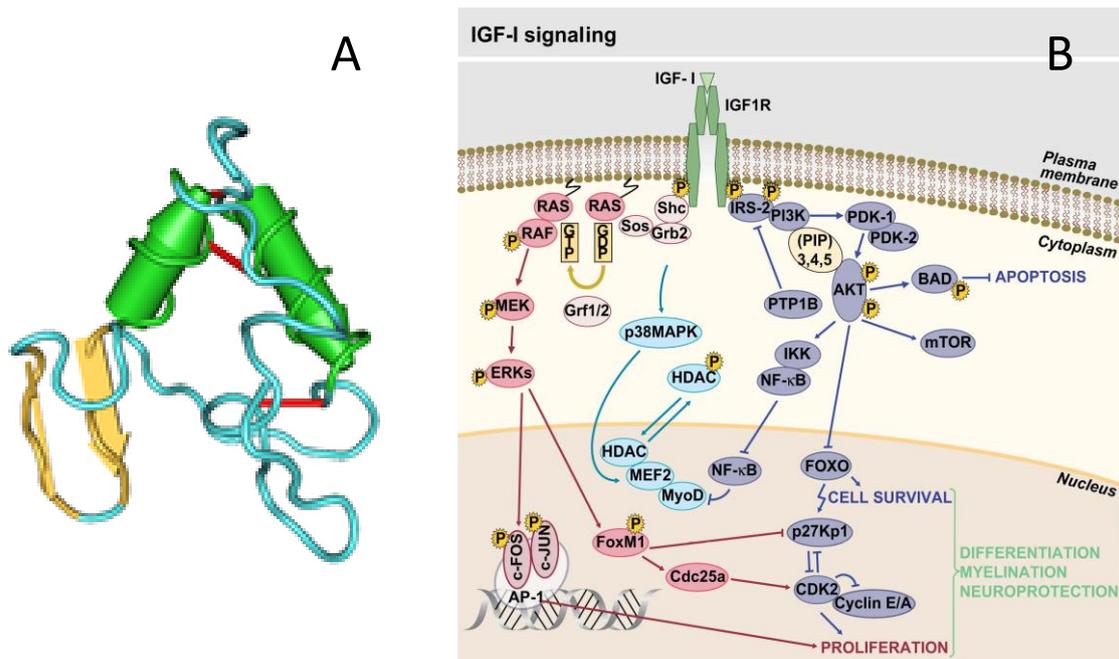


Figura 4. A: Estructura tridimensional del factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1. Imagen disponible en: (98). B: Cascadas de señalización del factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1. Imagen disponible en: (99).

Después de la unión del ligando y por la acción tirosinquinasa del receptor, la parte intracelular del receptor se autofosforila, así como residuos de tirosina del dominio juxtamembrana. Estos residuos fosforilados funcionan como lugares de acoplamiento para varios sustratos del receptor, incluyendo los sustratos del receptor de insulina (IRS) y la proteína Shc. Estos sustratos inician posteriormente las cascadas de fosforilación que permiten transmitir la señal del IGF1R (99).

Algunos de los defectos moleculares del sistema IGF incluyen las mutaciones del gen *IGF1* y del gen de su receptor de alta afinidad (*IGF1R*) (100-104).

La posibilidad de usar modelos animales como el ratón con una expresión alterada de IGF-1 o IGF1R ha permitido demostrar que este factor ejerce importantes acciones en el desarrollo del sistema nervioso así como en edad madura, y resalta el hecho de que el IGF-1

contribuye a la neurogénesis y a la sinaptogénesis, promoviendo la proliferación, diferenciación y supervivencia de células neurales (99,105).

El IGF-1 juega además un importante papel en la regulación del desarrollo del oído interno. Este factor y su receptor se expresan durante el desarrollo coclear, disminuyendo su expresión tras el nacimiento (94,95). En este desarrollo el IGF-1 actúa promoviendo la proliferación y supervivencia de progenitores óticos y regulando la neurogénesis y la diferenciación (99).

Se postula que el IGF-1 en la edad adulta es un protector ótico cuyos niveles predicen la pérdida auditiva relacionada con la edad. En la cóclea adulta el IGF-1 mantiene la fisiología de la estría vascular y promueve la supervivencia de las neuronas auditivas (106). Desde un punto de vista experimental, existen estudios que valoran el potencial papel de protección del IGF-1 ante diferentes mecanismos ototóxicos y de daño auditivo (96).

2. OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

El aspecto fisiopatológico fundamental en la NIHL es la muerte de las CC sensoriales. Conociendo la dificultad técnica que conlleva el estudio *in vivo* de las alteraciones que ocurren en el oído interno ante un daño auditivo, queremos analizar si existe una correlación funcional y anatomohistológica en los cocleogramas de ratones de estirpe CBA, para conocer como se afectan las CC.

La hipótesis del trabajo es que el estudio cocleográfico permite correlacionar el daño funcional audiológico con el daño histológico mediante la validación de un modelo experimental de daño auditivo inducido por ruido.

Los cocleogramas son una herramienta muy útil al ser capaces de relacionar el daño celular con un aumento en los umbrales de audición para frecuencias específicas, por medio de un registro gráfico donde se representan las CC a lo largo de la longitud de la membrana basilar.

2.2 OBJETIVOS

- Estudiar y comparar la respuesta auditiva de ratones CBA que han sufrido un daño ótico inducido por diferentes tipos de ruido, utilizando técnicas audiológicas no invasivas, y su relación con el daño coclear.
- Analizar el posible papel predictivo del IGF-1 en ratones expuestos a un modelo de ototoxicidad inducida por ruido, utilizando una técnica de inmunoensayo.
- Diseñar un método de recuento celular sensible, robusto y eficiente que nos permita evaluar la morfología, la distribución y la citoarquitectura de las CC del OC en ratones expuestos a ruido, y su correlación con la tonotopía coclear.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

El estudio se ha realizado con ratones CBA/Ca Ola HsD (Harlan) machos con dos meses de vida al inicio del experimento, con un peso medio de 20.7 +/- 19 gramos.

Todos los procedimientos de manejo de animales fueron realizados de acuerdo a la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea (86/609/EEC) y aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El estudio se ha planteado de forma que se respeta al máximo la norma de reducir el número de animales de experimentación al número mínimo que permite obtener resultados con significación estadística.

3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

En el estudio se establecen 4 grupos de animales:

- a.- Grupo I: Es el grupo control formado por 12 ratones CBA sanos, normoyentes, que no son expuestos a ningún ruido.
- b.- Grupo II: 12 ratones CBA normoyentes, que están expuestos a un ruido de 105 dB SPL.
- c.- Grupo III: 12 ratones CBA normoyentes, que son expuestos a un ruido "láser" de 105 dB SPL (ver apartado 3.4.).
- d.- Grupo IV: 8 ratones CBA normoyentes, que están expuestos a un ruido de 120 dB SPL.

Los cuatro grupos experimentales recibieron las mismas intervenciones como se muestra en la siguiente figura (FIGURA 5).

GRUPO I n = 12



GRUPO II n = 12



GRUPO III n = 12



GRUPO IV n = 8



Figura 5. Representación esquemática del diseño del estudio, donde se pueden ver las intervenciones realizadas en cada grupo experimental.

3.3. EXPLORACIÓN NEUROFUNCIONAL NO INVASIVA

A todos los ratones se les realiza una primera exploración auditiva neurofuncional no invasiva basal para confirmar que son normoyentes. Para ello disponemos de dos técnicas: ‘potenciales evocados auditivos de tronco cerebral’, o también conocidos por su término inglés *Auditory Brainstem Response* (ABR) y los ‘productos de distorsión de las emisiones otoacústicas’ o en inglés *Distorsion Product Otacustic Emissions* (DPOAES). Estas técnicas proporcionan información funcional cuantitativa obtenida in vivo de un modo reproducible.

3.3.1. Auditory Brainstem Response

Los potenciales evocados auditivos del tronco cerebral se corresponden con los potenciales eléctricos registrados en varias estaciones del sistema auditivo, que se evocan en respuesta a estímulos auditivos, y se caracterizan por tener una latencia corta. La respuesta obtenida consiste en una serie de ondas que aparecen en los 10 ms siguientes a la presentación de estos estímulos.

La secuencia de picos en el registro de ABR refleja la actividad sináptica de los núcleos consecutivos a lo largo de la vía auditiva en el tronco del encéfalo. Se han identificado 5 picos positivos (I-V) en el ratón, correspondientes a la cóclea y nervio auditivo (I), núcleo coclear (II), complejo olivar superior (III), lemnisco lateral (IV) y colículo inferior (V) respectivamente (107) (FIGURA 6).

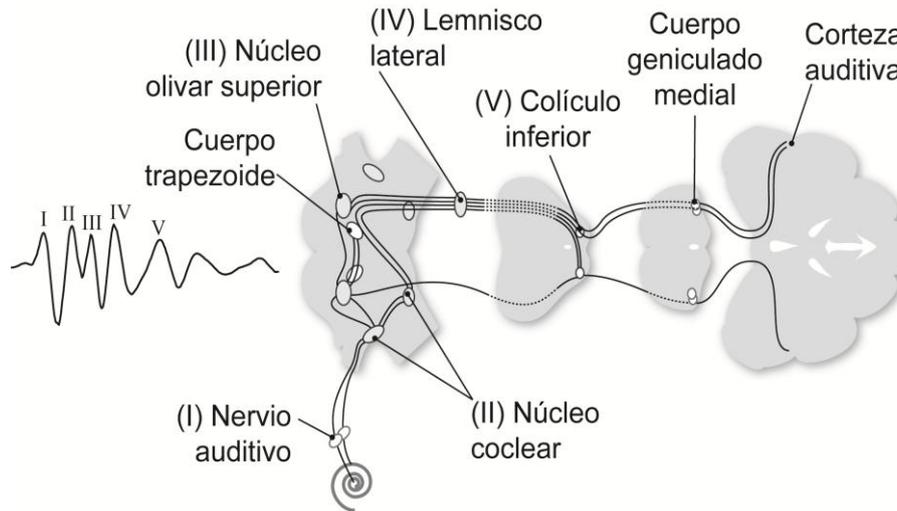


Figura 6. Esquema de la vía auditiva, indicando las estructuras principales y su correspondencia con los picos de ABR. En una onda de ABR se pueden distinguir 5 picos característicos (I-V) cada uno de los cuales tiene un sustrato neural específico (Imagen adaptada de Murillo-Cuesta et al, 2012 (108).

Para llevar a cabo los ABR lo primero que se realiza es pesar al animal para calcular la cantidad de anestésico que será necesario para una inyección intraperitoneal. El anestésico es una mezcla de ketamina 100 mg/kg y xilacina 10 mg/kg y se inyecta 0.1 ml por cada 10 g del animal. A continuación se espera alrededor de un minuto y se comprueba la pérdida de reflejos del animal, primero pierde los reflejos de estación (postura) y posteriormente el reflejo podal, para comprobar la profundidad anestésica. También es necesario comprobar los signos vitales (respiración y latido) y mantener la temperatura corporal del animal, y para ello se utiliza una manta eléctrica de agua circulante. Se aplica pomada oftálmica con el fin de evitar la sequedad ocular. Se sitúa al animal en una cámara cerrada anecoica, que esta sonoamortiguada, de forma que se minimizan las interferencias sonoras tanto del exterior como la reverberación interna (109).

Posteriormente, se colocan tres electrodos subcutáneos (tierra, positivo, negativo) sobre al animal. El electrodo tierra en el lomo del animal, el positivo entre los ojos y el negativo debajo del pabellón auditivo que vamos a evaluar. Es muy importante medir la distancia que

hay entre el oído y el altavoz para evitar artefactos, siempre debe ser de 5 cm respecto al altavoz de campo abierto.

A continuación procedemos a realizar los registros con el equipo de neurofisiología que es capaz de emitir sonidos en el espectro de las ultrafrecuencias a intensidades entre (0-48 kHz) y así obtenemos una serie de señales eléctricas que permiten hacer un análisis electrofisiológico. Se presentan dos estímulos acústicos diferentes, tipo click y tonos puros, generados con el software SigGenRPTM (Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA). Los estímulos son generados por el equipo TDT System 3™ con un procesador RP2.1 y un atenuador PA5 y son reproducidos a través de un altavoz electrostático TDT de campo libre ED1.

Los estímulos tipo click (con rango de frecuencias desde 0 a 48 kHz) son pulsos cuadrados de 1 milisegundo de duración con una frecuencia de presentación de 30 pulsos por segundo (pps). Los estímulos de tonos puros (8, 16, 20 y 40 kHz) son ondas sinusoidales únicas de 2,6 milisegundos de duración con una frecuencia de presentación de 50 pps. Las respuestas para ambos estímulos se promediaron 1.000 veces.

Posteriormente la respuesta eléctrica es amplificada y analizada con el software BioSigRPTM (Tucker-Davis™ Technologies). Las ondas de ABR son recogidas en intervalos de 5 y 10 dB de presión de sonido (dB SPL) de atenuación a partir de la intensidad máxima de 90 dB SPL, hasta 10 dB SPL en el estímulo tipo click y 20 dB SPL en los tonos puros.

Los umbrales de audición se determinan para cada tipo de estímulo como el nivel de intensidad más bajo en el que la señal de ABR es identificable por encima de la actividad de fondo. Las latencias de los picos del ABR (I, II y IV), las latencias interpicos (I-II, I-IV, II-IV) y las amplitudes de determinados picos (I, IV) fueron analizadas para el estímulo click a 20 dB SPL por encima del umbral de audición (FIGURA 7).

Una vez terminados los registros, se retiran los electrodos y se deja que el animal vaya despertándose espontáneamente.

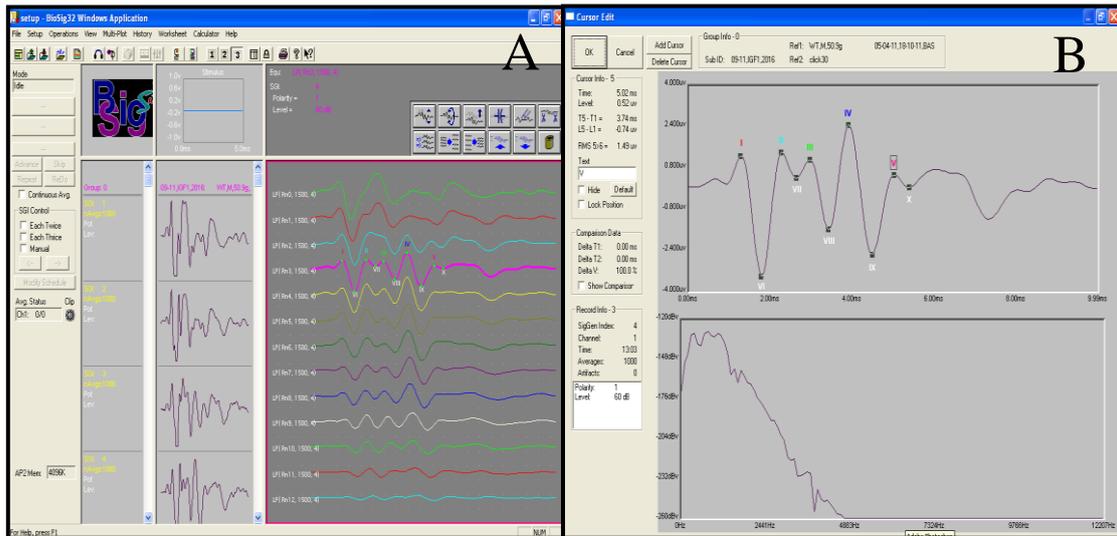


Figura 7. Prueba de ABR con estimulación tipo click realizada con el programa BioSigRPTM. A) Ondas de ABR en intensidades decrecientes. B) Detalle de una onda de ABR. Los 5 picos característicos (I-V) y sus correspondientes valles (VI-X) aparecen señalados. Los registros de ABR proporcionan información sobre la funcionalidad cuantitativa de las estructuras nerviosas periféricas y centrales de la vía auditiva.

3.3.2. Productos de distorsión de las emisiones otoacústicas

Las emisiones otoacústicas son unos sonidos de baja intensidad emitidos por las CCE, que en condiciones fisiológicas informan de la integridad de las mismas, produciendo una amplificación fisiológica de la vibración de la membrana basilar en respuesta a un sonido. Se propagan en sentido inverso a través de la cadena de huesecillos y el tímpano, produciendo una señal acústica medible en el canal auditivo. Existen varios tipos de emisiones otoacústicas: espontáneas, inducidas, transitorias... Las más utilizadas en investigación auditiva con ratones son los DPOAES, que se obtienen tras la aplicación sincrónica de dos tonos puros de características conocidas en frecuencia, intensidad, velocidad de estimulación (F1 y F2) y que mantiene una relación de frecuencia determinada ($F1/F2 = 1.2$ ó 1.25). El producto de distorsión que vamos a utilizar en el estudio es el que se corresponde con la frecuencia $2F1-F2$ (FIGURA 8).

Esta técnica neurofisiológica permite la obtención de datos de forma simple, objetiva y no invasiva, informando del estado de integridad funcional de la cóclea. Permite la discriminación de la actividad eléctrica auditiva frente a otra actividad eléctrica (cerebral, muscular, equipos) y se consigue mediante la estimulación repetida y el promedio de la respuesta sincronizada al estímulo. Esta prueba resulta muy útil puesto que los parámetros determinados mediante la

misma se encuentran muy afectados en ciertas alteraciones del desarrollo, el envejecimiento o tras un daño auditivo severo.

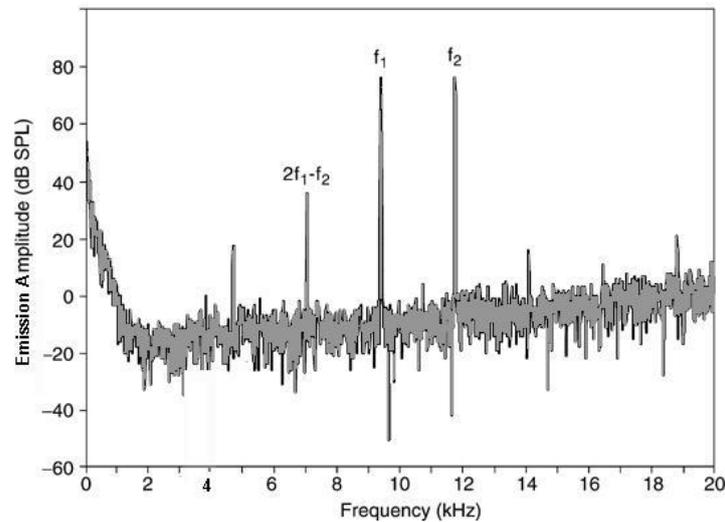


Figura 8. Espectro de la señal acústica del canal auditivo de un ratón donde se muestran los tonos primarios f_1 y f_2 y el registro típico de la emisión $2f_1-f_2$. Imagen disponible en: (110).

Con los resultados de las DPOAES se puede obtener un registro frecuencial conocido como DPgrama, que se basa en la representación gráfica de los productos de distorsión frente a las diferentes frecuencias de estimulación. En ocasiones también recibe el nombre de "audiometría coclear objetiva".

Los animales se colocan en una caja de registro para DPOAES sonoamortiguada encima de una almohadilla térmica. Para el registro se coloca una sonda con respuesta plana hasta 10 kHz (ER10B+ Etymotic) en el interior del conducto auditivo externo derecho del animal. Se utiliza el software SigGenRPTM (Tucker-Davis Technologies) y a través de dos altavoces magnéticos insertos en la sonda se presentan dos tonos de estimulación primarios (f_1 y f_2) correspondientes a las frecuencias centrales 8, 10, 14, 18 y 22 kHz, adquiriendo una intensidad decreciente, desde 80 hasta 30 dB SPL.

La respuesta acústica se registra por un micrófono MA3 contenido en la sonda y a continuación es amplificada, registrada, promediada y analizada con el software BioSigRPTM (Tucker-Davis Technologies) (FIGURA 9).

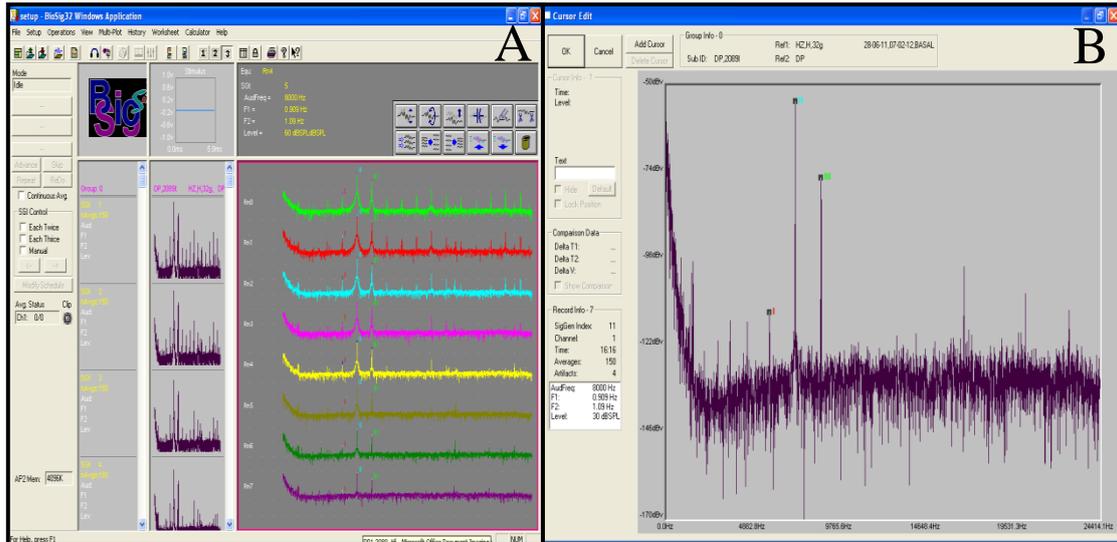


Figura 9. Prueba de DPOAE realizada con el programa BioSigRPTM. A) Espectro de DPOAEs. B) Detalle del espectro considerado umbral. Los dos tonos primarios (II y III) y la señal de DPOAE resultante en la frecuencia $2f_1-f_2$ (I) aparecen marcados.

Las pruebas de evaluación neurofuncional no invasiva (ABR y DPOAES) se realizaron por igual en todos los grupos del estudio tanto en el momento basal para confirmar la función auditiva normal de los ratones antes de la exposición a ruido. Y posteriormente se llevaron a cabo en otros 3 momentos del estudio: 48-72 h post-ruido, a los 14 días post-ruido y 28-30 días post-ruido, para determinar la magnitud de la alteración del umbral de audición.

El desarrollo de DPOAES es de larga duración, para evitar que los animales se despertaran del efecto anestésico se seleccionaron unos ratones que fueron evaluados previamente con una prueba de ABR que constaba solo del click y 3 tonos puros, en vez de la evaluación con los 5 tonos como habíamos comentado en el apartado anterior, y posteriormente se les realizó el test de DPOAES.

En el grupo I se realizaron en 6 ratones los ABR completos (click + 5 tonos) y en otros 6 animales se realizó un estudio de ABR parcial (clic + 3 tonos) junto con los DPOAES. Se decidió realizar un ABR parcial, ya que al ser un estudio de larga duración se corría el riesgo de que los animales despertasen y hubiera que volver a anestésiarlos. El ABR parcial ofrece la información suficiente para continuar el estudio y evita una potencial pérdida de animales debida a la doble anestesia.

En el grupo II se realizaron los ABR completos en 6 ratones y en 5 de ellos los ABR parciales + DPOAES ya que uno de ellos falleció durante la inducción anestésica en el momento basal.

En el grupo III se llevaron a cabo los ABR completos en 6 ratones y cabe resaltar que en otros 6 animales se realizó un ABR ampliado con 6 tonos en el que se incluyó el tono de 10 Hz, para estudiar mejor si hay un daño selectivo en esta frecuencia específica del audiograma tras someterse al ruido láser. También se realizaron en 6 animales del grupo los DPOAES.

En el grupo IV se realizaron los ABR completos en 3 ratones (ya que uno murió en la inducción anestésica en el control post14 días del ruido) y 4 ABR parciales + DPOAES.

3.4. EXPOSICIÓN A RUIDO

Los ratones se colocan en una cámara de ruido estando despiertos y sin ninguna sujeción dentro de una jaula con espacio para cuatro ratones (FIGURA 10).

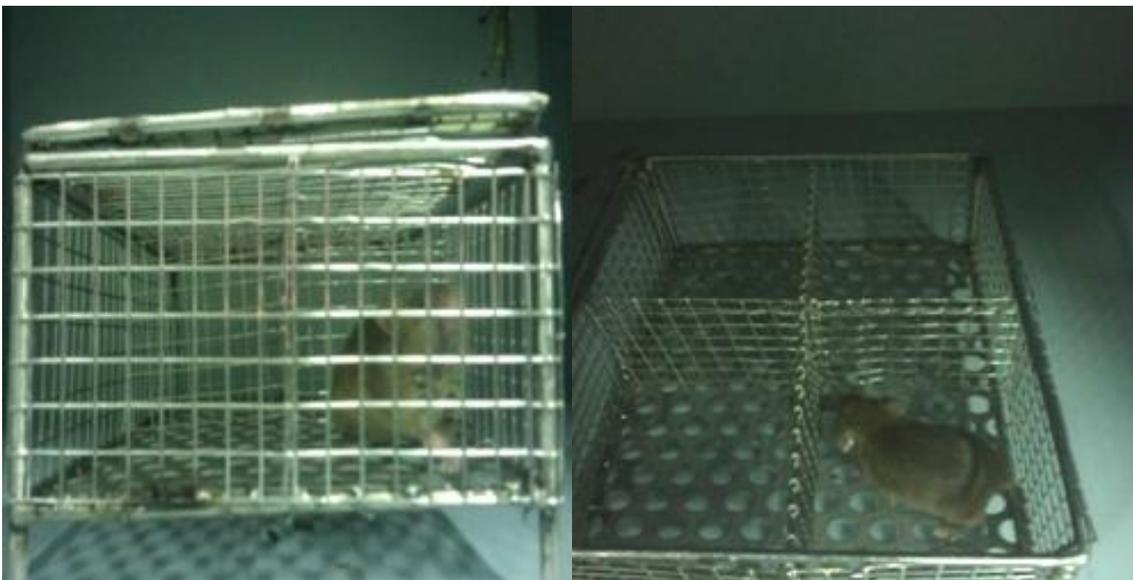


Figura 10. Imagen representativa de un sujeto del estudio dentro de la jaula de la cámara de ruido.

Esta cámara de resonancia es de fabricación propia y está especialmente diseñada para que el campo acústico que se genera sea homogéneo y tenga unas características espectrales y espaciales específicas (109). La capacidad de emisión de la cámara de ruido oscila en una banda

frecuencial entre 2-30 kHz, proporcionando así un nivel acústico medio-elevado con una desviación cuadrática media-baja (109,111).

El estímulo de ruido se diseñó con el software Wavelab Lite (Wavelab Lite, Steinberg Media Technologies GMBH, Hamburg, Germany) y fue presentado a través de unos altavoces KEF[®] (109) (FIGURA 11).



Figura 11. Imagen de la cámara de ruido utilizada en el experimento. Incluye una jaula de colocación del animal, una cámara de video con visión infrarroja, un amplificador multicanal, y unos altavoces. Siempre se utiliza un sonómetro y un calibrador de sonido para comprobar y verificar la intensidad del ruido que se aplica.

Todos los grupos, excepto al grupo control, se sometieron a un daño acústico específico durante 30 minutos. A los ratones del grupo control se les introduce en la cámara de ruido pero sin estar expuestos acústicamente, para que las condiciones del estudio fueran reproducibles en todos los ratones por igual y no incurrir en sesgos por si el estrés que produce la estancia en la cámara tuviera una repercusión audiológica en los mismos.

Al segundo grupo de ratones se les sometió a una exposición de un ruido discontinuo de barrido senoidal (2-22 kHz) durante 30 minutos a una intensidad de 105 dB SPL.

El tercer grupo experimental se sometió a la exposición de un tipo de ruido con características distintivas al cual denominamos “láser”, es un ruido más concentrado e incisivo diseñado para dañar las células encargadas de percibir un rango frecuencial específico. Es un ruido continuo de barrido sinusoidal durante 30 minutos a una intensidad de 105 dB SPL que solo produce un daño selectivo comprendido entre 9-13kHz.

El cuarto grupo del estudio se expuso a un mayor traumatismo acústico al exponerles a un ruido discontinuo de barrido sinusoidal (2-22 kHz) durante 30 minutos a una intensidad de 120 dB SPL.

3.5. MEDICIÓN DE NIVELES DE IGF-1 EN SUERO

Para analizar el potencial valor pronóstico de daño celular que posee el IGF-1, se obtiene sangre de los ratones, se realiza una centrifugación a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos de la sangre obtenida y se extrae el suero de las muestras.

Posteriormente se mantiene en una cámara fría a una temperatura de -80 °C. Mediante el kit comercial OCTEIA Rat/Mouse IGF-I ELISA AC18PL se realiza un estudio de los niveles IGF1 en suero mediante una técnica de ELISA.

El test se caracteriza por tener una sensibilidad definida como la concentración correspondiente a la media más 2 desviaciones estándar de 20 replicados del calibrador cero, de 63 ng/ml y una especificidad del 100%.

Las extracciones sanguíneas se realizaron en tres momentos del estudio: basal, a los 14 días y a los 28 días. En el grupo control se llevaron a cabo las extracciones en estos 3 momentos. Se realizó el test de ELISA en 9 animales, ya que las demás muestras se prescindieron de ellas por problemas técnicos en cuanto a poca cantidad sanguínea en la extracción, precipitación y coagulación en la centrifugación.

Sin embargo en los tres grupos de ruido no se tomó la extracción basal para evitar una nueva anestesia a los animales y porque se estimó que la medición de IGF-1 sería igual que en el grupo control, ya que en ese momento no habían sufrido ninguna intervención. EL número de test de ELISA que se hicieron en el grupo de ruido a 105 dB SPL fue en 9 animales, y tanto

en el grupo de ruido “láser” como en el de ruido a 120 dB SPL se realizaron en extracciones procedentes de 6 animales, respectivamente.

Se utilizan dos técnicas distintas para la obtención sanguínea, que difieren en cuanto a la localización donde se realiza la extracción y en la cantidad de volumen que se obtiene de la muestra:

3.5.1. Canto interno del ojo

Mediante la colocación de una pipeta tipo Pasteur o tubo capilar de vidrio directamente sobre el seno venoso orbitario que se encuentra en el canto interno del ojo del ratón se extraen 0,2 a 0,4 ml de sangre (FIGURA 12). Para la extracción sanguínea, se coge al ratón del cuello con suavidad y se introduce la pipeta en el canto interno del ojo medial al globo ocular hasta palpar el reborde orbitario con la misma, en ocasiones se moviliza la punta hasta conseguir que la sangre asciende por la pipeta por la acción capilar de la misma.



Figura 12. Imagen de extracción sanguínea del canto interno del ojo de un ratón con micropipeta tipo pasteur

El flujo de sangre puede ser detenido mediante la aplicación de presión digital suave sobre el tejido y se presiona sobre el párpado cerrado durante aproximadamente 30 segundos. Las principales complicaciones de este método son las úlceras corneales, queratitis, salida de humor vítreo, proptosis, rotura orbitaria, incluso lesiones en el nervio óptico (112).

Por todas las complicaciones anteriormente comentadas, el muestreo secuencial no se recomienda hasta que haya transcurrido por lo menos dos días o como máximo una semana

para que tenga lugar la reparación de los tejidos periorbitarios. Esta técnica se ha utilizado para el momento basal de extracción y en el día 14.

3.5.2. Punción cardiaca

Con la punción cardiaca se puede obtener hasta 1 ml de sangre en función del tamaño del ratón y si el corazón está latiendo, aunque normalmente se suele obtener de 0.6 -0.8 ml aproximadamente.

Las muestras de sangre se toman directamente desde el corazón, preferiblemente el ventrículo izquierdo, ya sea por una toracotomía, desde el lado izquierdo del pecho, a través del diafragma, o desde la parte superior del esternón (112) (FIGURA 13).



Figura 13. Imagen de extracción sanguínea a través de una punción cardiaca directamente sobre ventrículo izquierdo (A) o mediante toracotomía (B).

Se necesita que el animal se encuentre profundamente anestesiado ya que la sangre debe ser retirada lentamente para evitar el colapso del corazón. Para ello se coloca el animal en decúbito supino, se identifica la apófisis xifoides y el espacio intercostal que se encuentra por debajo del ángulo recto que forma la flexión de la articulación humeroradial izquierda; se recomienda entrar con el bisel hacia arriba de una aguja intentando direccionarlo al ápex cardiaco. Es importante que el movimiento del émbolo sea lento y a una velocidad periódica, para evitar con ello la formación de coágulos.

Por motivos técnicos es preferible la obtención directa de la sangre cardiaca coincidiendo con las primeras 24-48 h tras la última exploración neurofuncional, es decir, el día 28, para proceder inmediatamente con el sacrificio del animal.

3.6. ESTUDIO MORFOLÓGICO

Para poder llevar a cabo el estudio morfológico se procedió al sacrificio de los animales, dividiendo los sujetos del estudio en dos subgrupos equivalentes para hacer estudios de histología básica y estudios de recuento celular.

3.6.1. Histología básica

Para realizar el estudio histológico se parte de la fijación del tejido por perfusión de los animales, se sigue con la extracción de las cócleas y su montaje en bloques de gelatina, se continúa con la sección seriada de las mismas y posteriormente se realiza una tinción de Nissl de las secciones.

3.6.1.1. Perfusión y fijación

Los animales son anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de 0,12 mg/g de pentobarbital sódico. Se realiza una incisión inferior a la apófisis xifoides del esternón y se elimina la piel de la zona torácica. Con ayuda de unas pinzas y tijeras levantamos la fascia torácica en la zona más próxima a las uniones intercostales, con cuidado de no dañar la pleura y el pericardio, hasta tener completamente expuesto la cavidad torácica.

Se realiza un corte en la aurícula derecha, y colocamos una aguja en el ventrículo izquierdo que se conecta a una bomba de perfusión, la cual contendrá un tampón fosfato salino (PBS) al 10%. Su perfusión a presión a través de la aorta buscará la eliminación de la sangre del lecho vascular del cuerpo (FIGURA 14). Se cambia el PBS de la bomba por paraformaldehído al 4% pH 7,4 y se realiza una fijación de los tejidos.



Figura 14. Imagen representativa de técnica de perfusión tisular.

3.6.1.2. Extracción coclear

Se decapita al ratón y se realiza una incisión sagital a la mitad del cráneo y otros dos cortes oblicuos a ambos lados pasando por encima de los pabellones auriculares. Se retira el hueso con ayuda de unas tijeras y extraemos el encéfalo dejando toda la cavidad craneal al descubierto. Se localiza el quiasma óptico y se hace un corte paralelo a él, para encontrarnos lateralmente con las cócleas, que son extraídas de los huesos temporales (FIGURA 15).



Figura 15. Visión cenital de ambos huesos temporales y quiasma óptico.

3.6.1.3. Postfijación

Las cócleas extraídas son fijadas en paraformaldehído al 4% y descalcificadas en EDTA 0,8 M pH 6,5 durante una semana a 4° C en agitación, cambiando la solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) cada 2-3 días.

3.6.1.4. Inclusión y corte

Las muestras fijadas y descalcificadas se incluyen sobre unos moldes de corcho en unos bloques de gelatina a una concentración del 10% junto con un 15% de sacarosa. Se conservan a una temperatura de 4° C hasta que se solidifica.

Posteriormente se realizan secciones seriadas de 10 µm con un criostato a lo largo del eje longitudinal de la cóclea (mediomodiolares) que sirven para el estudio anatómico y la citoarquitectura del OC (113).

3.6.1.5. Tinción

Se utiliza el método de Nissl con cresil violeta al 1% para hacer observaciones morfológicas, estructurales y cualitativas en el microscopio óptico. La tinción de cresil violeta al 1% se hace sobre las secciones ya montadas, previamente las muestras fueron deshidratadas con etanol a concentraciones crecientes (70,96 y 100 %) durante 15 segundos respectivamente y posteriormente son cubiertas utilizando Depex como medio de montaje.

Sobre estas secciones se estudió la morfología coclear mediante un microscopio Axiophot Zeiss con cámara digital Olympus DP70. Se tomaron fotos con los objetivos de 4X, 20X, 40X y 63X usando los mismos parámetros de iluminación para cada objetivo y capturadas mediante el software DPController (v.1.1.1.65, Olympus Optical).

Posteriormente se utilizó el software informático Photoshop CS4 (versión 11, Adobe systems) para el procesamiento final de las fotos, sin aplicar ninguna manipulación selectiva de las imágenes más allá de la eliminación de artefactos fuera de las áreas de interés. Se estudió un oído por cada grupo del estudio.

3.6.2. Recuento celular

Se sacrifican los animales mediante una dislocación cervical tras haber aplicado una sobredosis de pentobarbital sódico inyectada intraperitonealmente. Posteriormente se separa la cabeza del resto del animal utilizando unas tijeras. Una vez hecha la decapitación, se coloca la cabeza en posición ventral, se introduce la tijera dentro de la cavidad oral y se realizan dos cortes oblicuos a través de la mandíbula para retirar el maxilar inferior del ratón. A continuación se realiza un corte sagital de la cabeza desde el inicio de la médula hasta la mandíbula. El corte se realiza por la línea media; cada una de las mitades obtenidas se deposita en un disco de cultivo, convenientemente marcado como oído derecho (OD) y oído izquierdo (OI). En estos discos se procede a la disección del oído interno, bajo una lupa de disección (LEICA MZ8), acoplada a una fuente de luz fría (Schott, KL 1500 electronic). A partir de aquí todos los pasos se realizan utilizando la lupa de disección.

3.6.2.1. Exéresis coclear

Se disecan todas las partes blandas hasta llegar al oído medio. Se identifica la bulla, la porción cartilaginosa del conducto auditivo externo (CAE) y los conductos semicirculares. Para este proceso se utilizan unas pinzas de disección para sujetar de forma estable el hueso temporal y permitir así hacer un corte sagital desde el orificio de la bulla hasta su porción distal, posteriormente se retira la cubierta ósea de la bulla, dejándose ver debajo la cóclea. A continuación, debemos identificar la ventana oval y la ventana redonda; en ocasiones hay que retirar porciones del laberinto óseo y restos de cadena osicular para dominar completamente ambas ventanas. Con una aguja de 0.4 x 13 mm de diámetro 27G ½, dispuesta en una jeringuilla de 1 ml de volumen, se rasga el tejido para unir la parte basal de la ventana oval y la ventana redonda. Con la misma aguja se hace un orificio en el ápex y posteriormente a través del orificio interventanal se añaden unos 300 µl de fijador (4% de paraformaldehído diluido en PBS a un pH de 7,4) para que difunda desde la porción más basal por todas las espiras de la cóclea para terminar saliendo por el orificio del ápex. A medida que circula el fijador por toda la cóclea y ésta va adquiriendo una coloración transparente (FIGURA 16).

3.6.2.2. Descalcificación coclear

Las cócleas se fijan en un tubo de 15 ml tipo Falcon al que previamente se le ha añadido 5 ml de paraformaldehído al 4% y se postfijan durante 24 h a 4°C.

Posteriormente se retira el fijador del tubo y se añaden 5 ml de 10% de EDTA en agua destilada pH 6.3 durante 4 a 6 días a 4°C, para conseguir descalcificar el laberinto óseo de la cóclea y obtener una consistencia elástica y gelatinosa de la misma. Se recomienda cambiar el líquido de EDTA cada 2 días. Transcurrido este tiempo de descalcificación, se lavan las cócleas en una solución de PBS dos veces 15 minutos.

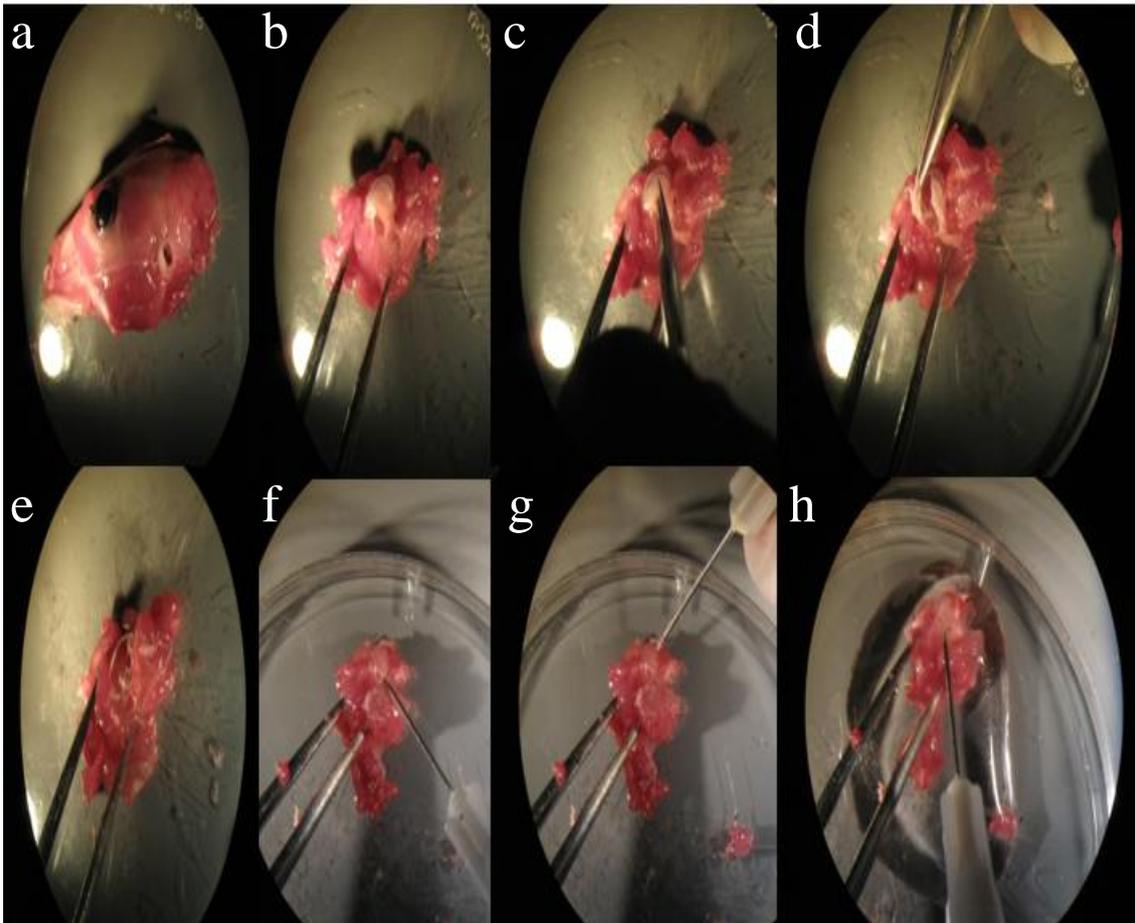


Figura 16. Exéresis coclear. Se realiza un corte sagital de la hemicabeza del ratón (a). Se asila el oído medio e interno del hueso temporal (b). Se aísla y reseca la bulla timpánica, junto con la cadena osicular hasta identificar la cóclea (c-e). Se comunica la ventana oval y redonda (f) y se realiza una punción en el ápex coclear (g), posteriormente se difunde paraformaldehído al 4% (h).

3.6.2.3. Exéresis del órgano de Corti

Utilizamos una placa de cultivo P60 cubierta de gelatina negra, el proceso se realiza bajo la lupa de disección. Con unas microtijeras finas de punta recta o con un bisturí de facoemulsificación tipo “CRESCENT” biselado y angulado, se van haciendo cortes oblicuos a ambos lados de la cóclea para retirar el laberinto óseo que rodea a la cóclea. Con la ayuda de unas pinzas de disección se hace una limpieza de los restos de partes blandas y se retira el tejido de la parte basal de la cóclea. Con una jeringuilla de 1

ml se hace un agujero o pequeña incisión en la membrana tectoria de la parte apical de la cóclea para poder ir separando el laberinto óseo del membranoso. A través de este orificio se empiezan a retirar con cuidado los restos de cubierta de la cápsula ótica con cuidado de no romper las CC.

Una vez retirada la membrana tectoria, realizamos un corte entre la espira media y la espira basal, de esta forma obtenemos dos partes, una que contiene aproximadamente el apex y la media, y otra parte donde encontramos la base (FIGURA 17). Cada una de estas partes se coloca en un pocillo de una placa multipocillo de 72 pocillos (Nunclon Delta Surface), que a su vez contiene 15 μ l de PBS y se conserva a 4°C en una placa de cultivo P-150 realizando una cámara húmeda con agua.

3.6.2.4. Tinción del órgano de Corti

Para la tinción de las muestras, se utiliza la placa multipocillo durante todo el proceso (FIGURA 18). Se extraen con una jeringuilla de 1 ml el PBS de los pocillos en los que se encuentra embebido el OC. Posteriormente se añaden 15 μ l de Tritón 0.5% (Tritón X-100, SIGMA-ALDRICH) en PBS, con el objetivo de permeabilizar las membranas celulares. Se mantiene la permeabilización durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación.

A continuación, incubamos con faloidina (Alexa Fluor R 488 phalloidin, Invitrogen) a una concentración 1:1000 en PBS+Tritón 0,05% durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. La faloidina se utiliza como marcador de las CC, ya que se une a la F-actina que se encuentra en los estereocilios de las CC (114).

A partir de este momento todas las muestras que se manipulan deben estar cubiertas con papel de plata, para evitar que se pierda la fluorescencia.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo se lavaron las muestras con PBS a temperatura ambiente y en agitación durante 3 veces consecutivas.

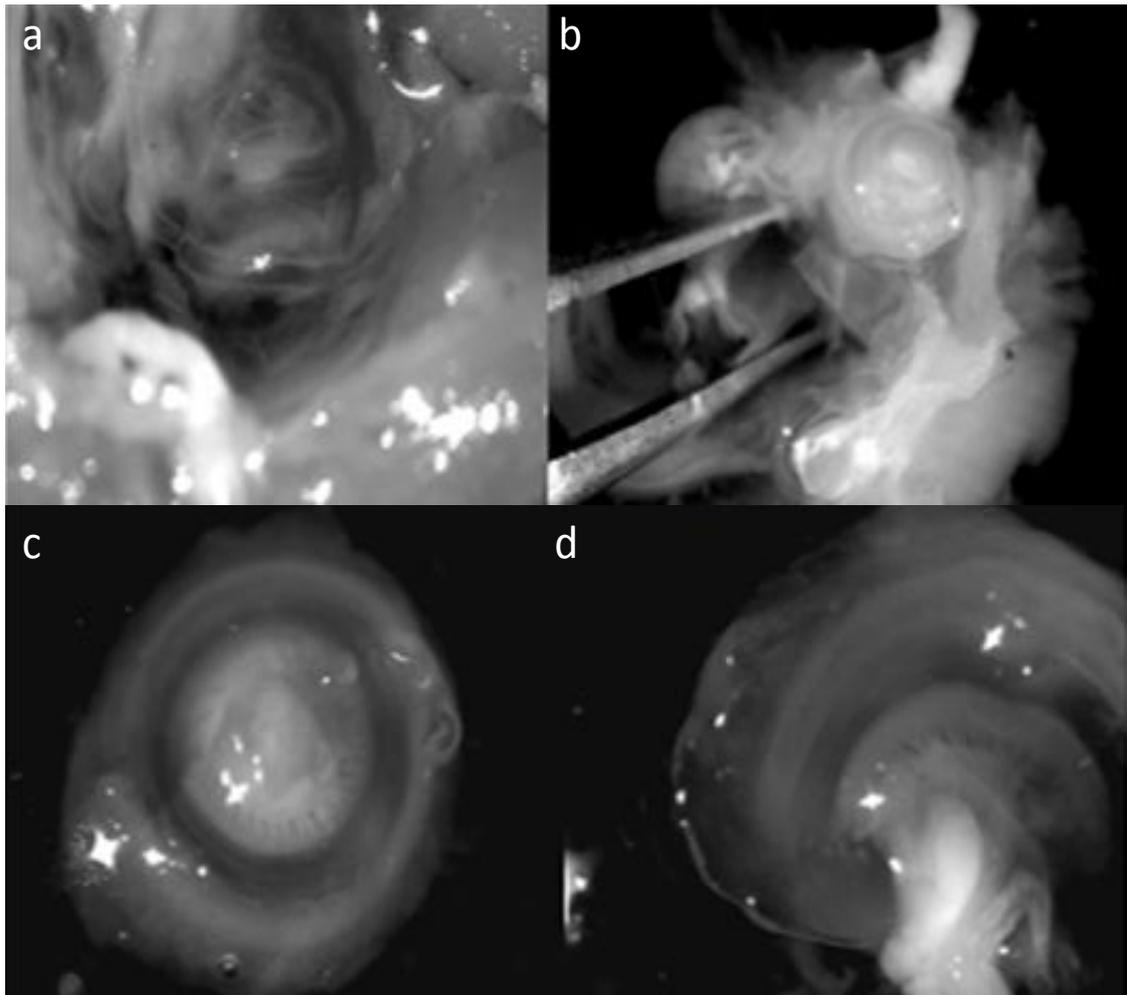


Figura 17. Exéresis del OC. La cóclea se descalcifica con EDTA durante 5 días (a). Se disecciona, se aísla el laberinto membranoso (b) y se divide en 2 porciones: ápex-media (c) y base (d).

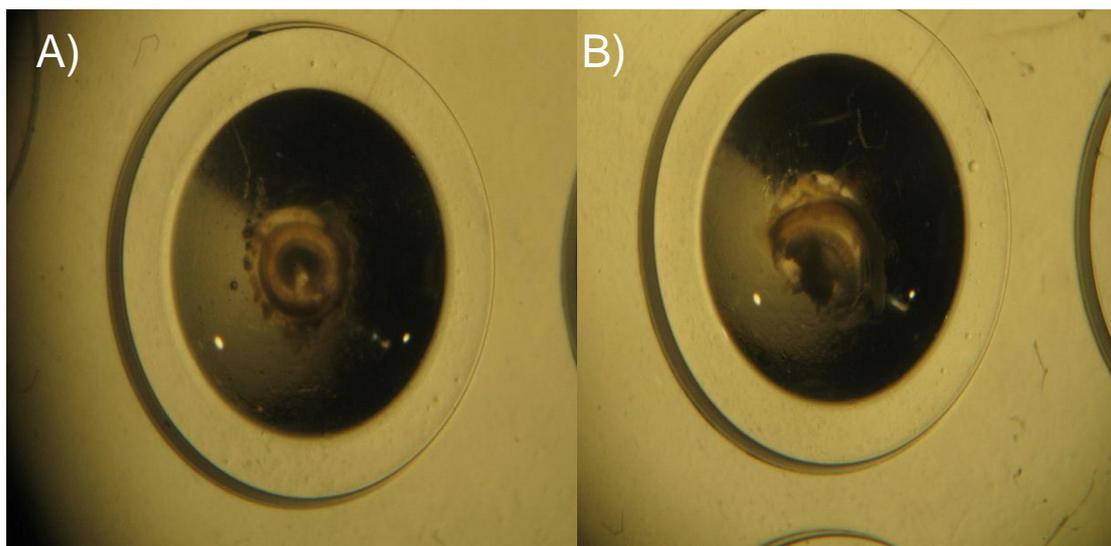


Figura 18. Placa multipocillo donde se realiza la tinción del OC. Porción ápex-media (A) y porción basal (B).

3.6.2.5. Montaje

Se utilizan portaobjetos Menzel-Gläser (Thermo Scientific) con cavidades de 5 mm de diámetro y recubrimiento epoxídico, para poder mantener la posición en que fueron colocadas las muestras tras la disección. Los portaobjetos se marcan con dos círculos con un bolígrafo PAP-PEN y se añade Vectashield (Vector, REF H-100) como medio de montaje para fluorescencia que contiene DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (DAPI FluoroPURE TM grade, Invitrogen). En cada gota de Vectashield con DAPI colocamos por un lado la sección de cóclea del ápex y la espira media y por otro lado la sección de espira basal. Es importante colocar bien las secciones para que no quede ningún resto de membrana tectoria que pueda interponerse sobre las células ciliadas y dificultar el recuento de las mismas. Concluimos el procedimiento de montaje colocando un cubre de 24x60 mm² sobre el porta y aplicando esmalte de uñas transparente para sellar toda la preparación.

En el grupo control, el grupo de ruido a 105 dB SPL y el grupo de ruido "láser" se realiza el estudio de recuento celular en los dos oídos de 6 animales (12 cócleas), correspondientes a cada grupo. Sin embargo, en el grupo de ruido a 120 dB SPL se llevó a cabo solo en 4 animales, y se llegaron a montar 7 cócleas, ya que al realizar la exéresis del órgano de Corti del oído derecho de uno de los animales se destruyeron parcialmente tanto el ápex como la base.

3.6.2.6. Estereología

Una vez se tienen todas las muestras teñidas y montadas, se procede a realizar un recuento de las CCE y CCI del OC a través de un método de recuento estereológico.

La estereología es una ciencia matemática basada en estadística y geometría estocástica y ofrece herramientas eficientes para la estimación de parámetros geométricos como el volumen, el área, la longitud o el número de objetos en tejidos tridimensionales contenidos en un órgano a partir de medidas hechas en secciones bidimensionales. Para esto, es necesario realizar un muestreo adecuado que evite el sesgo a la hora de elegir las secciones o campos de análisis y el uso de sondas geométricas superpuestas a las secciones que sean apropiadas para la estructura que se quiere estimar (115,116). El método estereológico usado fue adaptado en este caso a un tejido montado en plano y por tanto bidimensional.

Para ello, utilizamos un microscopio Olympus BX51 conectado a una videocámara Olympus DP70 y a una fuente de luz ultravioleta (Olympus U-RFL-T), que permite capturar imágenes que se proyectan en un monitor de alta resolución (Eizo FlexScan L887) con una magnificación final de 1656x, todo ello está integrado en el software estereológico CAST-GRID (v.2,3,2,0; Visiopharm) (117).

El software CAST-GRID permite definir áreas de estudio, crear regiones y realizar un muestreo aleatorio sistemático y así poder estudiar la densidad de CC en los disectores delimitados. Para ello se siguen los cuatro pasos siguientes:

3.6.2.6.1. Delimitación de sectores en la región de interés

Se toma una fotografía de las dos partes separadas diseccionadas (ápex-media y base) de la cóclea que han sido teñidas y montadas previamente, y se realiza una delineación con el programa CAST a lo largo de nuestro espacio de interés, la llamada “*franja estereociliada*” (que es el área subtendida por las 3 filas de CCE y la fila de CCI). En esta franja correspondería a la porción sensorial germinativa del epitelio coclear, y representaría las zonas yuxtapuestas de los espacios conocidos como *greater epithelial ridge* (GER) y *lesser epithelial ridge* (LER) (FIGURA 19).

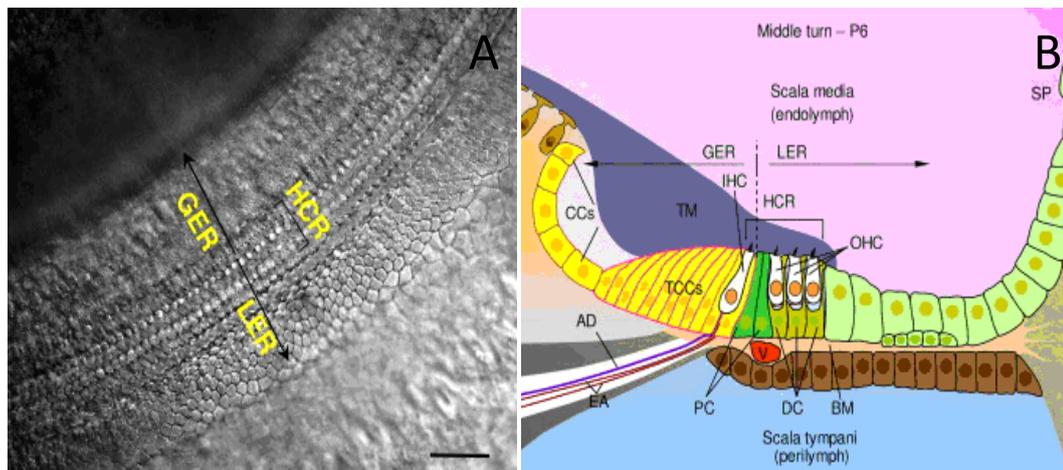


Figura 19. Epitelio sensorial del cóclea. A): imagen de microscopía interferencial (Nomarski) del epitelio sensorial de un órgano de Corti en desarrollo. Se muestra la escala timpánica de la espira basal, donde se aprecia la *greater epithelial ridge* (GER), la *lesser epithelial ridge* (LER) y, como una parte yuxtapuesta de ellas, la *región de las células ciliadas* (HCR). Barra de escala 50 μ m. B): Dibujo de representación esquemática donde se ven las relaciones de las células ciliadas externas (OHC) e interna (IHC) con GER y LER. Imagen disponible en: (118).

Posteriormente usando el software de diseño gráfico Corel Draw se procedió manualmente a la división artificial de esta área en porciones de tamaño semejante, equivalentes cada una al 5% de la longitud total de la cóclea, basándonos en el cocleograma de ratón descrito por Viberg y Müller (119) (FIGURA 20). Esta división se realiza mediante una regla flexible para curvas implementada a partir de medidas de la longitud total de cócleas de ratones de estirpe CBA (FIGURA 21).

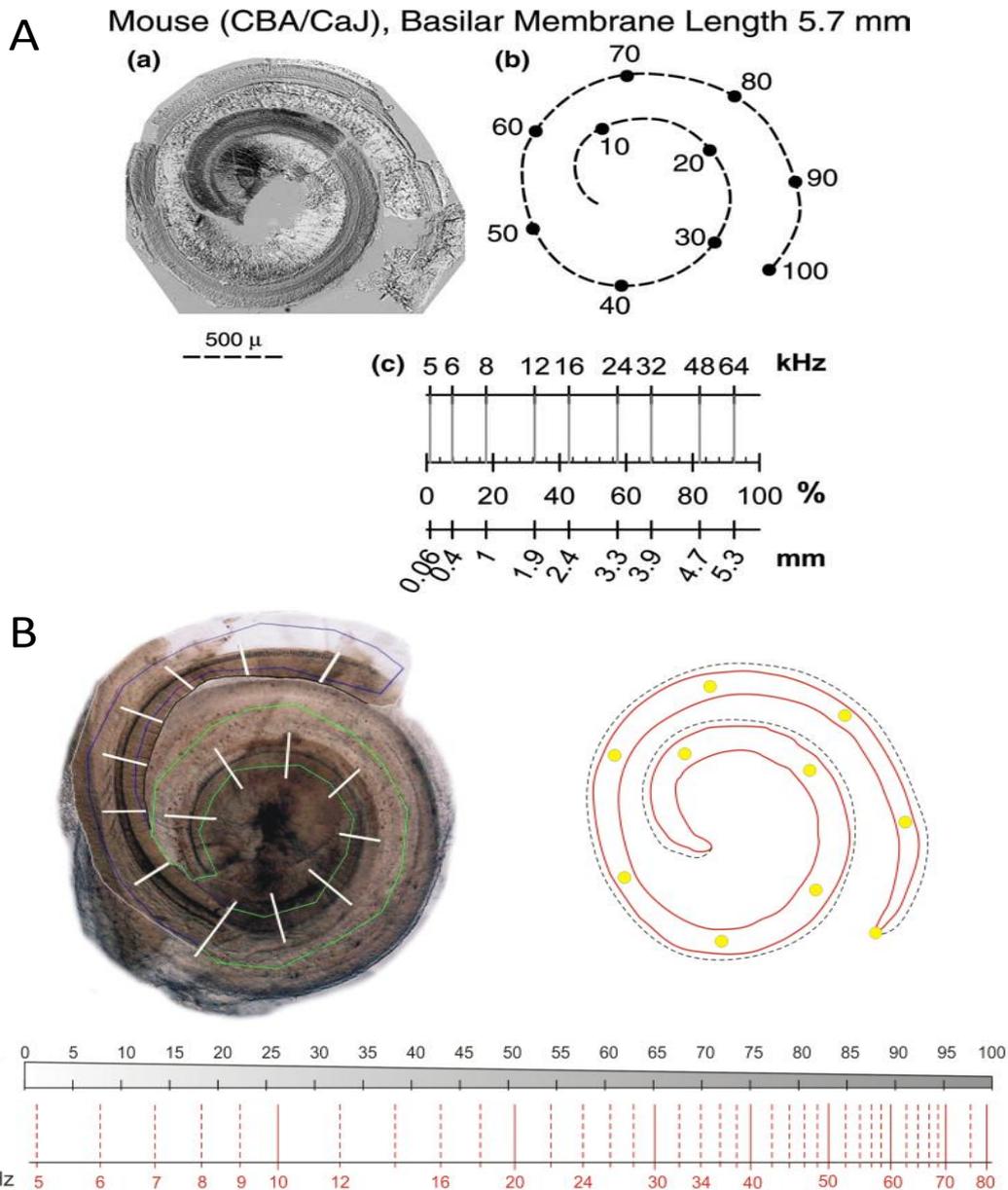


Figura 20. A. Cocleograma de ratón CBA y escala frecuencial en mm del 100 % de cóclea de acuerdo a la extrapolación de Müller et al 2004. Imagen disponible en: (119). B. Reconstrucción coclear de un animal del estudio y esquema de correlación frecuencial con la distancia en porcentaje desde el ápex.

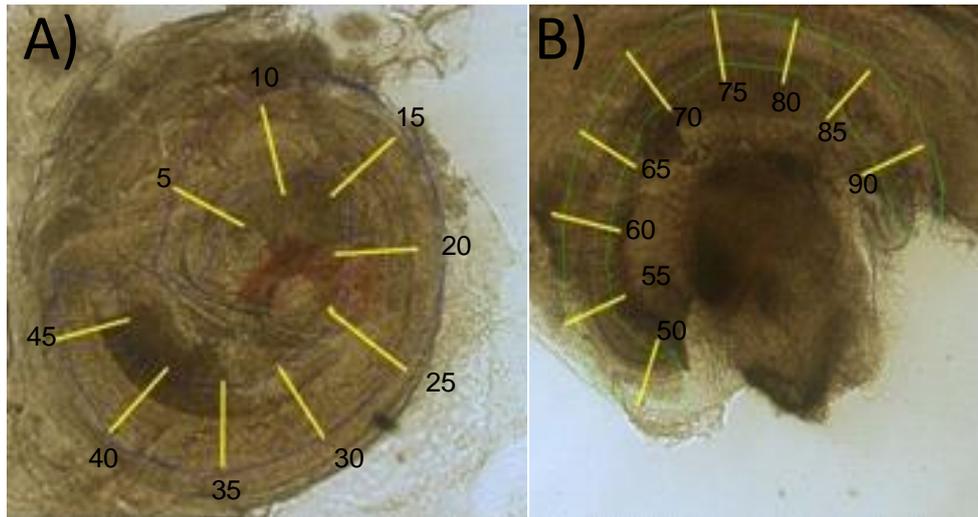


Figura 21. Imagen del OC con microscopio Olympus BX51 de la división en sectores equidistantes al 5% de las regiones ápex-media A) y base B).

3.6.2.6.2. Muestreo de sectores

Utilizando como patrón las líneas de separación establecidas sobre el área de interés, se delinearón estos mismos sectores mediante el equipo de estereología arriba descrito con la muestra ya colocada en el microscopio.

Sobre cada uno de los sectores aplicamos un muestreo aleatorio sistemático, usando como intervalos constantes de muestreo los parámetros $dx=225\ \mu\text{m}$ y $dy=175\ \mu\text{m}$. En cada sitio de muestreo se superpone una retícula de recuento compuesta por 12 marcos insesgados, cada uno con un área de $1.485\ \mu\text{m}^2$, con un área de guarda de $17.825\ \mu\text{m}^2$, que servirán como *disectores* en 2D.

Se delimita así de forma insesgada un espacio de recuento que permite hacer una estimación del número de CCE y CCI que se encuentran en el área de referencia representada por los *disectores*. La posición aleatoria de los disectores sobre las regiones de interés, pero la disposición regular (sistemática) de los mismos entre sí, garantizan que las células que se cuentan hayan sido muestreadas de forma uniforme-aleatoria (muestreo sistemático con comienzo aleatorio) a lo largo de todos los sectores del total de longitud de la cóclea que pudo ser recogida, habitualmente entre el 75% y el 80% de su extensión total (FIGURA 22).

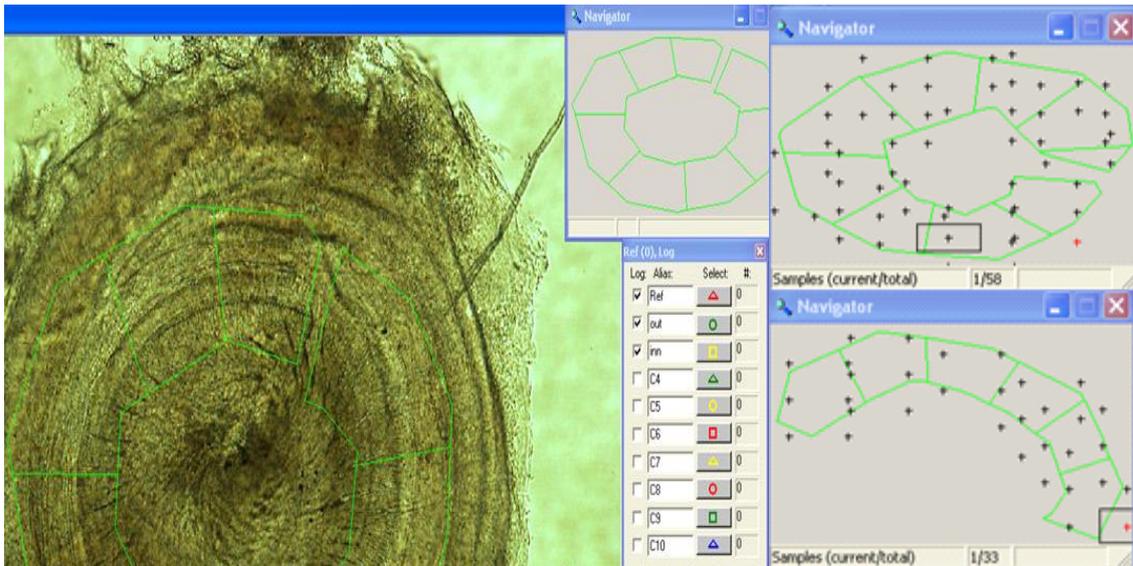


Figura 22. Imagen representativa del software CAST, donde se ve como pueden definir áreas, regiones y realizar un muestreo aleatorio (a). Visión instantánea de los puntos de recuento del muestreo aleatorio para estimar la densidad de población de las células ciliadas en la región ápex-media (b) y base (c).

3.6.2.6.3. Recuento celular

Las medidas estereológicas se llevaron a cabo utilizando como unidades de recuento los penachos ciliares intensamente fluorescentes (por el marcaje con faloidina) de las CCI y CCE, al no existir ambigüedad en la relación unívoca entre cada penacho y una única célula del que emerge. Se establece la regla de recuento insesgado, es decir, no se cuentan aquellas células que estén en contacto con las líneas de exclusión (izquierda e inferior), mientras que aquellas células que estén en contacto con las líneas de inclusión (superior y derecha) sí se contarán, así como todas aquellas células comprendidas en el área de referencia del disector (FIGURA 23).

3.6.2.6.4. Recogida de datos

Todos los datos numéricos cuantitativos se recogen en una base de datos de Excel (versión 2007), para poder obtener así una estimación de la densidad celular del OC (FIGURA 24).

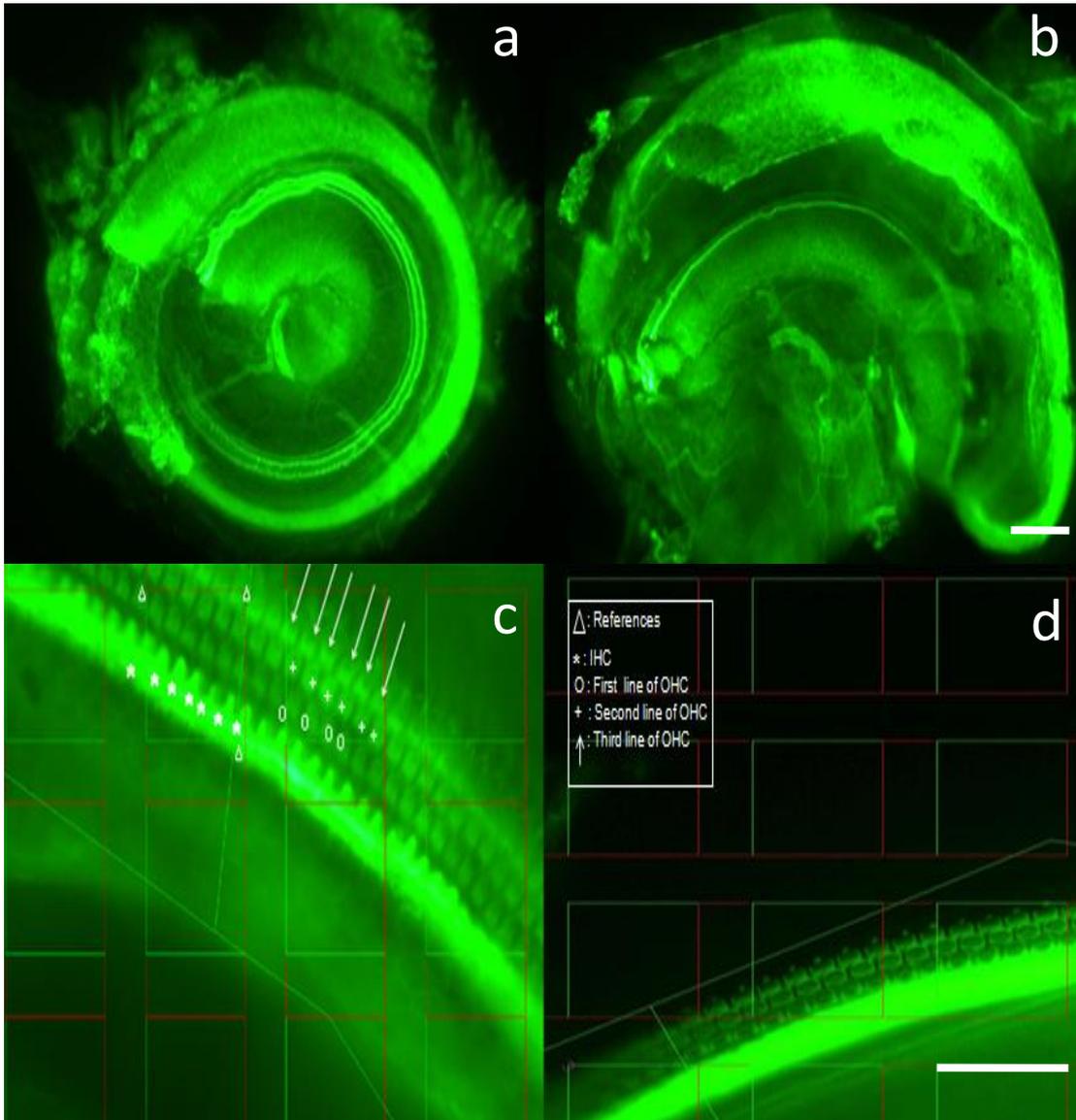


Figura 23. Imagen del OC con tinción de faloidina a) ápex-media b) base (Objetivo de 4x) Imagen representativa de la cuantificación celular con software CAST. Disectores de recuento c y d) donde se aprecia el marco de referencia, área de células ciliadas y su relación con las líneas de inclusión y exclusión. (Objetivo de 40x) Barras de escala: a-b: 500 μm , c-d: 100 μm .

La densidad por área de CCE y CCI se estimó separadamente para cada una en base al algoritmo esterológico aplicado a cada sector:

$$N_{CCE} = \sum Q_{CCE} / \sum a_{\text{disector}}$$

$$N_{CCI} = \sum Q_{CCI} / \sum a_{\text{disector}}$$

donde ' N_{CCE} ' y ' N_{CCI} ' es la densidad de CCE y CCI respectivamente por unidad de área, ' $\sum Q_{CCE}$ ' y ' $\sum Q_{CCI}$ ' es la sumatoria del número de CCE o CCI contadas en los disectores en los campos muestreados en cada sector, y ' $\sum a_{\text{disector}}$ ' es la sumatoria del número de esquinas que coinciden con el área de referencia multiplicada por

el área que representa una esquina (área total del disector/4). Los resultados de esta estimación fueron expresados como número de células/1000 μm^2 .

Como medida aproximada de la precisión del estimador de densidades usado, se estimó a su vez el coeficiente de error (CE) medio para cada cóclea (ver apartado 3.7.).

MUESTRA	5961L	RF	IHC	OHC	DensOU	DensINW	DensOU	MUESTRA	5961R	RF	IHC	OHC	DensOU	DensINW	DensOU		
A	(definit)				DensINW	T	1000um2	T/1000u	A	(definit)			DensINW	T	1000um2	T/1000u	
a(frame)=	1485	um2						a(frame)=	1485	um2							
a(corner)=	371,25	um2						a(corner)=	371,25	um2							
n(frames/screen)=	12							n(frames/screen)=	12								
dx, dy=	225, 175	um						dx, dy=	225, 175	um							
SECTOR	5%	4	6	14	1,571	3,657	4,23	10,39	SECTOR	5%	6	6	16	1,300	3,300	3,50	8,89
		3	5	13							4	7	17				
SECTOR	10%	6	15	31	2,455	5,364	6,61	14,45	SECTOR	10%	3	5	13	1,500	4,500	4,04	12,12
		5	12	28							2	4	14				
											3	3	9				
SECTOR	15%	6	12	26	2,200	4,600	5,93	12,39	SECTOR	15%	5	9	13	1,556	3,000	4,19	8,08
		4	10	20							4	5	14				

Figura 24. Imagen representativa de una de las hojas de recuento de la base de datos.

3.7. ESTADÍSTICA

Los datos obtenidos de las pruebas de ABR y DPOAES se analizaron usando SPSS v15.0 software. En primer lugar se utiliza el procedimiento para modelos lineales mixtos con efectos fijos y medidas repetidas en las condiciones estudiadas (condición control, condición ruido 105 dB SPL, condición ruido “láser”, condición 120 dB SPL). El modelo lineal mixto permite especificar interacciones entre factores, lo que permite identificar si la combinación de

factores tiene un efecto lineal en la variable dependiente. En resumen, da un efecto global de los factores elegidos en las condiciones estudiadas.

Los resultados son considerados significativos con $p \leq 0,05$, y se expresan en el texto como media \pm error estándar (SEM).

Los datos de medición en suero de IGF-1 mediante el kit de ELISA se analizaron mediante un test de correlación de Pearson., considerando una significación estadística de $p \leq 0,05$.

La predicción del coeficiente de error (CE) como medida de precisión de las estimaciones de densidades numéricas de CC por sectores se hizo siguiendo la aplicación de Larsen al recuento en 2 dimensiones del número de axones en un nervio cortado, por la similitud del problema planteado en ese estudio con el nuestro (120). Para comprobar si la distribución de las células por conjunto de disectores en cada sector fuera de tipo aleatorio (Poisson), comparamos la varianza de la estimación de densidades de recuento por cada pantalla (con 12 disectores) con la densidad media de células por pantalla en todos los animales, comprobando que la primera era inferior a la segunda tanto en los casos control como en los experimentales con daño de CC. Esto sugiere que la distribución se ajusta al modelo Poisson, por lo que podemos predecir el CE mediante la siguiente ecuación:

$$CE(N_a) = \frac{1}{\sqrt{\sum Q}} \cdot (1 - sf)$$

en la que Q representa la densidad obtenida en cada pantalla y sf es la fracción muestreada del área total de interés. Esta fracción fue aproximadamente del 35% en todos los casos. El CE así estimado osciló entre el 3% y el 4,4%, lo que indica un alto nivel de precisión en el método empleado.

4. RESULTADOS

4.1. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A RUIDO EN LA FUNCIÓN AUDITIVA

4.1.1. Estudio comparativo de los umbrales auditivos y audiogramas tras exposición a ruido

Analizamos a partir de las pruebas de ABR, la evolución del umbral auditivo tras exposición a ruido, en respuesta a un estímulo tipo click en los cuatro grupos a lo largo del ensayo (TABLA 2).

Tabla 2. Umbral tras estimulación tipo click. Se reflejan los umbrales medios en diferentes tiempos, basal y 2, 14 y 28 días tras la exposición a ruido en los 4 grupos integrantes del estudio (d: días, SD: desviación estándar).

MOMENTO	GRUPO	Mínimo	Máximo	Media	SD
Basal	CONTROL	15	20	15	1
	RUIDO 105 dB	15	30	17	5
	RUIDO 120 dB	15	20	16	2
	LÁSER	15	20	16	2
2 d	CONTROL	15	15	15	0
	RUIDO 105 dB	60	70	69	4
	RUIDO 120 dB	45	90	72	14
	LÁSER	60	80	70	8
14 d	CONTROL	15	20	16	2
	RUIDO 105 dB	60	80	70	6
	RUIDO 120 dB	70	90	80	9
	LÁSER	50	80	65	8
28 d	CONTROL	15	20	15	1
	RUIDO 105 dB	60	80	70	10
	RUIDO 120 dB	60	80	70	10
	LÁSER	50	80	63	9

El grupo control mantiene umbrales auditivos por debajo de los 20 dB SPL en todos los tiempos. El estudio estadístico, con análisis de medidas repetidas, refleja diferencias estadísticas altamente significativas con respecto a los otros tres grupos.

Los grupos expuestos a ruido evolucionan de manera muy similar, especialmente en el momento inmediatamente posterior a la exposición a ruido. El estudio estadístico revela sin embargo que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de ruido 120

RESULTADOS

dB SPL y los grupos ruido 105 dB SPL (&, $p= 0.026$) y ruido “láser” (###, $p= 0.000$). No se encuentran diferencias al comparar el umbral auditivo entre el grupo de ruido 105 dB SPL y el grupo ruido “láser”. El grupo expuesto a este ruido “láser” presenta una tendencia a mejorar al final del ensayo, pero sin presentar diferencias significativas con los otros dos grupos de ruido. Si se realiza una gradación del daño en función de los grupos se vería que el ruido 120 dB SPL es el más lesivo, seguido del ruido 105 SPL y ruido “láser” (FIGURA 25).

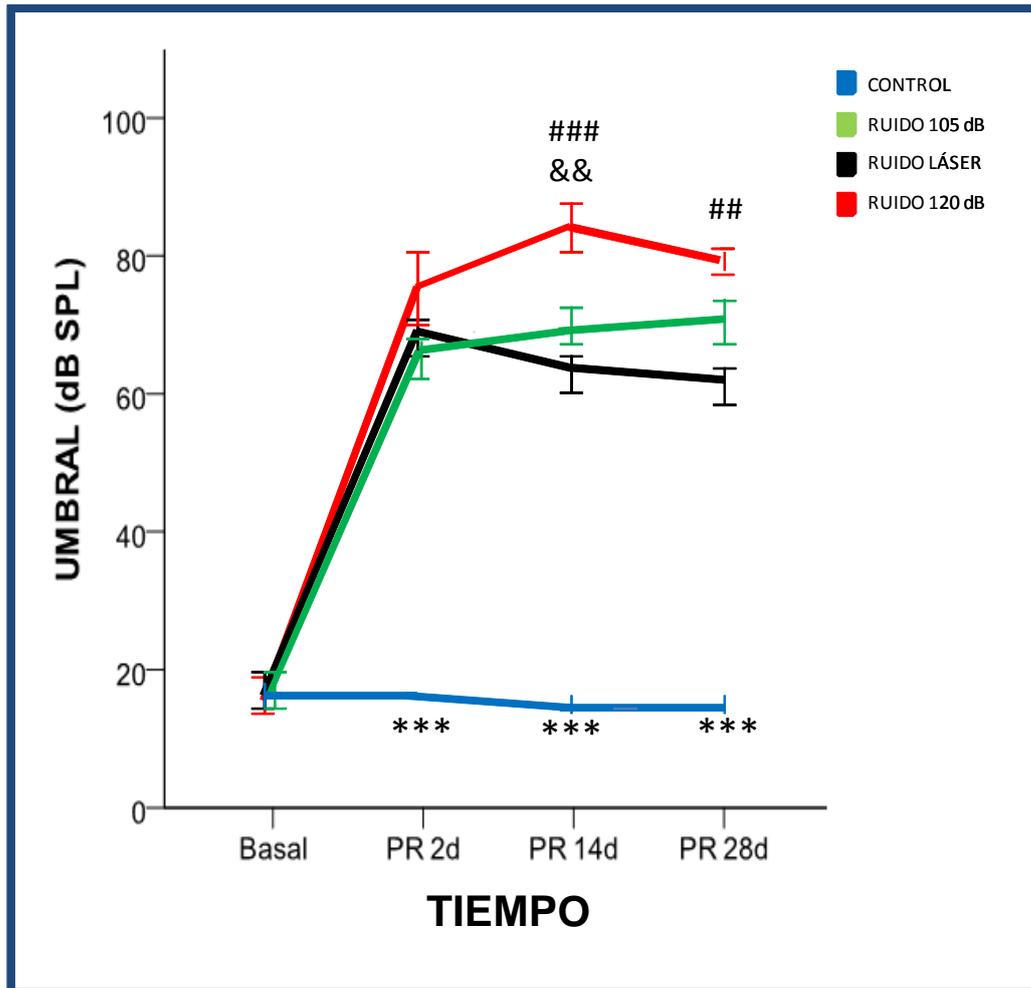


Figura 25. Representación de la evolución del umbral tras estimulación tipo click en los grupos del estudio en el momento basal, y 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 (PR 28d) días tras la exposición a ruido. Se encontraron diferencias estadísticas en PR 2d, PR 14d y PR 28d entre el grupo control y el resto de grupos (***, $p=0.000$). Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de ruido 120 dB SPL y los grupos ruido 105 dB SPL (&&, $p= 0.026$) y ruido “láser” (###, $p= 0.000$). Al final del ensayo también se aprecian diferencias estadísticas entre el grupo de ruido 120 dB SPL y el ruido “láser” (##, $p= 0.031$).

El estudio comparado de la evolución de los umbrales auditivos con el tiempo ofrece diferencias adicionales entre los grupos experimentales que se detallan a continuación:

- Momento basal: los audiogramas son muy similares para los cuatro grupos, con umbrales en el rango de la normoaudición y con una ligera elevación en las frecuencias más altas. No se encontraron diferencias significativas entre grupos (FIGURA 26).

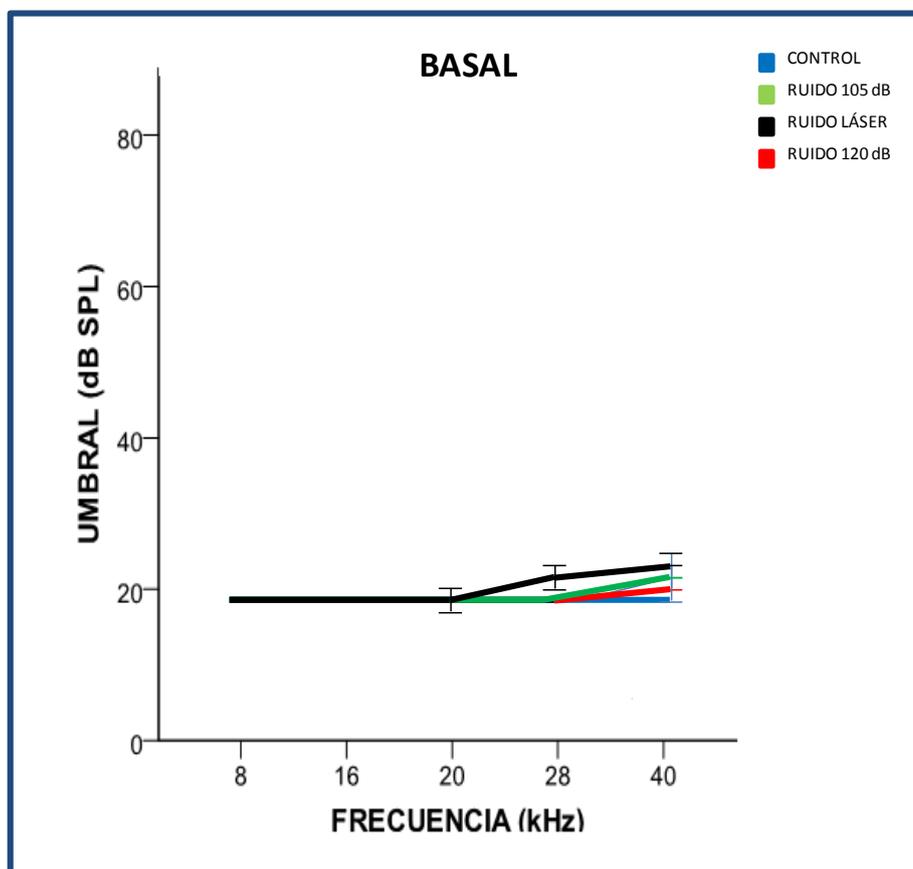


Figura 26. Audiograma en el momento basal. Se representan los valores promedio (media \pm SD) de los umbrales auditivos para los tonos analizados en los diferentes grupos experimentales, en el momento basal. Se encuentran umbrales muy semejantes en todos los grupos respuesta a estímulos con los tonos 8, 16 y 20 kHz. Sin embargo, en respuesta a tonos de 28 y 40 kHz el umbral puede llegar hasta 25 dB SPL sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (SD: desviación estándar).

- 2 días (PR 2d): A los dos días de la exposición a ruido se observa un marcado incremento de los umbrales auditivos para todos los tonos y en todos los grupos expuestos a ruido, manteniendo el grupo control valores similares a los del momento basal (20 dB SPL). El grupo control presenta diferencias estadísticas altamente significativas con respecto a los tres grupos expuestos a ruido (FIGURA 27).

RESULTADOS

El audiograma de los animales del grupo ruido 120 dB SPL presenta un mayor incremento de los umbrales auditivos que el grupo ruido 105 dB SPL, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos para todas las frecuencias. Resulta destacable como el ruido “láser”, pese a tener menor intensidad y rango de frecuencias que el de 120 dB SPL produce un daño similar y mantiene similares diferencias estadísticas con respecto al grupo de ruido 105 dB SPL.

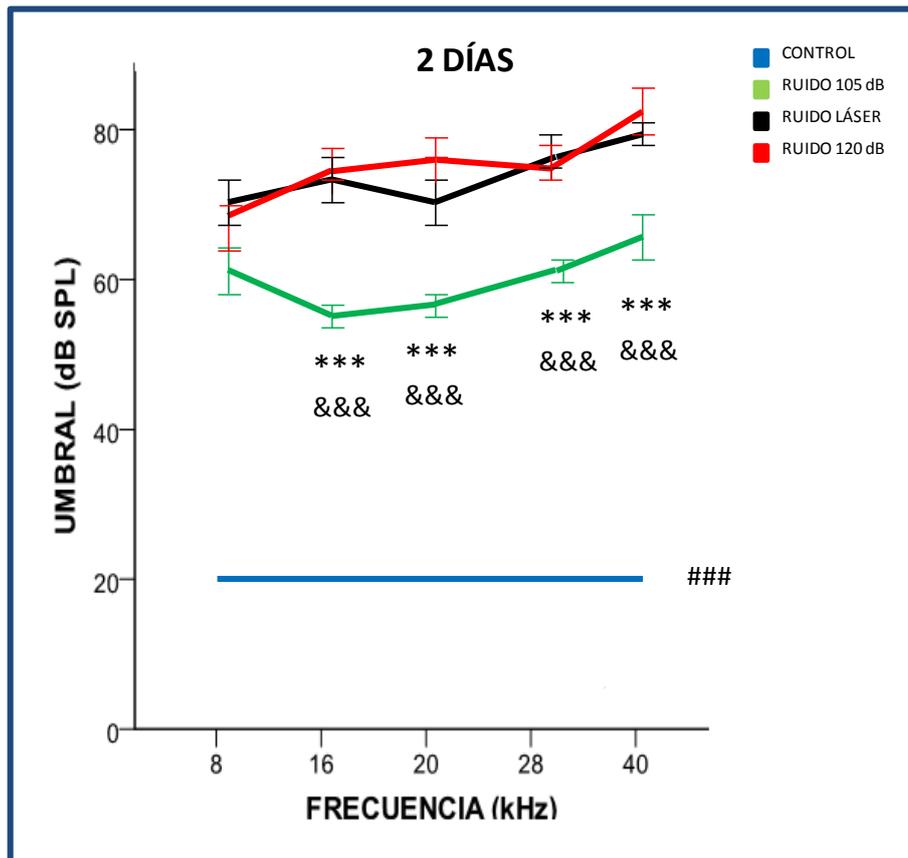


Figura 27. Audiograma a los 2 días de la exposición al ruido. Se representan los valores promedio (media \pm SD) de los umbrales auditivos para los tonos analizados en los diferentes grupos experimentales. El grupo control se mantiene y presenta diferencias estadísticas altamente significativas (###, $p=0.000$) con respecto a los tres grupos expuestos a ruido en cada una de las frecuencias estudiadas (8, 16, 20, 28 y 40 kHz). El grupo de ruido 120 dB SPL y de forma destacable el grupo de ruido “láser” presentan unos umbrales más elevados que el grupo de ruido 105 dB SPL, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos (***, $p=0.000$ y &&&, $p=0.000$ respectivamente) (SD: desviación estándar).

- 14 días (PR 14d): En este momento existen importantes variaciones en el umbral. Los animales expuestos a ruido “láser” experimentan una notable recuperación de sus umbrales, alcanzando valores similares a los del grupo de ruido de 105 dB SPL, sin

diferencias significativas entre ellos. Pero, sí se encuentran diferencias entre el grupo expuesto a 120 dB SPL entre las frecuencias de 16 y 40 kHz, ya que mantiene los umbrales auditivos elevados, en relación con los otros dos grupos de ruido. El grupo control se mantiene estable con diferencia estadística con el resto de grupos (FIGURA 28).

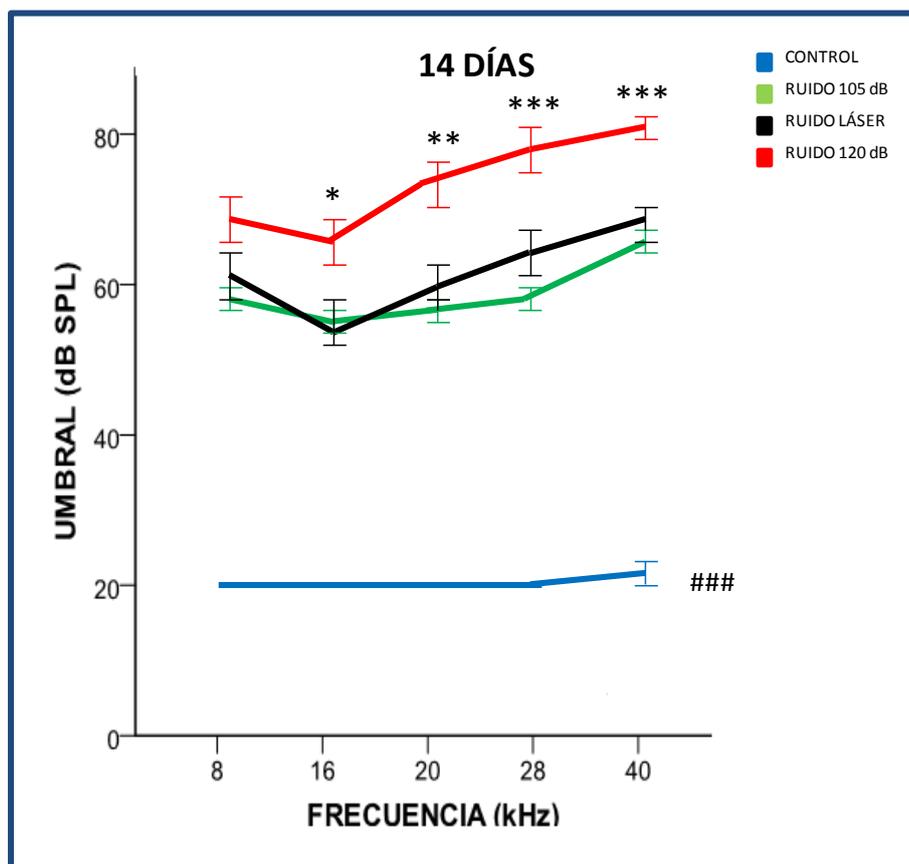


Figura 28. Audiograma a los 14 días de la exposición al ruido. Se representan los valores promedio (media \pm SD) de los umbrales auditivos para los tonos analizados en los diferentes grupos experimentales. El grupo control se mantiene y presenta diferencias estadísticas altamente significativas en 8, 16, 20, 28 y 40 kHz (###, $p=0.000$) con respecto a los tres grupos de ruido. Los animales expuestos a ruido “láser” presentan una recuperación de sus umbrales, alcanzando valores similares a los del grupo de ruido de 105 dB SPL, sin encontrar diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, el grupo de ruido 120 dB SPL mantiene los umbrales elevados y se encuentran diferencias entre las frecuencias de 16 y 40 kHz, en relación con los otros dos grupos de ruido (***, $p=0.000$; **, $p=0.025$; *, $p=0.041$) (SD: desviación estándar).

- 28 días (PR 28d): Al finalizar el ensayo los animales expuestos a ruido de intensidad de 120 dB SPL también muestran cierta recuperación, pero sin llegar a acercarse a los umbrales de los grupos expuestos a 105 dB SPL. Existen diferencias estadísticamente

RESULTADOS

significativas entre los animales del grupo de ruido 120 dB SPL y ruido 105 dB SPL y así como con los del grupo de ruido “láser”. El grupo control se mantiene estable con diferencias estadísticamente significativas con el resto de grupos (FIGURA 29).

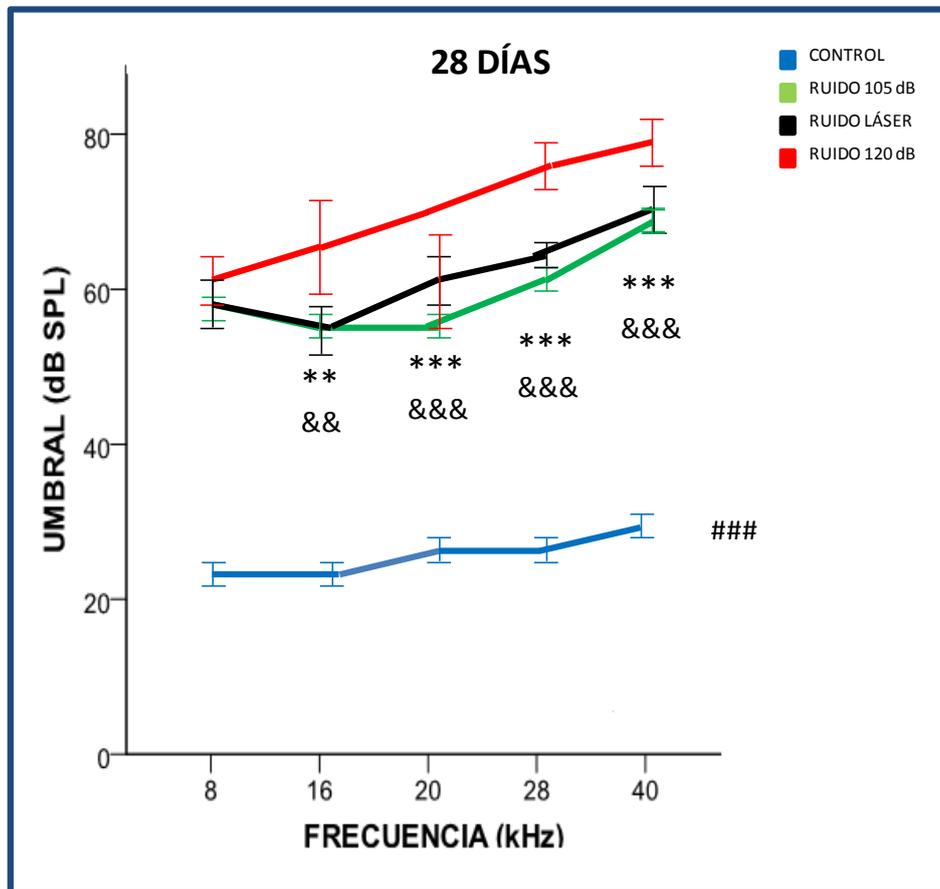


Figura 29. Audiograma a los 28 días de exposición al ruido. Se representan los valores promedio (media \pm SD) de los umbrales auditivos para los tonos analizados en los diferentes grupos experimentales. El grupo control se mantiene y presenta diferencias estadísticas altamente significativas en todas las frecuencias (8, 16, 20, 28 y 40 kHz) estudiadas (###, $p=0.000$) con respecto a los tres grupos de ruido. Al finalizar el ensayo el grupo de 120 dB SPL muestran una leve recuperación en los umbrales auditivos. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo de ruido 120 dB SPL y ruido 105 dB SPL (***, $p=0.007$; **, $p=0.02$) y así como con los del grupo de ruido “láser” (&&&, $p=0.000$; &&, $p=0.021$) (SD: desviación estándar).

Para el estudio en profundidad de la relación entre la alteración funcional observada en la prueba de ABR y el daño estructural cuantificado mediante recuento de CC, se realiza un audiograma más completo en los animales del grupo expuestos a un ruido “láser” con rango de frecuencias restringido (8-13 kHz en lugar de 2-20 kHz). En estos audiogramas específicos

RESULTADOS

se incluyeron también las frecuencias de 4 y 10 kHz, además de las anteriormente estudiadas (8, 16, 20, 28 y 40 kHz).

Se puede observar un marcado aumento de los umbrales auditivos tras la exposición a ruido, especialmente para la frecuencia 10 kHz, cuyo desplazamiento del umbral promedio es de 59 dB SPL. Este “pico de daño” alrededor de la frecuencia 10 kHz se mantiene a lo largo del ensayo. A las dos semanas de la exposición a ruido, los animales del grupo del ruido “láser” presentan cierta recuperación de los umbrales auditivos, pero esta disminución de los umbrales es menor para las frecuencias 8 y 10 kHz que para las frecuencias inmediatamente inferior y superior (4 y 16 kHz) (FIGURA 30).

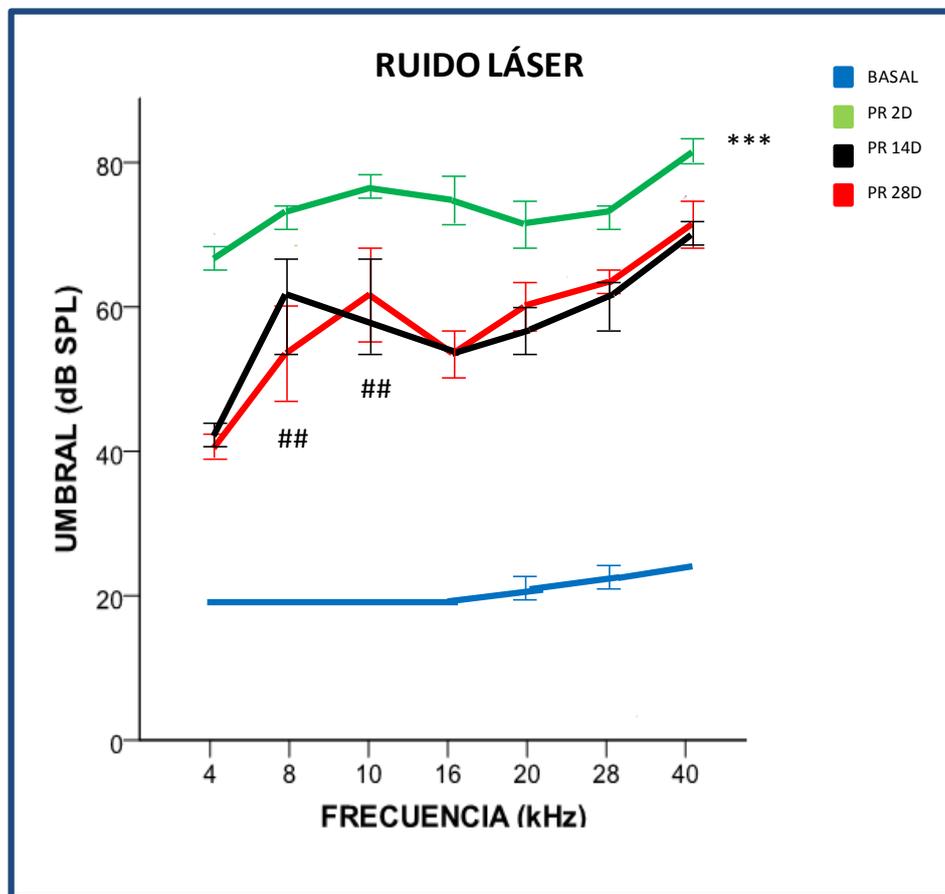


Figura 30. Evolución del audiograma en el grupo de ruido “láser” en el momento basal y a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. Se observa un aumento de los umbrales auditivos en los diferentes momentos de exposición a ruido, con diferencias significativas respecto al momento basal en todas las frecuencias, especialmente a los dos días de exposición al ruido (***, $p=0.000$). A las 14 y a los 28 días tras la exposición a ruido, existe una cierta recuperación de los umbrales auditivos, la disminución de los umbrales es menor para las frecuencias 8 y 10 kHz (##, $p=0.002$).

4.1.2. Estudio comparativo de los umbrales auditivos en respuesta a estimulación con tonos puros

Se estudia la evolución de los umbrales auditivos para los tonos puros (8, 16, 20 y 40 kHz) que fueron presentados a lo largo del ensayo en los diferentes grupos (TABLA 3).

Tabla 3. Umbral auditivo promedio de los tonos puros analizados en los diferentes grupos y momentos del experimento. Se reflejan los umbrales promedios (media \pm SD) en diferentes momentos (basal, 2, 14 y 28 días) de la exposición a ruido en los 4 grupos del estudio en función de los distintos tonos puros utilizados (8, 16, 20, 28 y 40 kHz) (d: días, SD: desviación estándar).

MOMENTO	GRUPO	FRECUENCIA kHz				
		8	16	20	28	40
Basal	CONTROL	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0
	RUIDO 105 dB	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	21 \pm 2	23 \pm 4
	RUIDO 120 dB	21 \pm 02	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	22 \pm 3
	LÁSER	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 1	23 \pm 3	25 \pm 2
2 d	CONTROL	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0
	RUIDO 105 dB	62 \pm 7	55 \pm 4	57 \pm 3	62 \pm 4	67 \pm 8
	RUIDO 120 dB	67 \pm 9	72 \pm 9	76 \pm 10	77 \pm 8	84 \pm 8
	LÁSER	72 \pm 8	75 \pm 11	73 \pm 8	78 \pm 6	82 \pm 4
14 d	CONTROL	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	20 \pm 0	22 \pm 3
	RUIDO 105 dB	58 \pm 7	55 \pm 4	58 \pm 6	59 \pm 6	68 \pm 5
	RUIDO 120 dB	70 \pm 6	67 \pm 8	75 \pm 5	80 \pm 6	82 \pm 4
	LÁSER	63 \pm 13	55 \pm 11	59 \pm 11	65 \pm 9	70 \pm 6
28 d	CONTROL	23 \pm 3	23 \pm 3	27 \pm 3	27 \pm 3	29 \pm 2
	RUIDO 105 dB	62 \pm 6	57 \pm 5	58 \pm 5	61 \pm 4	70 \pm 5
	RUIDO 120 dB	61 \pm 9	60 \pm 14	64 \pm 15	70 \pm 12	74 \pm 13
	LÁSER	58 \pm 13	55 \pm 9	60 \pm 9	65 \pm 6	71 \pm 8

El análisis de medidas repetidas encuentra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto (###, $p=0.000$), pero también entre grupos de ruido para los diferentes tonos como queda reflejado en la siguiente figura (FIGURA 31a-e).

- **Tono 8 kHz:** Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición ($p=0.000$). Existen diferencias estadísticamente significativas

globales entre el grupo de ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL a los 2, 14 y 28 días de la exposición al ruido ($p=0.047$), con valores de umbral más altos para el segundo. Esa diferencia se detecta cuando se comparan los grupos momento por momento, encontrando significación estadística al comparar en el PR 2d el grupo de ruido 105 dB SPL y el ruido “láser” ($p=0.002$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL ($p=0.003$).

Al igual que veíamos anteriormente, en el grupo de ruido “láser” llama la atención la subida del umbral en el momento PR 2d, para posteriormente en el PR 28d tener un descenso más acusado en relación con los tres grupo de ruido (FIGURA 31a).

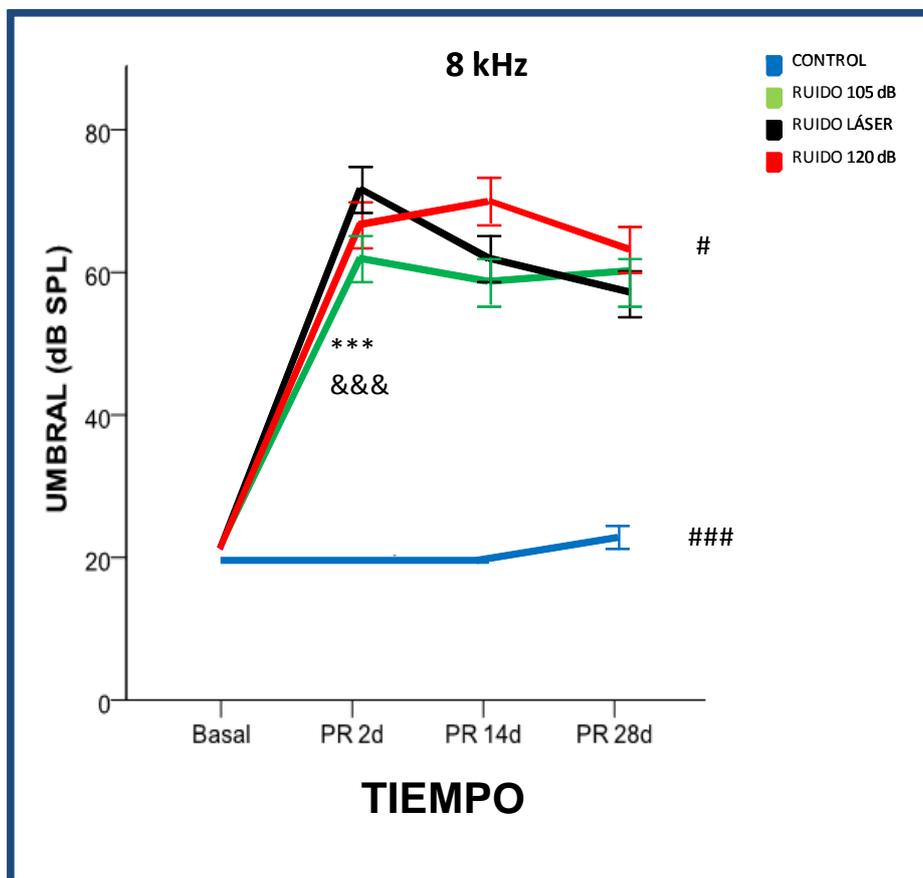


Figura 31a. Evolución del tono 8 kHz en los diferentes grupos del estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición (###, $p=0.000$). Existen diferencias estadísticamente significativas globales entre el grupo de ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido (#, $p=0.047$), con valores de umbral más altos para el segundo. Esa diferencia se detecta cuando se comparan los grupos momento por momento, encontrando significación estadística al comparar en el PR 2d el grupo de ruido 105 dB SPL y el ruido “láser” (***, $p=0.002$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL (&&&, $p=0.003$). [Los símbolos de significación lateral hacen referencia a las diferencias estadísticas a los 2, 14 y 28 días de exposición, en los respectivos grupos. Esta nomenclatura se mantiene en el resto de las figuras, siempre que aparezcan diferencias estadísticas globales].

- **Tono 16 kHz:** Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición ($p=0.000$). Las diferencias significativas aparecen de forma global si se hacen comparaciones entre grupos dos a dos, entre ruido 120 dB SPL y ruido 105 dB SPL ($p=0.000$), ruido 120 dB SPL y ruido “láser” ($p=0.006$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido “láser” ($p=0.012$) a los 2, 14 y 28 días de la exposición al ruido.

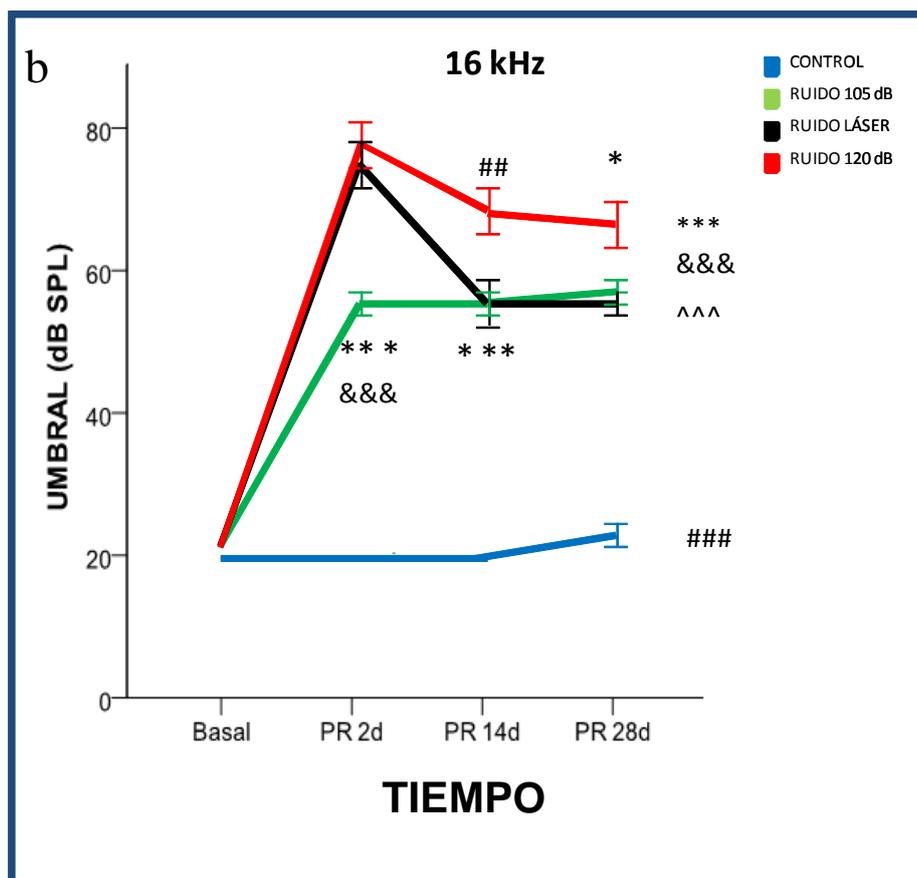


Figura 31b. Evolución del tono 16 kHz en los diferentes grupos del estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición (###, $p=0.000$). Las diferencias significativas aparecen de forma global si se hacen comparaciones entre grupos dos a dos, entre ruido 120 dB SPL y ruido 105 dB SPL (***, $p=0.000$), ruido 120 dB SPL y ruido “láser” (&&&, $p=0.006$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido “láser” (^^^, $p=0.012$) a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. Se aprecian diferencias específicas según el momento del ensayo: PR 2d entre el grupo ruido 105 dB SPL y el resto de grupos (***, $p=0.000$ vs. grupo 120 dB SPL; &&&, $p=0.000$ vs. ruido “láser”), en el PR 14d entre el grupo ruido 105 dB SPL y grupos 120 dB SPL (***, $p=0.004$) y entre grupo ruido 120 dB SPL y ruido “láser” (##, $p=0.021$). Esta misma diferencia entre grupos la encontramos en el PR 28d (ruido 120 dB SPL vs. ruido “láser” *, $p=0.049$).

También apreciamos diferencias específicas según el momento del ensayo: PR 2d entre el grupo ruido 105 dB SPL y el resto de grupos (vs. grupo 120 dB SPL, vs. ruido “láser”; $p=0.000$), en el PR 14d entre el grupo ruido 105 dB SPL y grupos 120 dB SPL ($p=0.004$) y entre grupo ruido 120 dB SPL y ruido “láser” ($p=0.021$). Esta misma diferencia entre grupos la encontramos en el PR 28d (ruido 120 dB SPL vs. ruido “láser”, $p=0.049$) (FIGURA 31b).

- *Tono 20 kHz:* Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición ($p=0.000$). El análisis de la evolución del tono 20 kHz indica que cada grupo se comporta de manera independiente, encontrando diferencias significativas en todas las comparaciones dos a dos: ruido 120 dB SPL vs. ruido 105 dB SPL ($p=0.000$) y vs. ruido “láser” ($p=0.000$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido “láser” ($p=0.002$) a los 2, 14 y 28 días de la exposición al ruido.

También se encuentran diferencias en función de los momentos del estudio: en el PR 2d, el grupo de ruido 105 dB SPL presenta diferencias entre grupo ruido 120 dB SPL y ruido “láser”. En el PR 14d, el grupo de ruido 120 dB SPL presenta diferencias al compararse con ruido 105 dB SPL y ruido “láser”; estas diferencias se mantienen en PR 28d. Cabe resaltar que en todas las comparaciones previas tienen los mismos niveles de significación ($p=0.000$). Este tono puro pone de manifiesto que los umbrales del grupo sometido al ruido “láser” ($p=0.000$) son superiores a los del grupo sometido a 120 dB SPL, que a su vez, son superiores a los del grupo 105 dB SPL ($p=0.000$). 120 dB SPL es el más perjudicial (FIGURA 31c).

- *Tono 28 kHz:* Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición ($p=0.000$). Se encuentran diferencias estadísticas significativas globales en todas las comparaciones de los grupos 2 a 2, al igual que sucedía en el tono 20 kHz: ruido 120 dB SPL vs. ruido 105 dB SPL ($p=0.000$) y vs. ruido “láser” ($p=0.000$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido “láser” ($p=0.001$) a los 2, 14 y 28 días de la exposición al ruido.

En relación con las diferencias por momentos, en PR 2d hay significación en las comparaciones del grupo 105 dB SPL vs. grupo 120 dB SPL y ruido “láser” ($p=0.000$). En los momentos PR 14d y en PR 28d de la exposición al ruido, los umbrales del grupo 120 dB SPL son superiores al del grupo 105 dB SPL ($p=0.000$), seguidos del ruido “láser” ($p=0.000$) en respectivos momentos (FIGURA 31d).

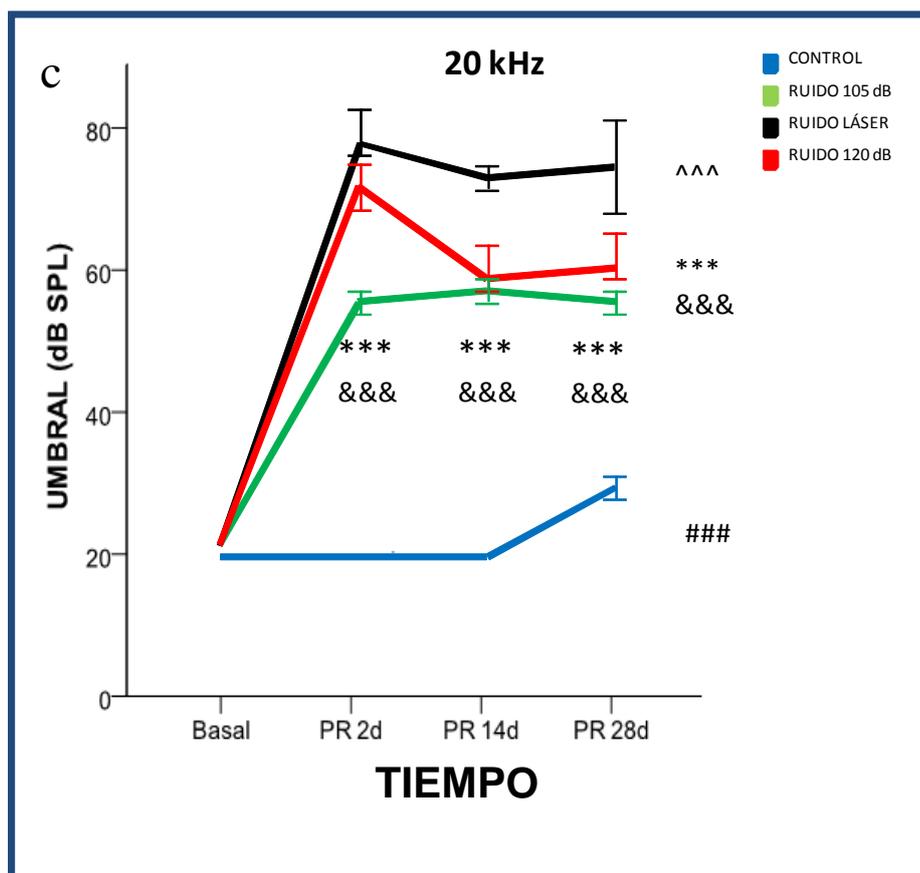


Figura 31c. Evolución del tono 20 kHz en los diferentes grupos del estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición (###, $p=0.000$). El análisis de la evolución del tono 20 kHz indica que cada grupo se comporta de manera independiente, encontrando diferencias significativas en todas las comparaciones dos a dos: ruido 120 dB SPL vs. ruido 105 dB SPL (***, $p=0.000$) y vs. ruido “láser” (&&&, $p=0.000$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido “láser” (^^^, $p=0.002$) a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. También se encuentran diferencias en función de los momentos del estudio: en el PR 2d, el grupo de ruido 105 dB SPL presenta diferencias entre grupo ruido 120 dB SPL y ruido “láser” (***, &&&). En el PR 14d, el grupo de ruido 120 dB SPL presenta diferencias al compararse con ruido 105 dB SPL y ruido “láser”; estas diferencias se mantienen en PR 28d (***, &&&). Cabe resaltar que en todas las comparaciones previas tienen los mismos niveles de significación ($p=0.000$).

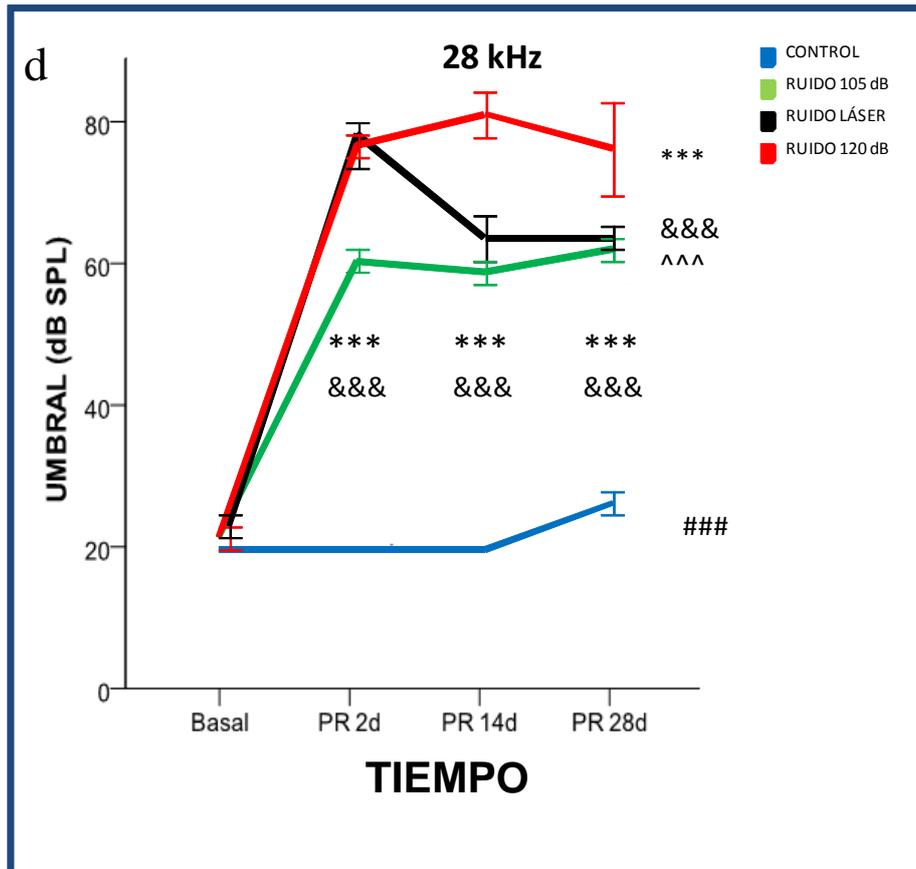


Figura 31d. Evolución del tono 28 kHz en los diferentes grupos del estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición (###, $p=0.000$). Se encuentran diferencias estadísticas significativas globales en todas las comparaciones de los grupos 2 a 2, al igual que sucedía en el tono 20 kHz: ruido 120 dB SPL vs. ruido 105 dB SPL (***, $p=0.000$) y vs. ruido "láser" (&&&, $p=0.000$) y entre ruido 105 dB SPL y ruido "láser" (^^^, $p=0.001$) a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. En relación con las diferencias por momentos, en PR 2d hay significación en las comparaciones del grupo 105 dB SPL vs. grupo 120 dB SPL y ruido "láser" (***) (&&&, $p=0.000$). En PR 14d y en PR 28d, los umbrales del grupo 120 dB SPL son superiores al del grupo 105 dB SPL (***, $p=0.000$), seguidos del ruido "láser" (&&&, $p=0.000$) en respectivos momentos.

- **Tono 40 kHz:** Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición ($p=0.000$). La situación es muy semejante cuando se analiza el comportamiento del tono 28 kHz. Finalmente, el tono 40 kHz presenta diferencias significativas entre todos los grupos comparados dos a dos entre ruido 120 dB SPL vs. ruido 105 dB SPL ($p=0.000$) y vs. ruido "láser" ($p=0.000$) a los 2, 14 y 28 días de la exposición al ruido. Sin embargo no existen diferencias entre grupo de ruido 105 dB SPL y ruido "láser", ya que se comportan de manera similar a partir de PR 14d.

RESULTADOS

Pero en PR 2d sí existen diferencias entre grupo de ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL ($p=0.000$), y grupo de ruido 105 dB SPL y ruido "láser" ($p=0.000$) (FIGURA 31e).

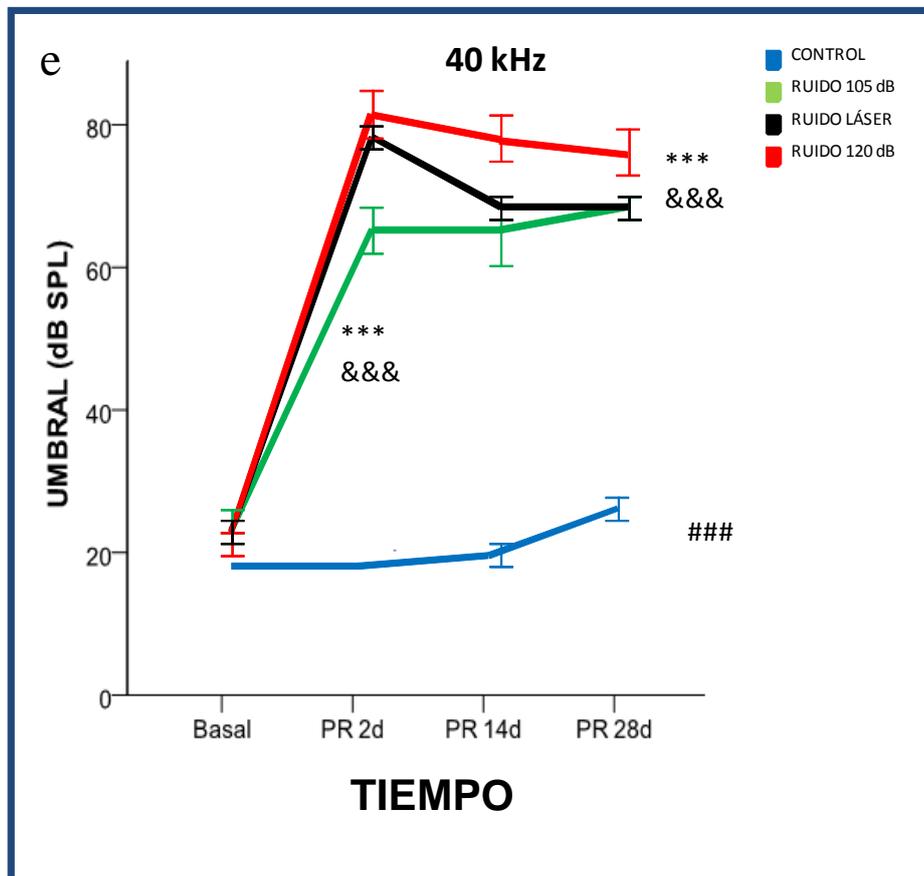


Figura 31e. Evolución del tono 40 kHz en los diferentes grupos del estudio. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición (###, $p=0.000$). La situación es muy semejante cuando se analiza el comportamiento del tono 28 kHz. Finalmente, el tono 40 kHz presenta diferencias significativas entre todos los grupos comparados dos a dos entre ruido 120 dB SPL vs. ruido 105 dB SPL (***, $p=0.000$) y vs. ruido "láser" (&&&, $p=0.000$) a los 2 (PR2d), 14 (PR14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. Sin embargo no existen diferencias entre grupo de ruido 105 dB SPL y ruido "láser", ya que se comportan de manera similar a partir de PR 14d. Pero en PR 2d sí existen diferencias entre grupo de ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL (***, $p=0.000$), y grupo de ruido 105 dB SPL y ruido "láser" (&&&, $p=0.000$).

Estos datos revelan que el ruido de 120 dB SPL presenta efecto audiológico más lesivo, seguido del ruido "láser" y del ruido 105 dB SPL, siempre en ese orden. Cabe resaltar el diferente ancho de banda de frecuencia que tiene el ruido "láser" con intensidad 105 dB SPL (9-13 kHz) frente a los grupos de ruido con intensidad de 105 y 120 dB SPL (2-22kHz).

4.1.3. Estudio comparativo de las latencias y amplitudes de los picos de ABR

4.1.3.1. Latencias pico

En el momento basal no aparecen diferencias entre los grupos. Sin embargo, en los datos puede observarse que la evolución de las latencias en los grupos expuestos a ruido es diferente cuando se compara con el grupo control no expuesto, existiendo diferencias significativas ($p=0,000$). Aparece una disminución de las latencias a partir del pico II tras la exposición del ruido que se mantiene en el tiempo (TABLA 4).

Tabla 4. Latencias de los picos de ABR I a IV. Se reflejan las latencias promedio (en ms) en diferentes tiempos del estudio (basal y a los 2, 14 y 28 días tras la exposición a ruido) en los 4 grupos experimentales (d: días).

MOMENTO	GRUPO	Latencia media(ms)			
		I	II	III	IV
Basal	CONTROL	1,1	2,31	2,95	4,09
	RUIDO 105 dB	1,15	2,37	3,17	4,19
	RUIDO 120 dB	1,16	2,41	3,28	4,27
	LÁSER	1,16	2,58	3,29	4,37
2 d	CONTROL	1,1	2,33	2,96	4,08
	RUIDO 105 dB	1,07	2,12	2,83	3,74
	RUIDO 120 dB	1,15	2,19	2,96	3,95
	LÁSER	1,09	2,17	2,86	3,89
14 d	CONTROL	1,08	2,32	2,99	3,91
	RUIDO 105 dB	1,1	2,09	2,84	3,86
	RUIDO 120 dB	1,17	2,19	3	3,96
	LÁSER	1,07	2,02	2,72	3,69
28 d	CONTROL	1,1	2,33	3,06	4,1
	RUIDO 105 dB	1,04	1,99	2,73	3,66
	RUIDO 120 dB	1,11	2,1	2,88	3,9
	LÁSER	1,06	1,98	2,68	3,63

El análisis estadístico de los datos indica que la disminución de las latencias tras la exposición a ruido es estadísticamente significativo para los picos II, III y IV en el grupo ruido 105 dB SPL y ruido “láser”. El grupo de ruido 120 dB SPL también muestra un descenso de los valores de latencia aunque las diferencias estadísticas no son tan marcadas. El análisis estadístico de los datos de latencia pico aplicando un modelo lineal

general de medidas repetidas nos indica que para el pico I no hay diferencias significativas entre grupos (FIGURA 32).

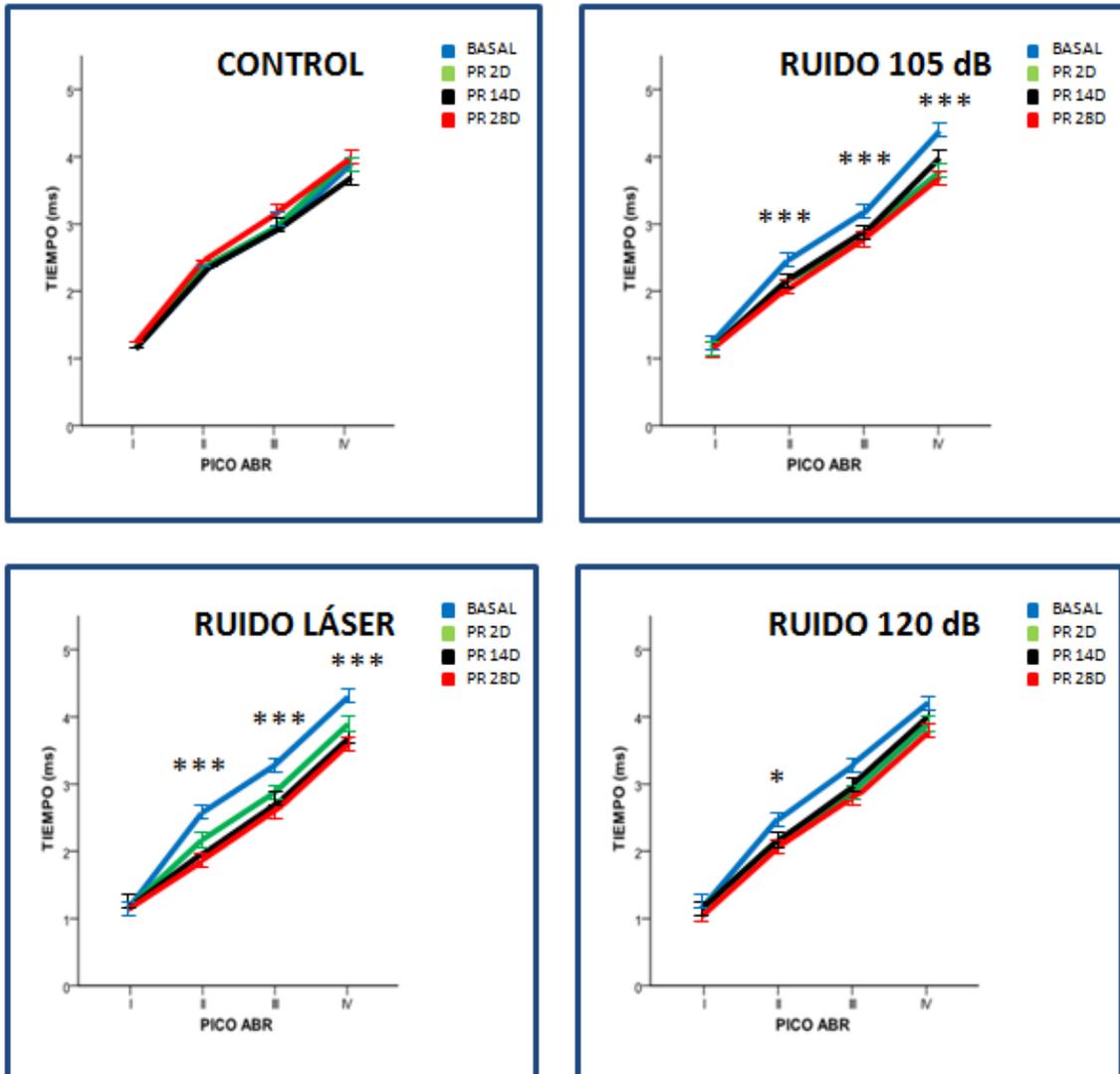


Figura 32. Evolución de las latencias I-IV en cada uno de los grupos experimentales en el momento basal y a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido (A: control; B: ruido 105 dB SPL, C: ruido “láser” y D: ruido 120 dB SPL). Existen diferencias significativas en la disminución de las latencias en los picos II, III y IV en el grupo ruido 105 dB SPL y en el grupo ruido “láser” SPL. (***, p=0,000). El grupo de ruido a intensidad de 120 dB SPL presenta una disminución en los valores de latencia del pico I aunque las diferencias estadísticas no son tan marcadas (*, p=0,042).

4.1.3.2. Latencias interpico

Las latencias interpico (IPLS) informan de la velocidad de transmisión del impulso nervioso a lo largo de las diferentes estaciones de la vía auditiva en el tronco cerebral. La

RESULTADOS

siguiente tabla muestra los valores promedio de las latencias interpico I-II, II-IV y I-IV en cada uno de los momentos y para los diferentes grupos experimentales (TABLA 5).

Tabla 5. Latencias interpico I-II, II-IV y I-IV. Se reflejan las latencias interpico promedios (en ms) en diferentes tiempos del estudio (basal, 2, 14 y 28 días) en los 4 grupos experimentales (d: días).

MOMENTO	GRUPO	Latencias interpico(ms)		
		I-II	II-IV	I-IV
Basal	CONTROL	1,21	1,79	2,99
	RUIDO 105 dB	1,22	1,82	3,04
	RUIDO 120 dB	1,25	1,86	3,11
	LÁSER	1,25	1,96	3,21
2 d	CONTROL	1,23	1,75	2,98
	RUIDO 105 dB	1,04	1,62	2,66
	RUIDO 120 dB	1,04	1,76	2,8
	LÁSER	1,08	1,72	2,8
14 d	CONTROL	1,24	1,59	2,83
	RUIDO 105 dB	0,99	1,76	2,76
	RUIDO 120 dB	1,01	1,77	2,79
	LÁSER	0,96	1,66	2,62
28 d	CONTROL	1,23	1,77	3
	RUIDO 105 dB	0,96	1,67	2,62
	RUIDO 120 dB	0,98	1,8	2,79
	LÁSER	0,92	1,66	2,57

El análisis estadístico de los datos muestra un descenso marcado de las latencias interpico, especialmente la I-II, en los animales expuestos a ruido cuando se comparan con el grupo control, cuyos valores se mantienen muy conservados en el tiempo. En el grupo control no hay cambios en las IPLS. Tras el ruido, se produce una disminución de las latencias, que se mantiene en el tiempo (FIGURA 33).

En lo referente a las latencias interpico, el comportamiento longitudinal de la IPL I-II en el grupo control es claramente diferente de la de los grupos expuestos a ruido, con

RESULTADOS

diferencias altamente significativas en todos los casos ($p=0.000$). La IPL II-IV en cambio, no presenta diferencias de comportamiento entre grupos experimentales, encontrándose diferencias estadísticas en los grupos expuestos a ruido en PR2d; estos datos se mantienen en la IPL I-IV. Esto nos indica que los grupos expuestos a ruido responden tras la lesión con una disminución de la IPL I-II, sugiriendo una “aceleración” en la velocidad de transmisión del impulso nervioso.

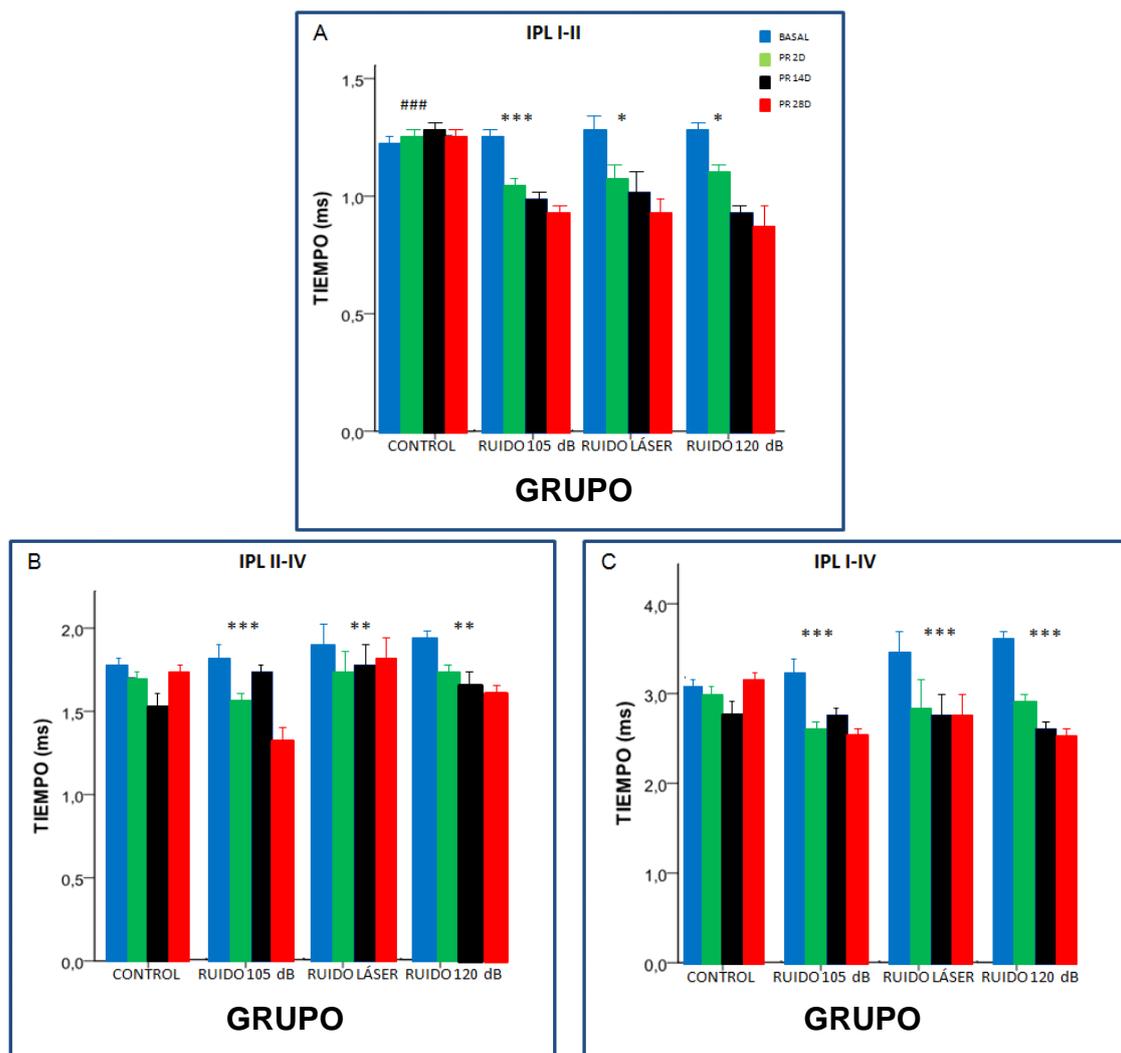


Figura 33. Evolución de las latencias interpico I-II (A), II-IV (B) y I-IV (C) en el momento basal y a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. A: existen diferencias significativas entre el grupo control y los otros grupos expuestos a ruido (###, $p=0.000$). Se aprecian diferencias en el momento PR 2d de cada grupo experimental de ruido respecto al basal (***, $p=0,000$; *, $p=0,045$). B y C: No se aprecian diferencias significativas de comportamiento entre grupos experimentales, hay diferencias en el grupo de ruido 105 dB SPL y ruido “láser” en PR 2d (***, $p=0,000$; **, $p=0,024$).

4.1.3.3. Amplitudes

La amplitud de los ondas ABR puede determinarse como altura pico o bien como amplitud pico-valle, restando de la amplitud pico la amplitud del valle inmediatamente posterior. La siguiente tabla muestra la amplitud promedio (media \pm SD, en nV) de cada uno de los grupos del estudio y la amplitud pico-valle promedio (media \pm SD, en nV) de los picos ABR I a IV (TABLA 6 y 7).

Tabla 6. Amplitud de los picos ABR I a IV. Se reflejan el promedio de las amplitudes pico (media \pm SD, en nV) en diferentes tiempos del estudio (basal, 2, 14 y 28 días) en los 4 grupos experimentales (d: días, SD: desviación estándar).

GRUPO	MOMENTO	Amplitud (nV)							
		I		II		III		IV	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
CONTROL	Basal	1922	456	2634	751	747	632	738	770
	2 d	2278	309	3136	421	290	343	685	480
	14 d	2665	359	3962	976	-171	975	312	1091
	28 d	1929	546	2984	1129	273	526	402	510
RUIDO 105 dB	Basal	2230	411	4577	1342	443	682	599	728
	2 d	815	290	1316	522	441	279	960	283
	14 d	668	276	777	363	506	226	841	380
	28 d	869	250	932	465	782	250	632	305
RUIDO 120 dB	Basal	1680	263	3870	1041	-45	596	377	557
	2 d	420	327	1154	366	459	223	811	603
	14 d	489	381	741	318	554	367	789	353
	28 d	661	484	739	415	479	264	1100	398
LÁSER	Basal	1970	555	3722	785	88	611	845	601
	2 d	530	449	1094	362	352	316	566	537
	14 d	829	446	692	325	696	535	750	455
	28 d	881	407	645	666	685	602	700	339

El análisis estadístico de los datos refleja una caída notable de la amplitud de los picos I y II inmediatamente tras la exposición a ruido (PR 2d). Esta disminución se mantiene a lo largo del tiempo, sin recuperar los valores basales, en todos los grupos expuestos a ruido. Entre los grupos de ruido no hay diferencias estadísticamente significativas.

En el grupo control, las amplitudes mantienen valores similares a lo largo del ensayo, al igual que en el momento basal no hay diferencias entre grupos.

RESULTADOS

Tabla 7. Amplitud pico-valor de las ondas ABR I a IV. Se reflejan el promedio de las amplitudes pico-valor (media \pm SD, en nV) en diferentes tiempos del estudio (basal, 2 ,14 y 28 días) en los 4 grupos experimentales (d: días, SD: desviación estándar).

GRUPO	MOMENTO	Amplitud pico valle (nV)							
		I		II		III		IV	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
CONTROL	Basal	1237	1657	1029	2400	845	1381	1069	6332
	2 d	835	1868	771	1899	319	1077	977	7327
	14 d	1429	3112	1352	1765	1396	1137	1334	8784
	28 d	1848	2173	1305	1848	837	576	336	6310
RUIDO 105 dB	Basal	1392	4622	1983	2621	890	783	829	8017
	2 d	872	1435	634	1165	263	1994	452	2906
	14 d	683	987	411	1199	359	1712	576	2067
	28 d	599	1225	596	1331	259	1704	432	2734
RUIDO 120 dB	Basal	1199	3996	1466	1664	971	676	376	6446
	2 d	504	1266	776	1107	322	1877	656	2110
	14 d	755	1065	360	1073	366	1831	583	1739
	28 d	914	954	359	1217	352	2037	515	2287
LÁSER	Basal	1243	3806	1531	2058	1232	1184	859	6833
	2 d	930	894	303	1062	396	1142	873	2338
	14 d	1275	719	385	1312	627	1620	447	2636
	28 d	1165	919	489	1393	831	1598	736	2586

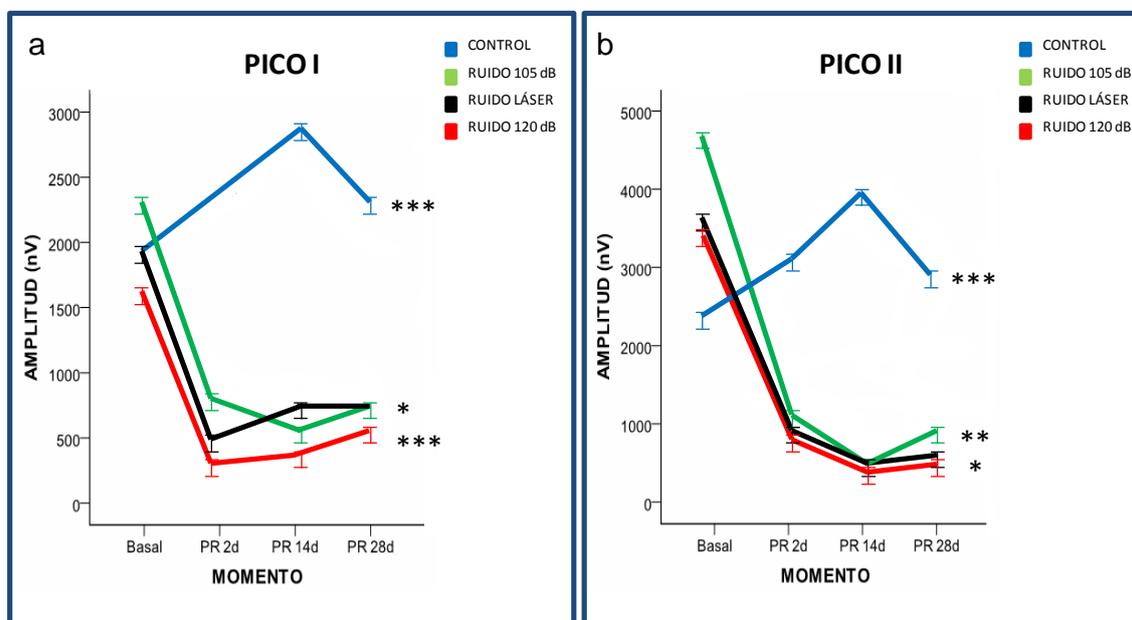


Figura 34. Evolución de la amplitud del pico I y II por grupo en el momento basal y a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. Existen diferencias estadísticas entre el grupo control y los expuestos a ruido (***, $p=0,000$) y entre los diferentes grupos. En el pico I: ruido 105 dB SPL vs. ruido 120 dB SPL (***, $p=0,000$) y ruido 120 dB SPL vs. ruido "láser" (*, $p=0,041$). En el pico II de igual manera, encontramos diferencias estadísticamente significativas control vs ruido (***, $p=0,000$) y entre los grupos ruido 105 dB SPL vs. ruido 120 dB SPL (*, $p=0,039$) y ruido 105 dB SPL vs ruido "láser" (**, $p=0,02$).

RESULTADOS

Analizando la evolución en el tiempo de las amplitudes de los diferentes picos entre grupos con un modelo de medidas repetidas, se encuentran diferencias estadísticamente significativas para el pico I y II entre el grupo control y los grupos expuestos a ruido ($p=0.000$), pero también entre los grupos de ruido entre sí (FIGURA 34).

No se encontraron diferencias entre grupos para la amplitud del pico IV, aunque curiosamente en el grupo control la amplitud tiende a disminuir a lo largo del estudio mientras que en los animales expuestos tiende a aumentar.

Las siguientes figuras representan la evolución de las amplitudes pico a lo largo del ensayo, para cada uno de los grupos experimentales (FIGURA 35).

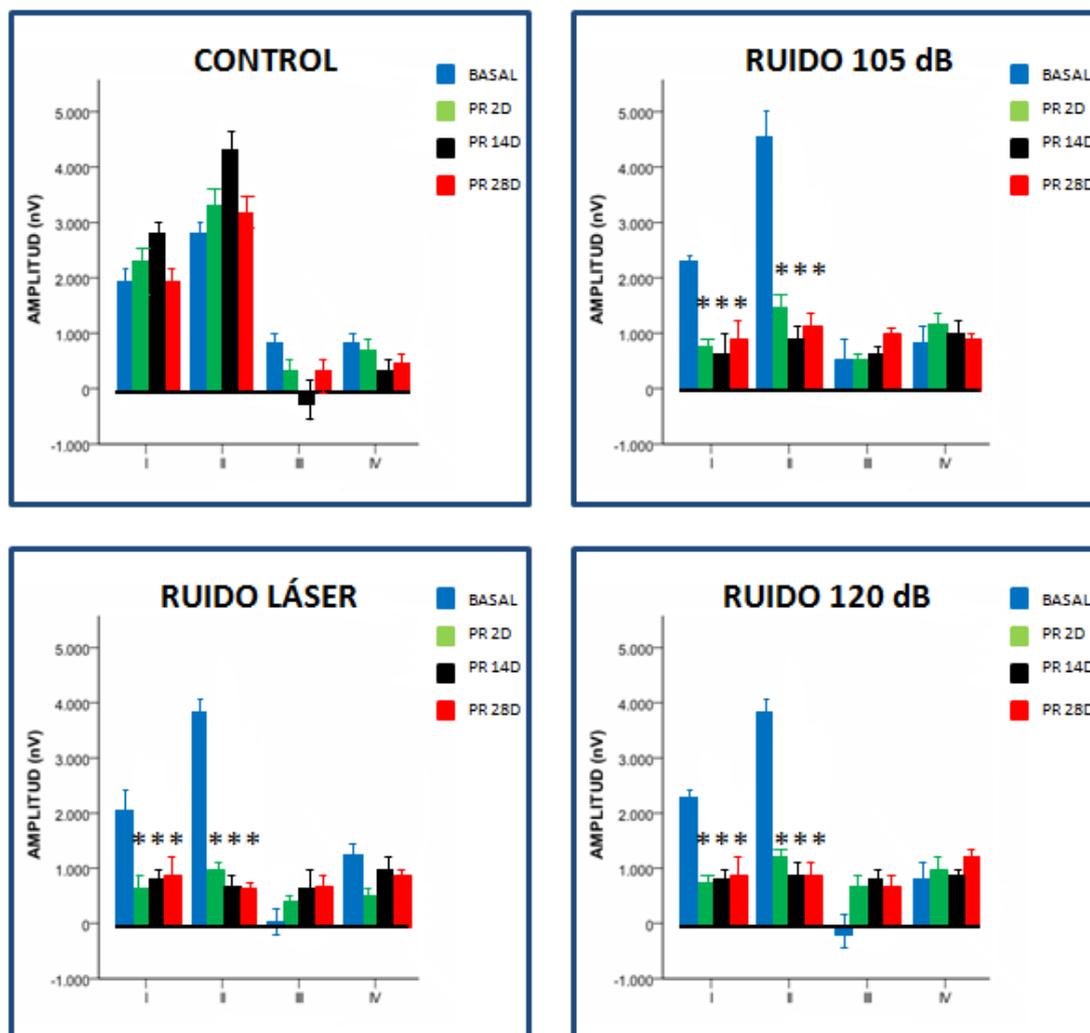


Figura 35. Evolución de las amplitudes pico (en nV) de los picos ABR I a IV en los diferentes grupos experimentales en el momento basal y a los 2 (PR 2d), 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición al ruido. Existen diferencias estadísticamente significativas al disminuir la amplitud del pico I y II en todos los grupos de ruido al comparar con el momento basal (***, $p=0.000$).

4.1.4. Estudio comparativo de los umbrales auditivos de los DPOAES

Para realizar un estudio más exhaustivo de la función auditiva, se analiza la función de las CCE mediante la realización de pruebas de DPOAES como datos complementarios a los ABR.

La siguiente tabla muestra los umbrales de aparición de DPOAES para cada frecuencia central testada, por grupo y momento, es decir, la mínima intensidad de sonido de los dos tonos estimuladores (F1 y F2) que genera una respuesta DPOAE 2F1-F2 (TABLA 8).

Tabla 8. Umbrales de detección del DPOAE 2F1-F2. Se reflejan los umbrales medio (media \pm SD) para cada una de las frecuencias centrales empleadas, por grupo y tiempo (d: días, SD: desviación estándar).

MOMENTO	GRUPO	FRECUENCIA (kHz)									
		8		10		14		18		22	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Basal	CONTROL	40	6	38	4	43	3	44	4	53	5
	RUIDO 105 dB	38	4	40	0	43	3	49	2	50	0
	RUIDO 120 dB	35	6	40	0	40	0	48	5	50	0
	LÁSER	33	6	40	0	40	0	50	0	53	3
2 d	CONTROL	65	7	75	7	80	0	100	0	100	0
	RUIDO 105 dB	66	3	75	0	90	12	100	0	100	0
	RUIDO 120 dB	67	3	78	3	100	0	100	0	100	0
	LÁSER	42	3	47	3	49	2	55	5	60	0
14 d	CONTROL	66	5	75	4	93	15	100	0	100	0
	RUIDO 105 dB	68	5	79	3	89	13	100	0	100	0
	RUIDO 120 dB	65	0	77	3	93	12	100	0	100	0
	LÁSER	38	4	42	3	47	4	53	5	58	4
28 d	CONTROL	64	8	75	9	93	16	100	0	100	0
	RUIDO 105 dB	68	4	75	0	88	18	100	0	100	0
	RUIDO 120 dB	68	6	77	3	100	0	100	0	100	0
	LÁSER	40	6	38	4	43	3	44	4	53	5

Cuando se comparan los DPgramas entre genotipos y por cada momento, se puede ver cómo en el momento basal los cuatro grupos presentan un DPgrama muy similar, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Dos días tras la exposición a ruido, los animales de los grupos expuestos presentan una elevación de los umbrales de DPOAES con umbrales muy parecidos.

RESULTADOS

A los 14 y 28 días post ruido, la situación sigue siendo muy similar, mostrando todos los grupos una elevación estadísticamente significativa del DPgrama comparado con el grupo control, pero sin diferencias entre ellos (FIGURA 36).

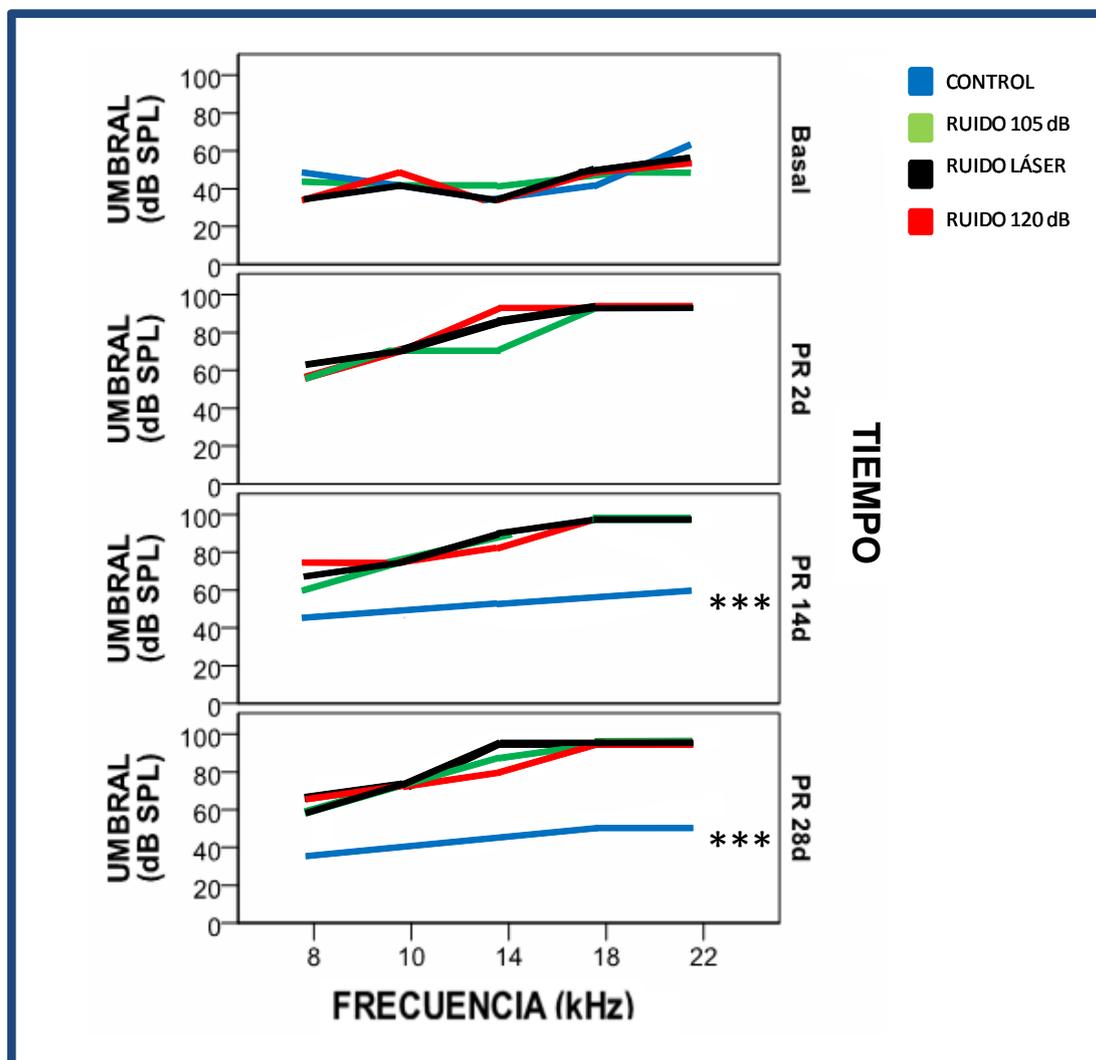


Figura 36. Umbral en dB SPL de DPOAES en los diferentes momentos del experimento. No se encuentran diferencias significativas ni el momento basal ni a los 2 días (PR 2d) de la exposición a ruido. Sin embargo, aparece una elevación estadísticamente significativa respecto el grupo control (***, $p=0,000$) a los 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición a ruido, pero sin existir diferencias entre los diferentes grupos expuestos a ruido.

El estudio estadístico de medidas repetidas refleja que los grupos expuestos a ruido experimentan un aumento marcado de umbrales, con diferencias estadísticamente significativas para todas las frecuencias respecto al grupo control, pero sin diferencias entre ellos. Se decide analizar con más detalle los DPOAES de las frecuencias 8 y 10 kHz, especialmente en el grupo de ruido "láser" para ver si existe la misma correlación en estas

frecuencia con el daño producido en las CCE, y que como vimos anteriormente se reflejaba en el audiograma (FIGURA 37).

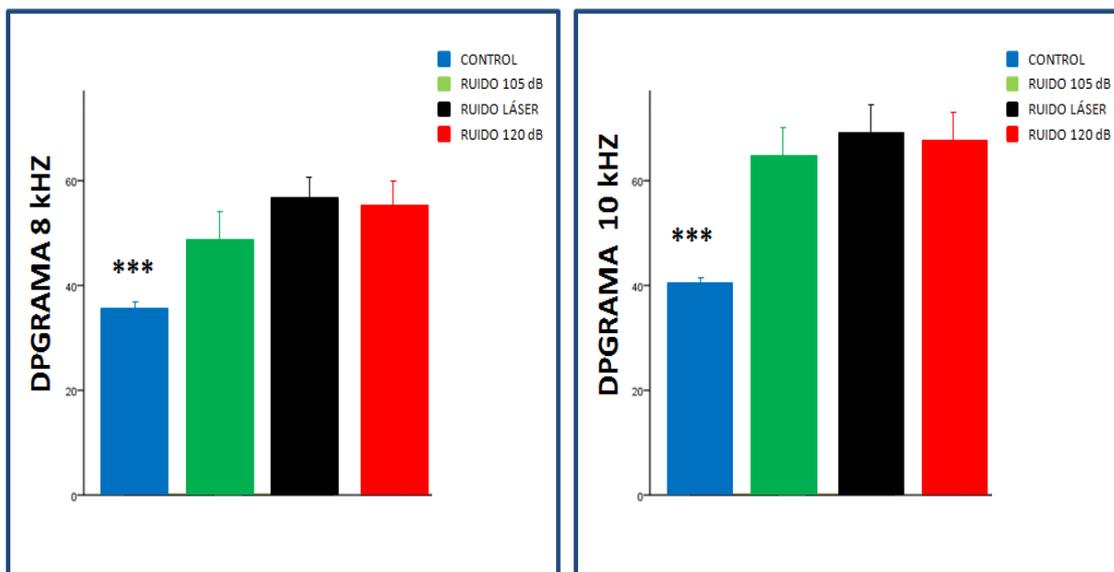


Figura 37. DPgrama de las frecuencias 8 y 10 Hz en los diferentes grupos del estudio. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los umbrales del grupo control respecto los diferentes grupos de ruido (***, p=0,000).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el umbral DPOAES a las frecuencias 8 y 10 Hz entre el grupo de ruido “láser” y los grupos de ruido de 105 y 120 dB SPL. Pero seguimos encontrando diferencias significativas entre los umbrales del grupo control con los de los grupos expuestos a ruido, al igual que encontramos al analizar las DPOAES de forma global a lo largo de todas las frecuencias.

4.2. EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DEL IGF-1 TRAS LA EXPOSICIÓN A RUIDO EXCESIVO.

La concentración media en suero de IGF-1 (ng/ml) obtenida en los diferentes momentos del estudio fue de 463 ± 109 . La concentración de IGF-1 en el grupo control, disminuye de forma progresiva a lo largo de los tiempos estudiados, que fueron basal, 14 días y 20 días tras ruido, variando entre 600-400 ng/ml. Aunque la disminución en el grupo control es menos marcada que en los animales expuestos a ruido, e incluso en algunos como en el ruido láser asciende, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de

ruido y el grupo control. Es decir, la exposición a ruido en los grupos ruido 105 dB SPL, ruido 120 dB SPL y ruido “láser” no parece modificar esta evolución (FIGURA 38).

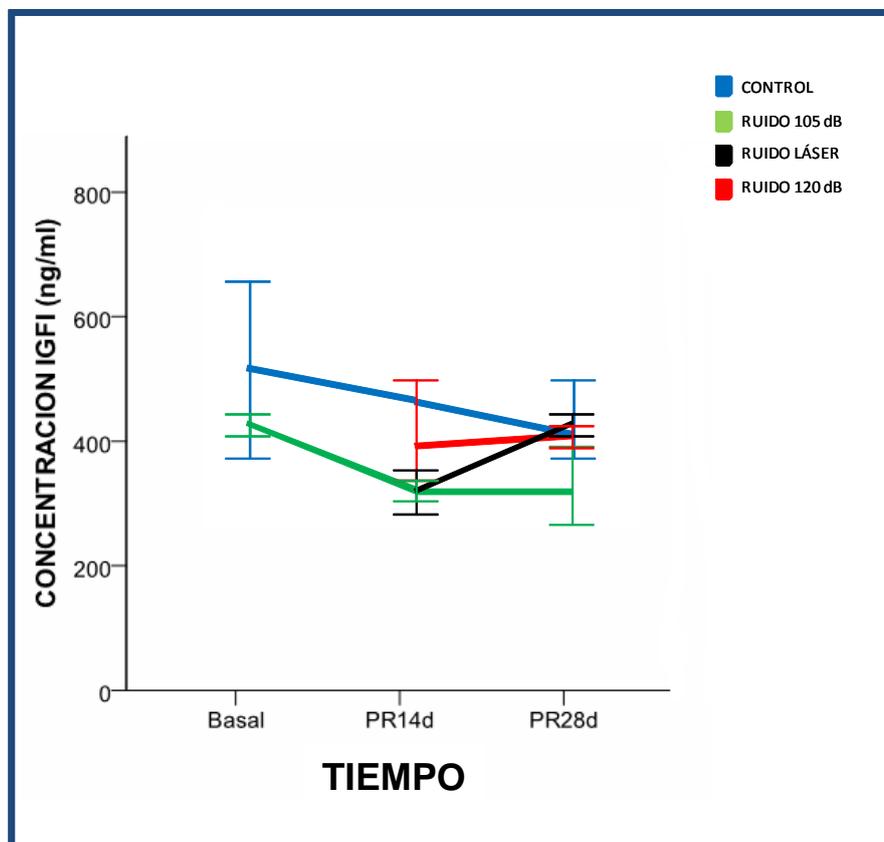


Figura 38. Evolución de los niveles de IGF-1 (en ng/ml) en los cuatro grupos en diferentes tiempos basal y a los 14 (PR 14d) y 28 días (PR 28d) de la exposición a ruido, se aprecia una disminución de los niveles de IGF-1 en suero a lo largo del experimento, pero sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

El estudio conjunto de los valores de IGF-1 y los de los umbrales de audición individuales sugiere que la concentración de IGF-1 disminuye (< 400 ng/ml) a medida que empeoran los umbrales de audición y superan los 60 dB SPL.

Existe una correlación inversa débil significativa entre los umbrales auditivos y los niveles de IGF-1 en suero (coeficiente de Pearson = -3,95, p: 0,031). Es decir a mayor umbral auditivo encontramos menor concentración de IGF-1 en suero. Esta relación es significativa independientemente del grupo experimental del estudio. Estos valores se pueden ajustar a una recta de pendiente -1.41 (FIGURA 39).

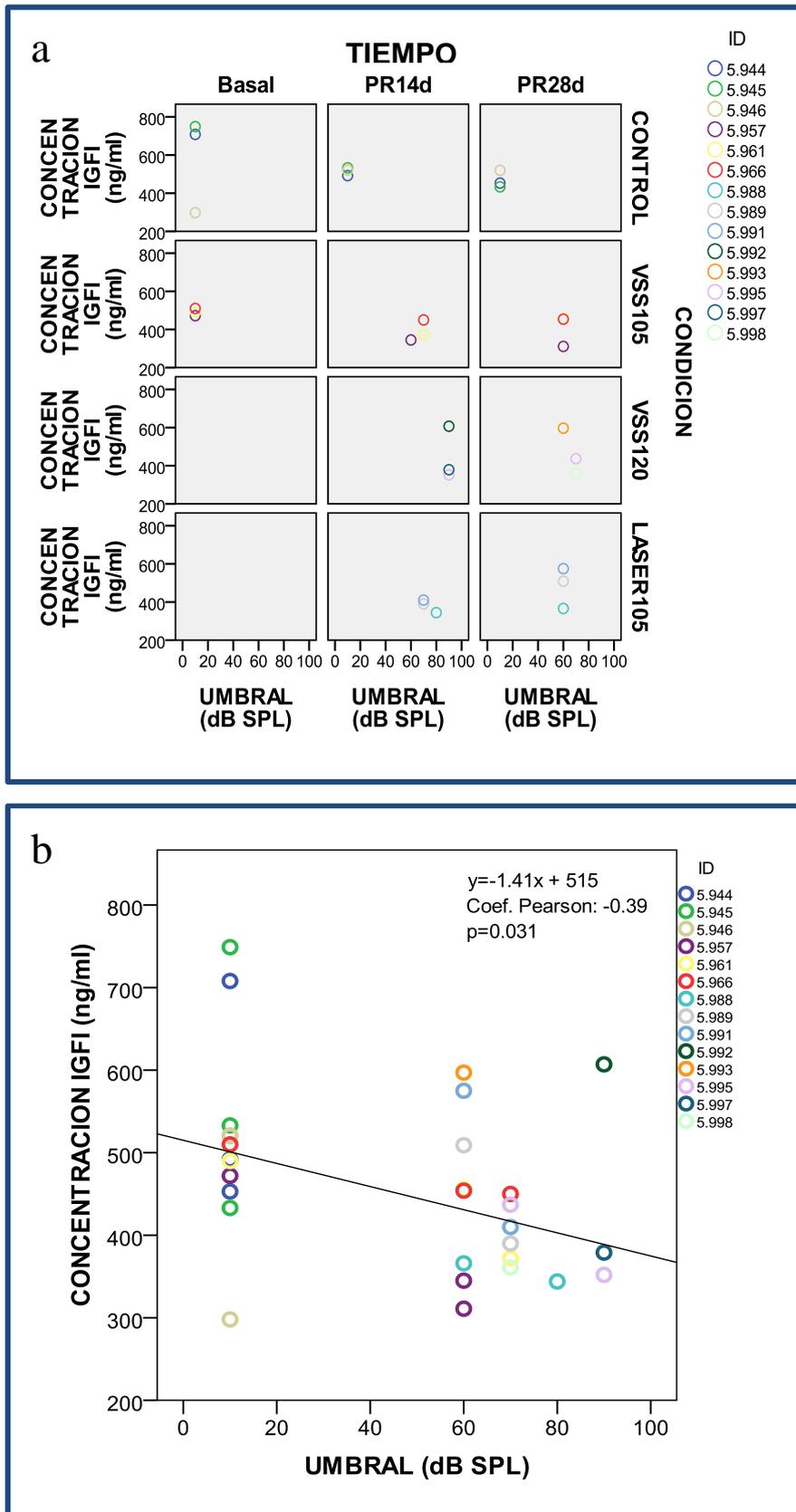


Figura 39. a) Diagrama de puntos de la correlación del umbral de ABR y la concentración de IGF-1 en diferentes tiempos del estudio. b) Representación grafica de la correlación entre el umbral de ABR y la concentración de IGF-1 en suero en los individuos analizados con significación estadísticas ($p=0,031$).

4.3. CITOARQUITECTURA DEL OC

4.3.1. Histología básica

La anatomía de la cóclea de los ratones del grupo control y los expuestos a ruidos presentan una morfología diferente, especialmente las diferencias se aprecian en el OC, ligamento espiral y en el limbo (FIGURA 40).

4.3.1.1. Órgano de Corti

Las CC en el OC presentan grandes variaciones en cada uno de los tres grupos de ruido así como en cada una de las espiras de la cóclea. En la porción apical del grupo de ruido a 105 dB SPL se conserva su morfología normal, sin embargo en el grupo del ruido láser las células aparecen descendidas hacia la membrana basilar junto con las células de soporte de Hensen. En el grupo de ruido a 120 dB SPL no se aprecian las tres filas de CCE organizadas, pero sí conservan su citoarquitectura algunas CCE y las CCI.

En la espira media del grupo de ruido a 105 dB SPL hay una desestructuración en la segunda y tercera fila de CCE. Sin embargo en el grupo de ruido a 120 dB SPL aparece una desorganización mayor, de tal manera que las CC son difícilmente reconocibles, debido al colapso de los túneles de Corti y los espacios de Nuel. Por el contrario, en el grupo de ruido "láser" la morfología de las CC es casi completamente igual al grupo control.

En la espira basal, los cambios histológicos son muy similares a los de la espira media, pero más acusados, y se observa que el ruido genera una pérdida de CC y apilamiento de las células de sostén. En el grupo de ruido "láser" estos cambios son menos llamativos.

4.3.1.2. Ligamento espiral

En los animales sometidos a ruido se observa un daño en los fibrocitos del ligamento espiral con respecto al grupo control. En el ligamento espiral los fibrocitos tipo IV fueron los más vulnerables, y a continuación los fibrocitos tipo II (Ver apartado 5.4, (32)

Después del daño por ruido se observa un área donde desaparecen estos fibrocitos. La pérdida de fibrocitos es mayor en las tres espiras del grupo de ruido a 120 dB SPL, seguido del ruido "láser" (sobre todo en la espira apical) y por último en el grupo de animales sometidos a ruido a 105 dB SPL.

4.3.1.3. Limbo

El limbo presenta cambios morfológicos en los tres grupos de animales expuestos a ruido, que afectan a los fibrocitos al igual que en el ligamento espiral, pero sin dañar la zona de células interdentadas. Existe una pérdida de fibrocitos en la zona central del limbo en la espira apical de los animales sometidos a ruido "láser" y a ruido de 120 dB SPL. En la espira media y basal de todos los grupos expuestos a ruido se observa la pérdida de fibrocitos, siendo mucho más evidente en el grupo de ruido de intensidad 120 dB SPL.

4.3.1.4. Estría vascular

La estría vascular (EV) mostró una organización celular similar entre el grupo control y el grupo de ruido de 105 dB SPL. Cabe resaltar que en el grupo de ruido "láser" existe un estrechamiento y atrofia de la misma, sin embargo en el grupo expuesto a ruido de una intensidad de 120 dB SPL aparece ensanchada, dilatada y con vacuolización intercelular.

4.3.1.5. Ganglio

El análisis morfohistológico de los somas de las neuronas del ganglio espiral no demostró diferencias en relación a la densidad somal entre el grupo control y los tres tipos de ruido, presentando una morfología similar entre ellos.

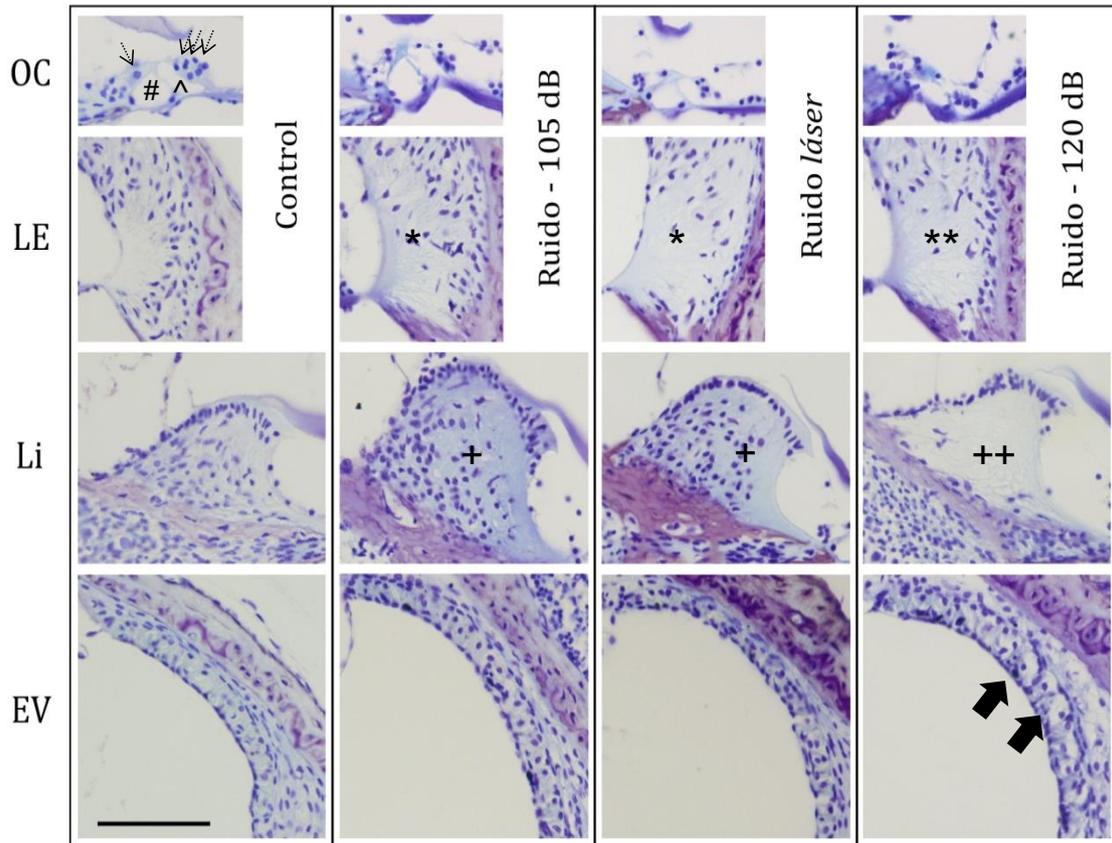


Figura 40. Tinción de Nissl: Se aprecian las manifestaciones histológicas previamente descritas en el órgano de Corti (OC), ligamento espiral (LE), limbo (Li) y estría vascular de los diferentes grupos del estudio. (Flecha fina: CCI, 3 Flechas finas: CCE, #: espacio de Nuel; ^; túnel de Corti; * pérdida de fibrocitos tipo IV en ligamento espiral, +: pérdida de fibrocitos en el limbo; Flechas anchas: vacuolización de la estría vascular. Barra de escala: 100 μ m.

4.3.2. Recuento celular

Se estudia la morfología de las CC del OC en los cuatro grupos de ratones CBA mientras realizamos el método de recuento estereológico.

En el grupo control vemos una distribución similar de las 3 filas de CCE y la fila de CCI tanto en el ápex como en la media, sin embargo de forma fisiológica a medida que nos alejamos hacia la porción basal de las cóclea, las células mantienen esa distribución pero se disponen de forma apelmazada, con una disminución del espacio intercelular, estrechándose en el “lesser epithelium ridge” (FIGURA 41).

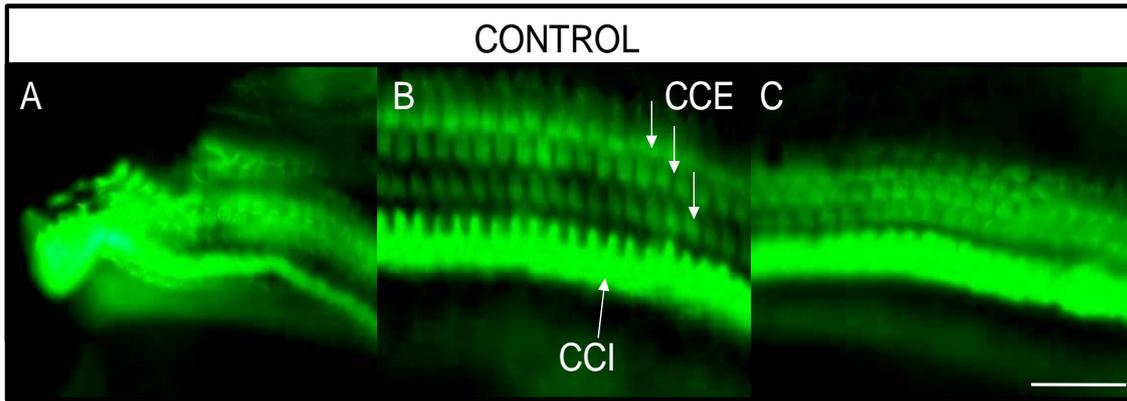


Figura 41. Morfología fisiológica de las CCE y CCI en la espira apical (a), media (b) y basal (c) de la cóclea. Barra de escala: A, B, C: 100 μ m.

En el grupo de ruido a 105 dB SPL se conserva la misma citoarquitectura que en el grupo control en la espira apical, pero podemos ver como existe una pérdida y disrupción de las CCE a partir de la espira media, desapareciendo inicialmente la última fila de las CCE y conservando de forma intacta las CCI, hasta llegar a una desestructuración de las filas de CCE aumentando el espacio intercelular e incluso en las CCI, como se ve en la segunda imagen. En la región basal de la cóclea se aprecian disrupciones segmentarias que afectan de forma brusca a las CC e incluso a la membrana basilar (FIGURA 42).

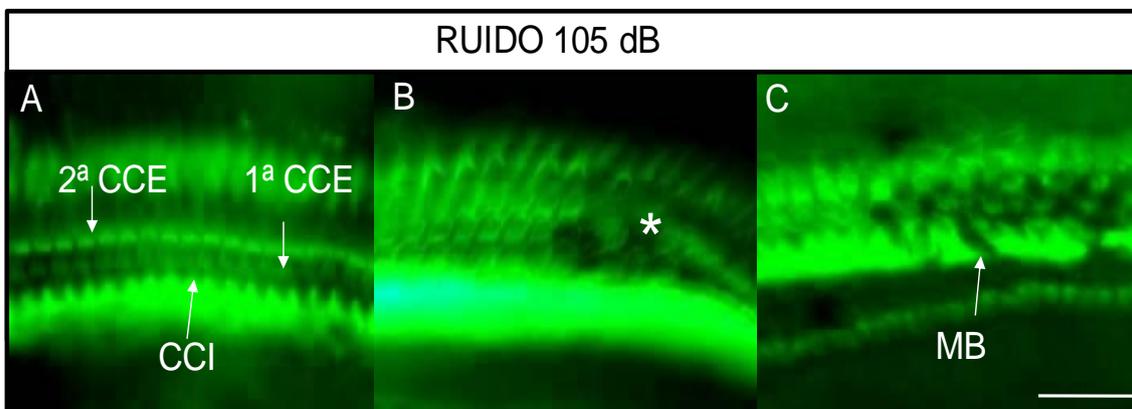


Figura 42. Morfología de las CC del grupo de ruido a 105 dB SPL. A: Imagen representativa de la desaparición de la tercera fila de CCE. B: imagen representativa de la pérdida de CCE (*). C: Imagen representativa de las disrupciones segmentarias que pueden llegar a afectar a la membrana basilar (MB). Barra de escala: A, B, C: 100 μ m.

En el grupo de ruido “láser” aparece un daño selectivo en la región más distal del ápex, desapareciendo las CCE a lo largo de todas las filas, así como también se dañan las CCI (esta muerte celular se llega a ver de forma evidente incluso con objetivo de 4x). La espira media aparece completamente intacta conservando su morfología normal, y sin embargo la porción

basal también se afecta especialmente, perdiéndose CCE y apareciendo un aplastamiento celular (FIGURA 43).

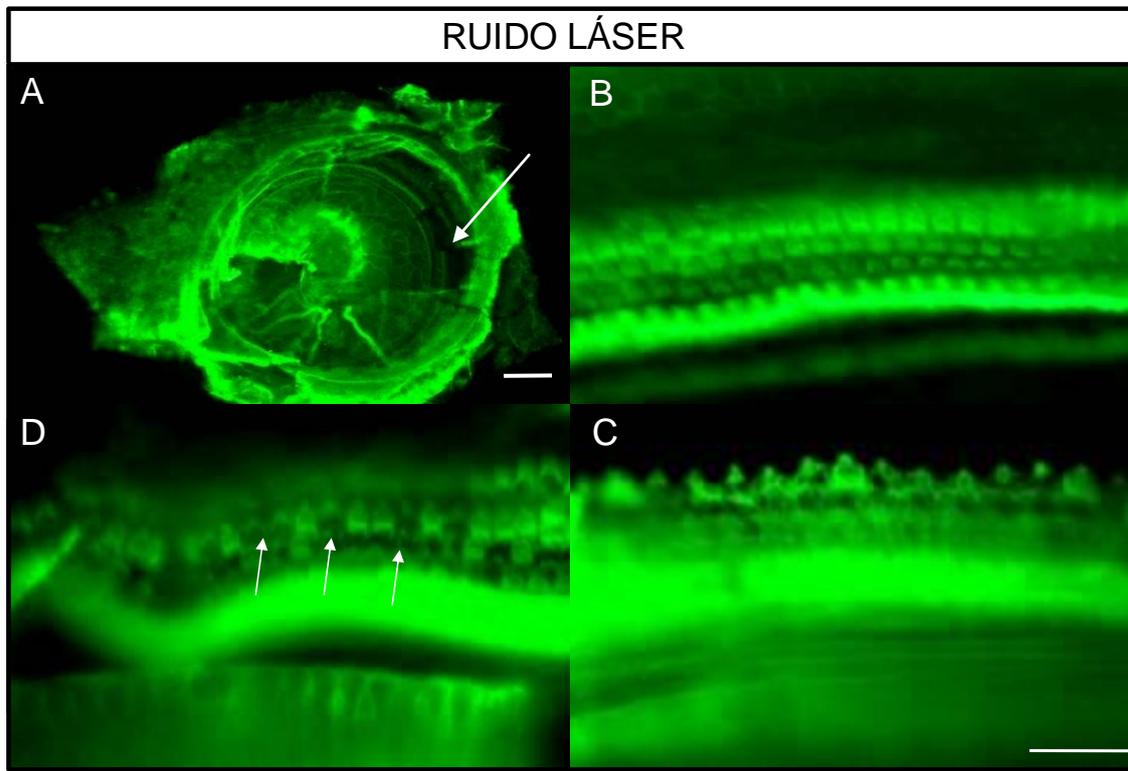


Figura 43. Morfología de las CC del grupo de ruido "láser". A: Imagen de la espira apical y media con el objetivo de 4x), donde se aprecia una pérdida de densidad celular en la región más distal del ápex (flecha). B: Visión de las CC en la espira media que se ve como conservan su morfología normal. C y D: imagen representativa de la pérdida y desestructuración de las CC (flechas) en el ápex (C) y el base (D). Barra de escala: A: 500 μ m; B, C y D: 100 μ m.

En el grupo de ruido a 120 dB SPL, el daño por la exposición a ruido empieza a ser evidente desde la espira apical sobre las CCE de forma parcheada, pero se mantienen las CCI; sin embargo, en la espira media se afectan por igual CCE y CCI. Se encuentra en la base una pérdida absoluta de las CCE conservándose en ocasiones el soma de las CCI, también se puede dañar la membrana basilar como si se hubiese arrasado el OC y se pueden ver únicamente las neuronas del ganglio espiral (FIGURA 44).

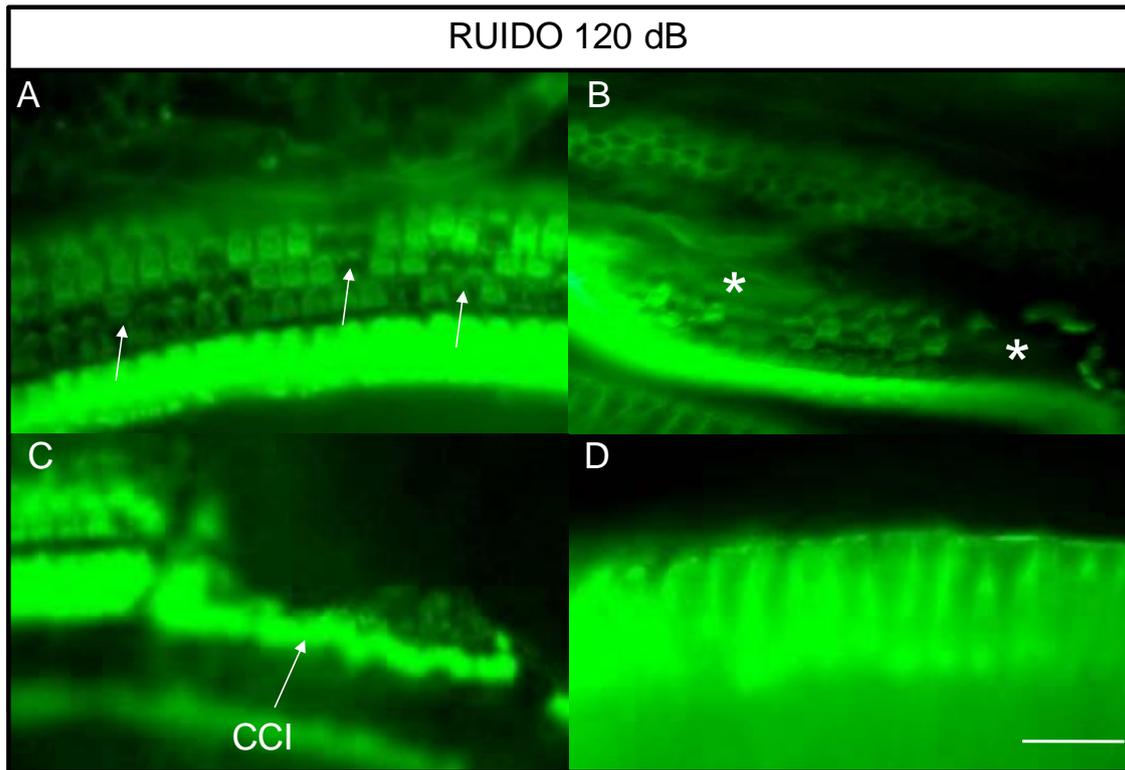


Figura 44. Morfología de las CC del grupo de ruido 120 dB SPL. A: Imagen representativa de la citoarquitectura de las CC en la región media de la cóclea, donde se objetiva una pérdida de CC a lo largo de las tres filas celulares (flechas). B: Imagen representativa del daño generalizado y desestructuración de las CC en la espira basal (*). C: Visión del daño celular afectando a toda las CCE y la pérdida de los cilios de las CCI. D: Imagen representativa de los sectores más distales de la base de la cóclea se aprecia un barrido de todo el epitelio sensorial del OC e incluso la membrana basilar. Barra de escala: A, B, C y D: 100 μ m.

También, se evalúa el comportamiento de los núcleos y los cilios de las CC mediante la tinción de DAPI, sin encontrar grandes diferencias respecto a la tinción de faloidina (FIGURA 45).

- En el grupo control se encuentran distribuidos los núcleos en 3 filas en las CCE y una fila de CCI, al igual que cuando estudiábamos los cilios.
- En el grupo de ruido de 105 dB SPL, cuando aparecen interrupciones bruscas, vemos una pérdida de los núcleos de las CCE y sí se conservan los núcleos de las CCI.
- En el grupo de ruido “láser”, como se ha comentado el daño es selectivo y se ve una disrupción apical, tanto de los núcleos de las CCE como de las CCI, que se vuelven a distribuir de una forma normal en la espira media.

- En el grupo de ruido de 120 dB SPL se confirma que, a pesar de ver una menor captación en los cilios de CCE y en la membrana citoplasmática, no se encuentra una integridad en sus somas, que, por el contrario sí se pueden ver en las CCI aunque hayan perdido sus cilios

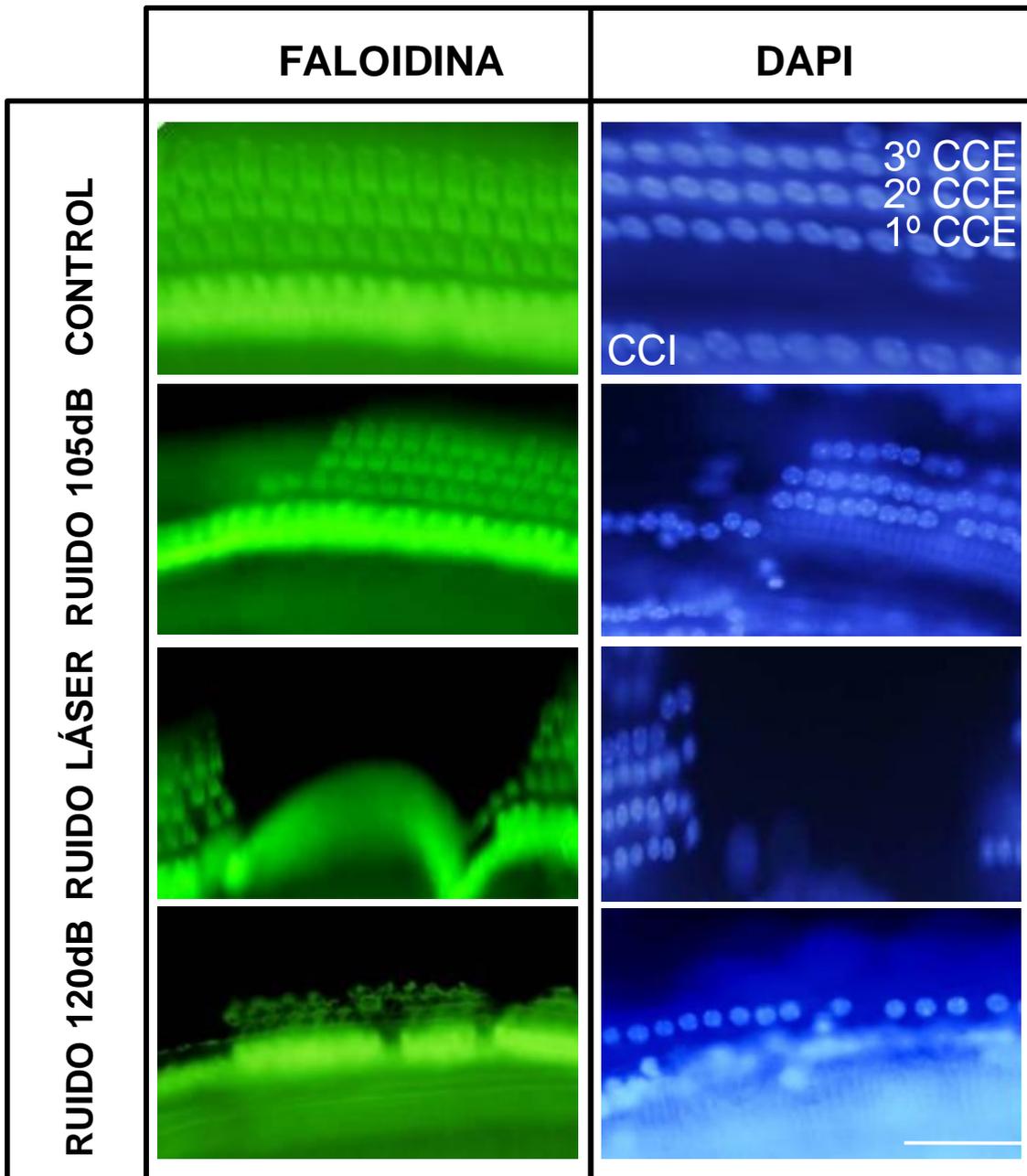


Figura 45. Correlación del comportamiento de las CC con la tinción de faloidina y DAPI en los diferentes grupos experimentales. En el grupo de ruido 105 dB se aprecia el daño secuencial en las CCE. En el grupo de ruido “láser” se aprecia una pérdida selectiva de las CC en la región apical y la conservación de la citoarquitectura del OC en la espira media. En el grupo de ruido de 120 dB existe una pérdida más generalizada de las CCE siendo ésta más llamativa en la base de la cóclea.. Barra de escala: 100 μ m.

4.4. ESTUDIO COCLEOGRÁFICO

Se representan gráficamente los datos resultantes del recuento celular con las medias de la densidad de CC para cada sector y su error estándar, tanto en el grupo control como en los expuestos a ruido. Cada sector medido corresponde a un porcentaje del 5% de distancia desde el ápex hacia la base.

En el grupo control, se puede observar que se mantiene una densidad homogénea de CCI a lo largo de toda la longitud de la membrana basilar incluida la zona más extrema de la base. La distribución de las CCE también es homogénea. No se encontraron diferencias al comparar ambos oídos. El cocleograma del grupo control se obtiene representando la media de las densidades celulares respecto a su posición (n=6). Las densidades medias en el oído derecho (CCI: 4.10, CCE: 12.12, RATIO E/I: 2,91) y en el oído izquierdo (CCI: 4.10, CCE: 12.12, RATIO E/I: 2,91) no muestran diferencias significativas. El *ratio* entre CCE y CCI es muy similar al *ratio* fisiológico esperado (3:1) (FIGURA 46).

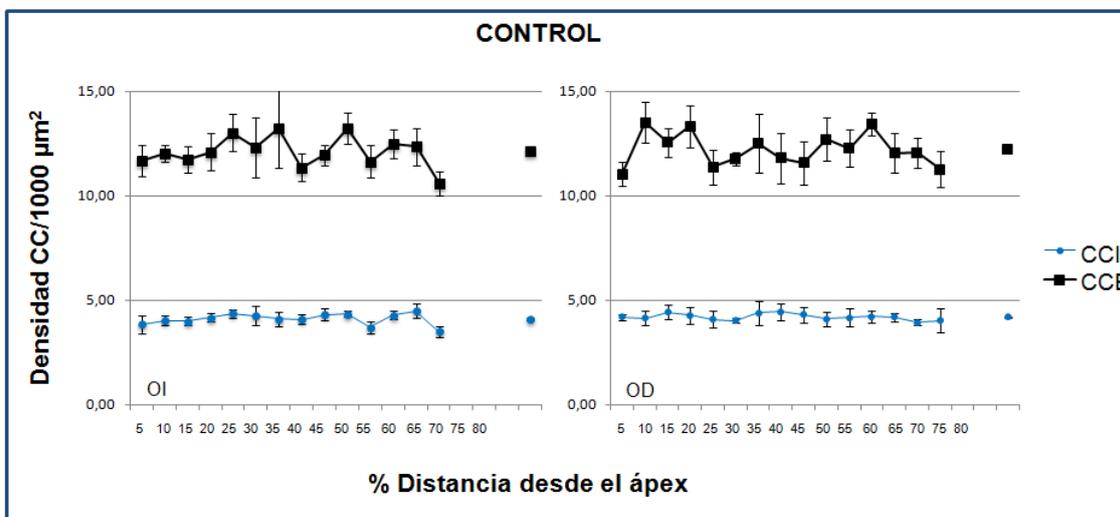


Figura 46. Cocleograma del grupo control, representación de la densidad media de las CCE y CCI en los sectores de la cóclea en el oído izquierdo (OI) y oído derecho (OD).

En el grupo de ruido a 105 dB SPL, se aprecia una pérdida llamativa de las CCE desde el ápex hasta la base, que se hace más evidente a partir de los sectores finales de la base. La densidad de las CCI se conserva, aunque se llega a afectar la región más distal de la base de la cóclea. El cocleograma se obtiene con la media de las densidades celulares de 6 ratones pertenecientes a este grupo. Las densidades medias en el oído derecho fueron (CCI: 3,93, CCE:

8,40, RATIO E/I: 2,14) y en el oído izquierdo (CCI: 4.08, CCE: 8,66, RATIO E/I: 2,11). Se aprecia una disminución del *ratio* E/I que se debe sobre todo a la disminución de la población de CCE (FIGURA 47).

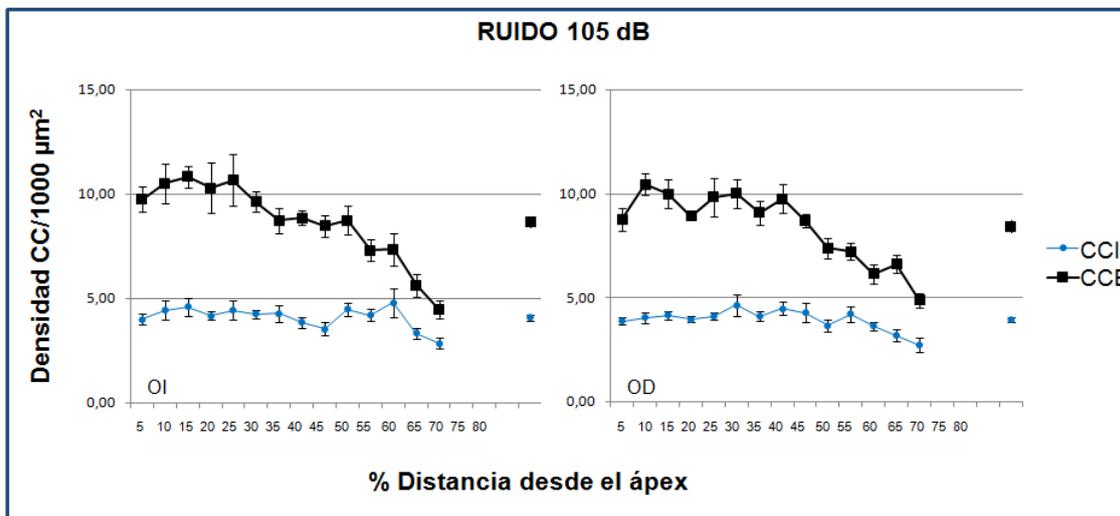


Figura 47. Cocleograma del grupo de ruido a 105 dB SPL, representación de la densidad media de las CCE y CCI en los sectores de la cóclea en OI y OD.

En el grupo de ruido “láser” llama la atención la forma bimodal que adquiere el cocleograma, y se observa una pérdida de las CCE en la porción final del ápex (sectores 25-30%), coincidiendo con las frecuencias de 8-12 kHz, así como también observamos un descenso de las CCI. Sin embargo, se observa que el daño tras la exposición al ruido no afecta a los sectores de la espira media ya que presentan una densidad celular similar a la de los sujetos control. También se aprecia una disminución, aunque menos pronunciada, de las CCE en la base, y las CCI se conservan intactas. El cocleograma se obtiene con la media de las densidades celulares de 6 ratones pertenecientes a este grupo. Las densidades medias fueron las siguientes, en el oído derecho (CCI: 3,96, CCE: 10,25, RATIO E/I: 2,5) y en el oído izquierdo (CCI: 4.06, CCE: 10,01, RATIO E/I: 2,43). Se aprecia un *ratio* E/I algo menor que en el grupo control, pero la pérdida de las CCE no es tan generalizada como en el grupo de animales expuestos a 105 dB SPL (FIGURA 48).

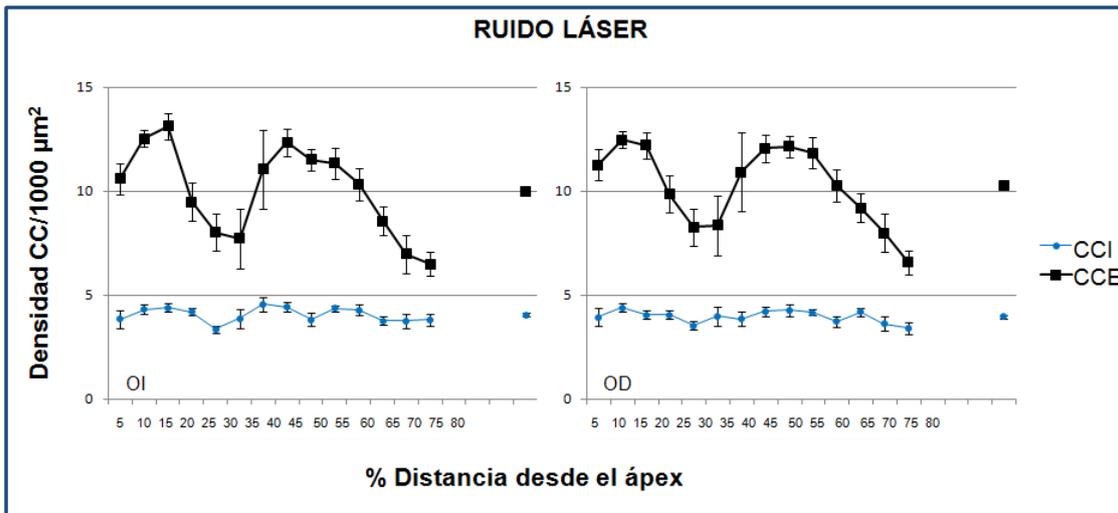


Figura 48. Cocleograma del grupo de ruido “láser”, representación de la densidad media de las CCE y CCI en los sectores de la cóclea en OI y OD.

Por último, en el grupo de ruido 120 dB SPL, existe una pérdida de las CCE mucho más marcada que en ninguno de los grupos anteriores. Las CCE solo se conservan en la región apical y después se produce una caída brusca desde la espira media hasta la base, donde no se llega a encontrar CCE, e incluso se puede llegar a cruzar con la densidad de las CCI. Las CCI se mantienen hasta el sector 55% para caer posteriormente las zonas más basales. El cocleograma se obtiene con la media de las densidades celulares de 4 ratones pertenecientes a este grupo. Se refleja una disminución de las densidades medias obtenidas en el oído derecho (CCI: 2,66, CCE: 5,52, RATIO E/I: 2,07) y en el oído izquierdo (CCI: 2,57, CCE: 5,54, RATIO E/I: 2,19). Se aprecia un descenso llamativo casi a la mitad de la población celular en ambas CC (FIGURA 49).

Cuando estudiamos las densidades de CCE y CCI comparando todos los grupos del estudio a la vez, se pone de relieve que el grupo que menos densidad celular presenta es el grupo de ruido a 120 dB SPL, seguido de ruido a 105 dB SPL, ruido “láser” y por último el grupo control (FIGURA 50).

Se puede observar como el grupo control sin ruido mantiene a lo largo de todos los sectores en los que se divide la membrana basilar, un número de células superior al del resto

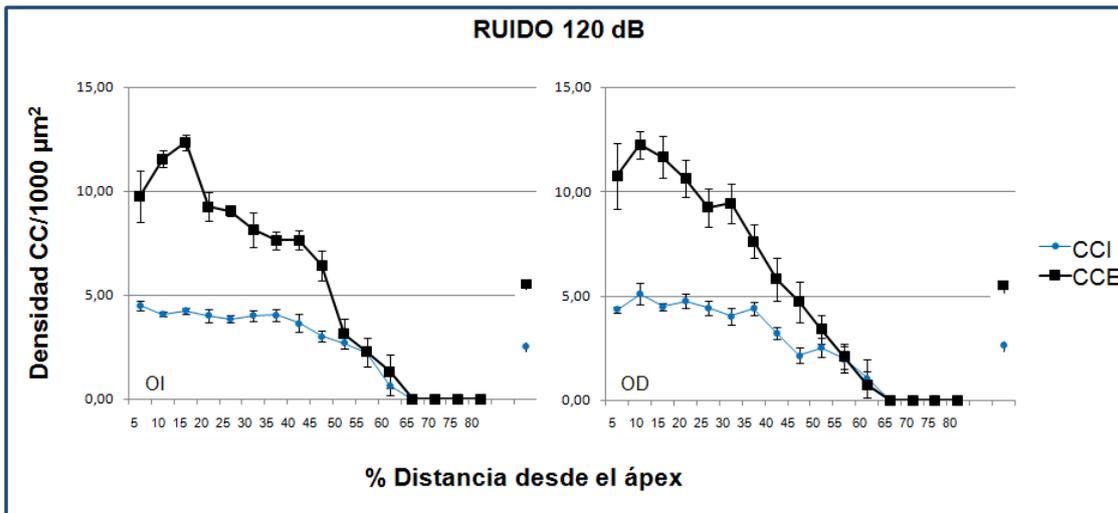


Figura 49. Cocleograma del grupo de ruido a 120 dB SPL, representación de la densidad media de las CCE y CCI en los sectores de la cóclea en OI y OD. Llama la atención la llamativa pérdida de CCE y CCI a partir del sector 60% OC conservando restos de CC en el ápex.

de los grupos. También se aprecia que los grupos ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL presentan un comportamiento similar siendo más evidente en el grupo ruido 120 dB SPL), con pérdida de células en todos los sectores pero especialmente en los correspondientes a las frecuencias altas. Finalmente, el grupo de ruido “láser” presenta un llamativo descenso en el número de CC entre los sectores 4 -6 (20-30%), correspondientes a frecuencias en torno a los 10 kHz, siendo más llamativo en las CCE.

En el grupo control, las CCE presentan una densidad superior al resto de grupos a lo largo de todos los sectores de la cóclea, seguido en este orden de los ruido “láser”, ruido 105 dB SPL y ruido 120 dB SPL; éste último muestra una caída marcada de la densidad a partir del sector 8 (40%).

La densidad de CCI en el grupo de ruido 120 dB SPL es inferior a la observada en los otros grupos experimentales, incluido el control, y especialmente a partir del sector 8, es decir en las regiones media y basal. Los grupos de ruido 105 dB SPL y ruido “láser” se comportan de manera similar al control, aunque el grupo “láser” presenta un escotoma centrado en el sector 5, indicando una menor densidad celular en este sector concreto.

RESULTADOS

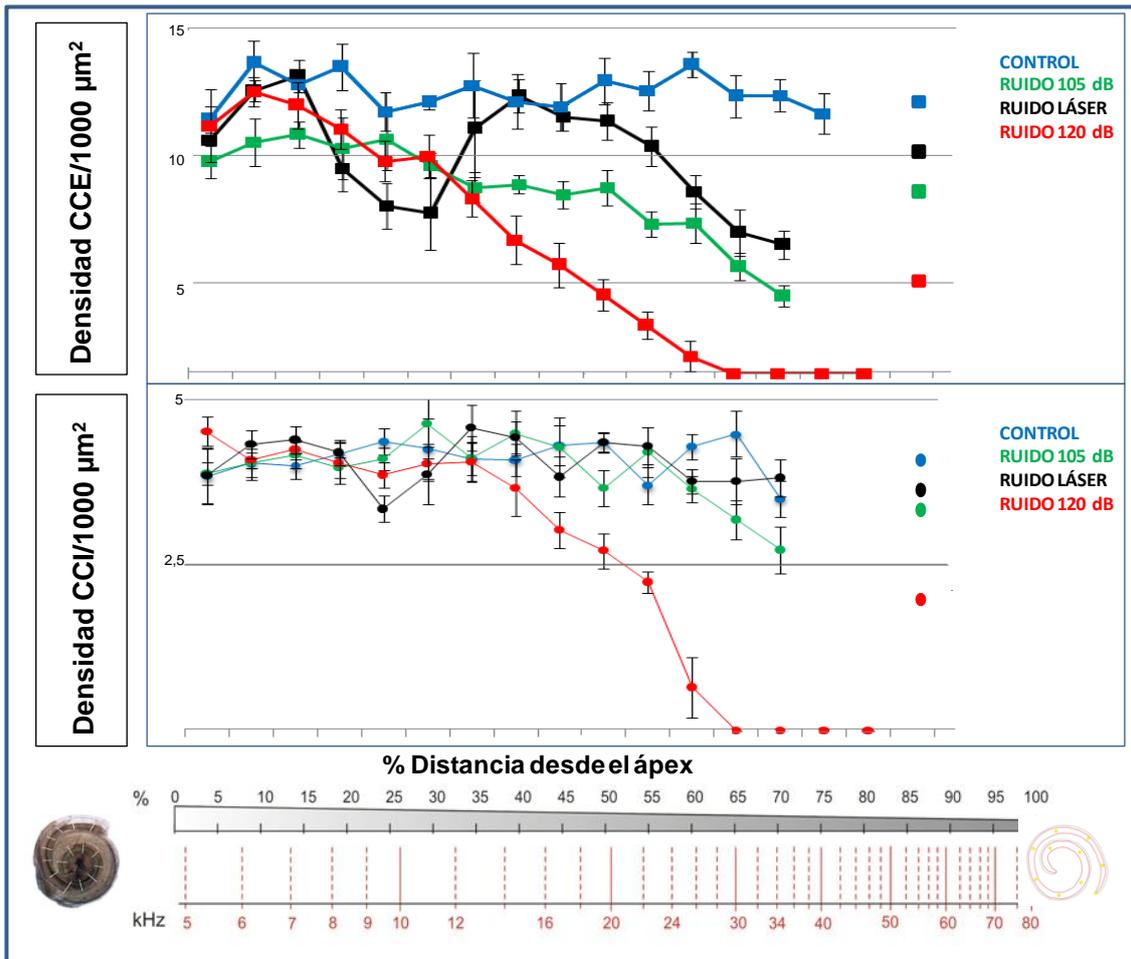


Figura 50. Representación de la densidad de CCE y CCI por sector, en los diferentes grupos experimentales. Se aprecia como las CC se mantienen de forma homogénea en el grupo control en comparación con el grupo de ruido 105 dB se aprecia una menor densidad celular. Cabe resaltar que en el grupo ruido “láser” existe de forma llamativa una disminución de las CC en el ruido “láser” en el sector 25-30% tanto en las CCE como en CCI. En el grupo de ruido a 120 dB SPL existe una caída marcada de la densidad a partir del sector del 40% hasta la región más basal de la cóclea.

Para poder realizar las comparaciones estadísticas, en cuanto a la afectación de la densidad de las CC, se han agrupado los sectores en tres regiones: apical (sectores 5-25%), media (sectores 30-55%) y basal (sectores 60-80%). Se encuentra un patrón de distribución en las CCE en el cual se encuentran más concentradas en orden decreciente desde la media, al ápex y la base. Este patrón es similar en el grupo de ruido láser y ruido a 105 dB SPL pero con menor densidad celular respectivamente, que en el grupo control. El grupo de ruido a 120 dB SPL presenta un patrón de distribución de densidad algo distinto y se comporta como una recta descendente.

RESULTADOS

El estudio estadístico de los datos de CCE revela que existen diferencias entre los cuatro grupos, comparados uno a uno. El grupo control sin ruido, presenta una densidad de CCE superior al resto mientras que la densidad más baja es para el grupo de ruido de 120 dB SPL. Analizando el comportamiento de cada grupo por regiones, se observa que en la región apical los tres grupos expuestos a ruido presentan una densidad de CCE muy similar, sin diferencias significativas entre ellos pero inferiores a la del grupo control. En la región media se aprecian diferencias entre todos y cada uno de los grupos, siguiendo una gradación de densidad de CCE: grupo control > ruido "láser" > ruido 105 dB SPL > ruido 120 dB SPL (FIGURA 51).

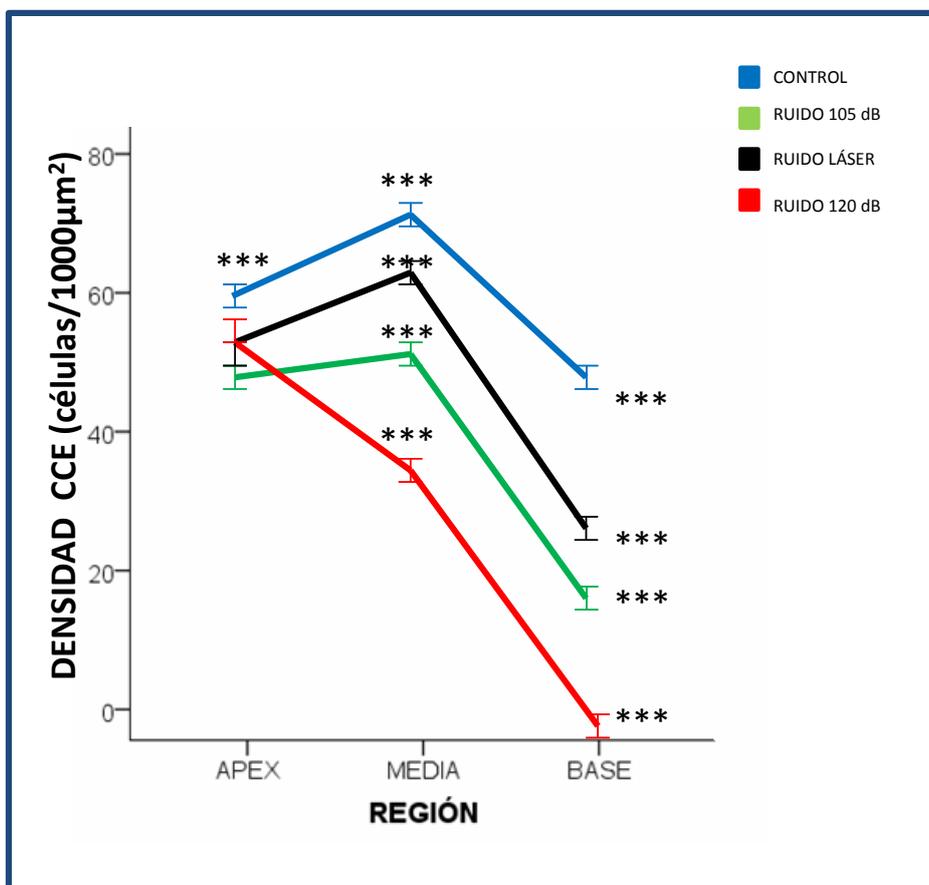


Figura 51. Densidad de CCE por región (ápex, media, base) en los diferentes grupos experimentales. En el ápex se encuentran diferencias significativas únicamente entre el grupo control y el resto de grupos expuestos a ruido. En la espira media y basal existen diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los grupos (***, $p=0,000$).

El análisis estadístico indica que el comportamiento del grupo de ruido 120 dB SPL es significativamente distinto al de los otros tres ($p=0,000$), con una menor densidad de CCE, especialmente en las regiones media y basal. Estudiando las diferencias entre grupos por región, se ve que en la región apical la densidad de CCE es similar en los cuatro grupos

RESULTADOS

experimentales, sin diferencias significativas entre ellos. En las regiones media y basal, el grupo expuesto al ruido de mayor intensidad, presenta una pérdida de densidad significativamente mayor ($p=0.000$) que los otros tres grupos. Esto indicaría que a altas intensidades se produce una pérdida celular irreversible, más severa cuanto más próximo a la base coclear. En la región media no hay diferencias estadísticas entre los grupos expuestos a ruido de menor intensidad (ruido 105 dB SPL y ruido “láser”), comparados con el grupo control. Sí que se encuentran diferencias en cambio en la región basal, donde los grupos ruido 105 dB SPL y “láser”, presentan una densidad inferior a la del grupo control, aunque las diferencias sólo son significativas para el grupo de ruido 105 dB SPL. Estos datos indican que la exposición a ruido produce una pérdida de densidad de CCI en las regiones media y basal, más severa cuanto mayor es la intensidad del ruido (FIGURA 52).

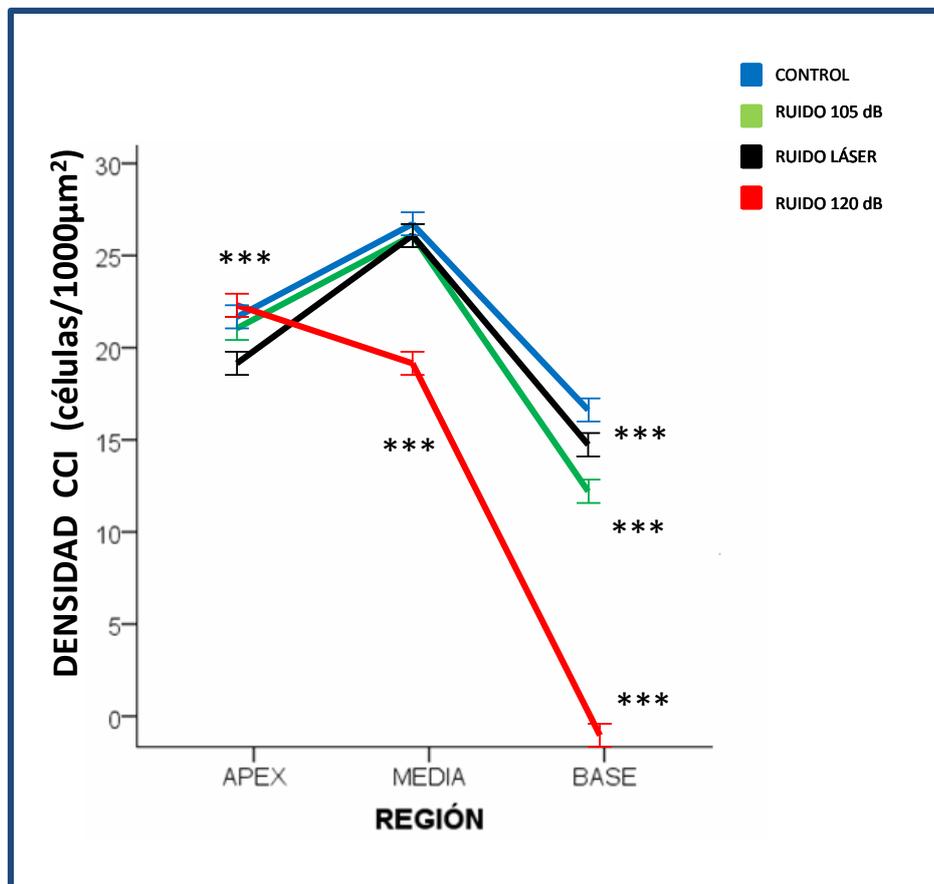


Figura 52. Densidad de CCI por región (ápex, media, base) en los diferentes grupos experimentales. Se encuentran diferencias en la región apical entre el grupo de ruido “láser” y el resto de los grupos (***, $p=0.000$). En la región media el comportamiento del grupo de ruido 120 dB SPL es significativamente distinto al de los otros tres grupos (***, $p=0.000$), con una menor densidad de CCI. En la región basal se aprecian diferencias entre el grupo de ruido a 120 dB SPL respecto los otros tres grupos, y el grupo de ruido 105 dB SPL vs control y ruido “láser” (***, $p=0.000$).

Podemos concluir que el grupo expuesto a ruido de 120 dB SPL es el más dañado, seguido del grupo de 105 dB SPL que lesiona más que el ruido láser en las regiones media y basal, manteniéndose la gradación encontrada en las CCE.

Si estudiamos de forma más selectiva el comportamiento de 3 sectores individuales, representativos de cada una de las espiras cocleares, y centrándonos únicamente en el sector 25%, 50% y 75%, encontramos los siguientes resultados (FIGURA 53): existen unas diferencias más marcadas en la densidad de las CCE de la región apical sobre todo en el grupo de ruido láser, ya que el sector 25% es precisamente el área dañada, junto con el sector 30%, que se corresponde con la frecuencias comprendidas de 9-13 kHz, y sin embargo vuelven a ascender en la región media por encima del grupo de ruido de 105 dB SPL. Lo mismo sucede en las CCI. En conclusión, estos datos podrían indicar el daño selectivo en este sector con pérdida de su frecuencia correspondiente. Cabe resaltar que en el sector 75% del grupo de ruido de 120 dB SPL no se encuentran CC en ningún animal.

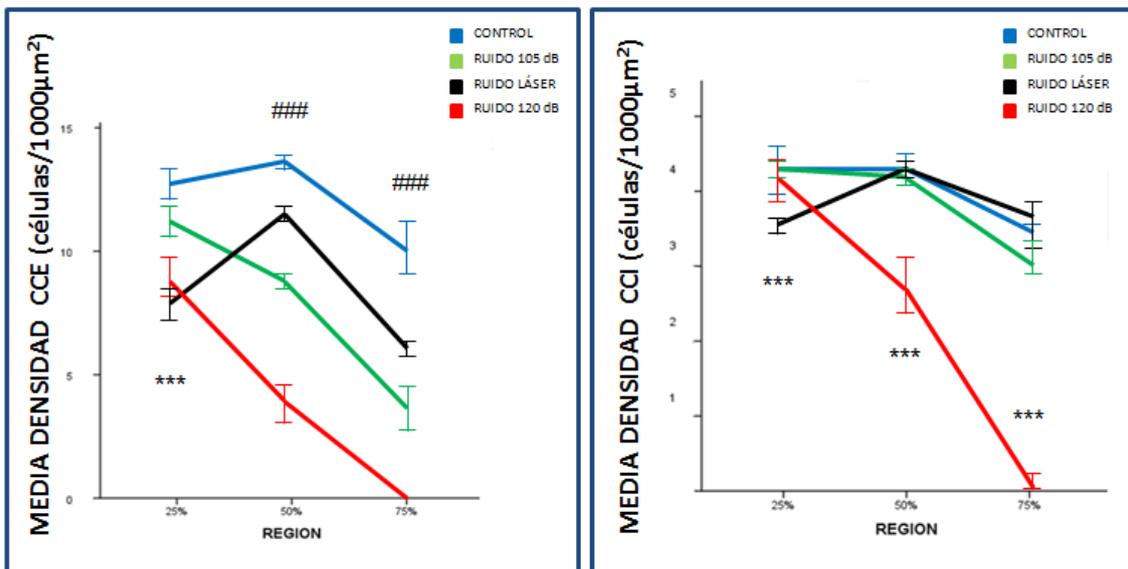


Figura 53. Densidad media de CCE y CCI por sectores (25%, 50%, 75%) en los diferentes grupos experimentales. Existen unas diferencias estadísticamente significativas en la densidad de las CCE y CCI en el sector 25% entre el grupo de ruido “láser” vs control y ruido láser vs ruido 105 dB SPL (***, p=0,001). La densidad media de las CCE en el sector 50 y 75% revela diferencias significativas al comparar los grupos entre si (###, p=0,000). Sin embargo, la densidad media de las CCI solo muestra diferencias entre el grupo de ruido 120 dB SPL y el resto de los grupos expuestos a ruido en los sectores 50% (***, p=0,000) y 75% (***, p=0,003).

Analizando la densidad promedio de CC en la región 25-30% (sectores 5 y 6) en el grupo expuesto al ruido “láser”, se observa que presenta menor densidad celular que el grupo de ruido de 105 dB SPL e incluso que el grupo de 120 dB SPL (FIGURA 54).

RESULTADOS

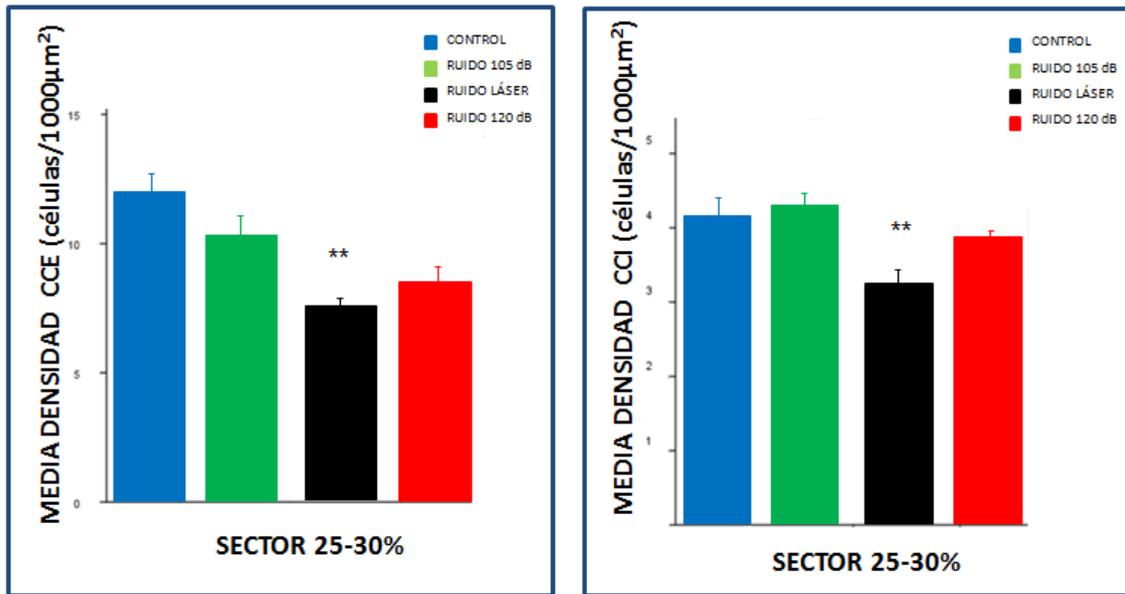


Figura 54. Densidad promedio de CCE y CCI en los sectores 25% -30 % en los diferentes grupos experimentales, donde se aprecia una menor densidad en el grupo de ruido "láser" (**, $p=0,031$)

5. DISCUSIÓN

5.1. MECANISMOS COCLEARES DE DAÑO Y MUERTE CELULAR INDUCIDOS POR RUIDO

5.1.1. Lesiones cocleares de daño celular

En la literatura están descritas alteraciones fisiopatológicas en el OC tras la exposición excesiva a ruido que se ocasionan por procesos cocleares de daño celular:

- Lesiones focales tonotópicas:

Son las manifestaciones ocasionadas por un daño mecánico sobre las CC. Se afectan las regiones específicas que corresponden al ancho de banda de las frecuencias que componen el ruido, y normalmente se encuentran una octava y media por encima y por debajo de su región tonotópica correspondiente (121). Las lesiones focales de daño tonotópico se corresponden con las áreas de la cóclea de máxima magnitud de vibración inducida por el ruido, afectando a los estereocilios de las CC y a las uniones tip links con las células de soporte (28,37). Wang et al, comprueban como ante sonidos que oscilan en un rango de intensidad de 110-116 dB SPL de 8 a 16 kHz, aparece un daño focal en la primera línea de CCE y células de soporte, que se correlaciona con los mapas de frecuencias de los citococleogramas (30). En nuestro estudio, la máxima representación de lesión focal tonotópica la encontramos en el grupo de ruido "láser" con rango frecuencial de 9 a 13 kHz en los sectores 25%-30%.

- Lesiones del extremo basal:

En la región más basal de la cóclea, conocida como *hook* aparece un daño que no mantiene una relación matemática con la intensidad del ruido; esto es debido a la generación de armónicos, la onda sonora se propaga y puede afectar a las regiones más basales. Sugiere un mecanismo de alta energía capaz de propagarse a lo largo de la membrana basilar, y puede ser potenciado por el propio CAE (122). Se sabe que ante el mismo agente ambiental, las células de la base son las que suelen dañarse más *in vivo*. Más aun, las CCE de la región basal cultivadas *in vitro* se mueren más rápidamente que las del ápex. Existe una línea basal o gradiente que no solo afecta a las CCE, sino que también puede afectar a las CCI cuanto mayor sea el daño producido en las CCE, especialmente en

la base (32,123). En nuestro estudio, en el grupo “láser” podemos ver un daño incisivo en las CC apicales centrado en el rango frecuencial de 9 a 13 kHz, así como una pérdida de CC en la región basal de la cóclea.

Un mecanismo que contribuye a la vulnerabilidad de la región basal es su proximidad a la ventana redonda. Esta proximidad disminuye en gran medida el volumen de la escala timpánica debilitando la capacidad de distribución en los espacios perilinfáticos, y así poder diluir rápidamente citotóxicos liberados por el epitelio sensorial ciliado, que puede tener efectos perjudiciales en las CC (30).

- Lesiones complementarias:

Las pérdida de fibrocitos, de células de soporte y la vacuolización del OC se consideran lesiones estructurales fisiopatológicas complementarias. Estas lesiones se deben a anomalías en la transducción y transmisión sináptica tras la exposición acústica. Se originan acúmulos excesivos de K^+ y aumento de la liberación de transmisores glutamatérgicos presentando efectos excitotóxicos. Estos efectos excitotóxicos por la acción sináptica del glutamato están relacionados especialmente con la formación de vacuolas en las CCI, la estría vascular y el ganglio espiral (74,124,125) (FIGURA 55).

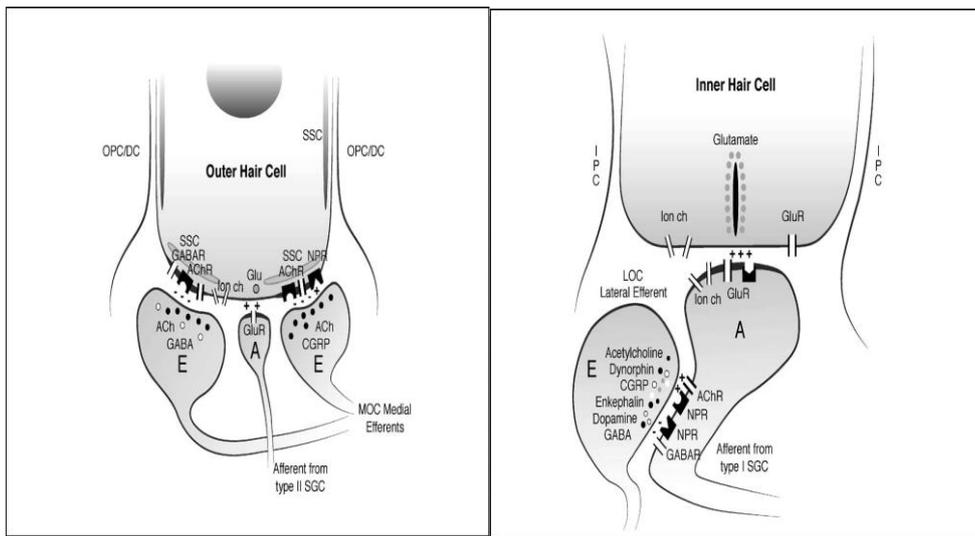


Figura 55. Importancia de la inervación glutamatérgica en la sinapsis de la CCE y CCI. Imagen disponible en: (125).

La pérdida de fibrocitos en el ligamento espiral aparece como otro mecanismo complementario de daño ya que causa un exceso de liberación de K^+ . Los fibrocitos tipo II y IV poseen unos canales $Na^+/K^+-ATPasa$ y un cotransportador $Na^+/K^+/Cl^-$, y es por ello

que son los que más se lesionan (30,125). En nuestro estudio, hemos encontrado una pérdida de fibrocitos en el limbo y en el ligamento espiral en los tres grupos sometidos a ruido, así como vacuolización en la estría vascular en el grupo de ruido de 120 dB SPL.

- *Rotura de la lámina reticular:*

En la literatura hay estudios que sugieren la rotura de la lámina induce *per se* daño en las CC, pero es un tema controvertido ya que en ocasiones se ha visto que la ruptura de esta lámina puede presentar efectos otoprotectores con la disminución del potencial endolinfático, disminuyendo la transducción y el efecto glutamatérgico (74,126). Sin embargo, esta rotura provoca una unión entre endolinfa y perilinfa reduciendo las concentraciones de Ca^{2+} y Na^+ , ocasionándose posteriormente una situación excitotóxica por un exceso de K^+ (30).

5.1.2. Procesos de muerte celular

Los dos procesos principales descritos que conducen a la muerte celular de las CC son la apoptosis y la necrosis. La apoptosis es un proceso activo y requiere de energía para que se inicien unas vías específicas de muerte controlada y programada en la célula (127). La necrosis celular es un mecanismo de muerte celular pasivo, no requiere energía y su resultado es la rotura del cuerpo celular. Durante la necrosis, el contenido celular se derrama en las células adyacentes desencadenando respuestas inflamatorias en cadena. Saunders et al, en 1985 asumieron que la necrosis era la causa principal de la muerte celular de las CC (128). En la literatura hay descritos otros mecanismos de muerte celular de las CC inducidos por ruido como las oncosis (edema y aumento de la presión osmótica celular que con lleva una dilatación citoplasmática y posteriormente a la muerte celular) y la ruptura de la membrana plasmática (34,126,129).

La apoptosis puede ser inducida al menos por dos vías: la *vía extrínseca*, se activa a través de receptores de muerte que residen en la membrana plasmática, se produce la unión de un ligando a su receptor muerte provocando la activación de la caspasa 8 que es entonces capaz de activar las caspasas efectoras, como la caspasa 3 y caspasa 7; y la *vía intrínseca*, que se activa desde el interior de la célula. Estímulos tales como daño al ADN, el estrés oxidativo y la irradiación causan un daño mitocondrial que induce cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Cambios que conllevan la liberación de varios factores pro-

apoptóticos en el citosol que desencadenan y amplifican la cascada apoptótica. A su vez existe una liberación de EndoG endonucleasa y factor inductor de apoptosis (AIF) que produce una apoptosis independiente de caspasas. Por otro lado, la liberación de citocromo c conduce a la oligomerización del factor activador de la apoptosis proteasa 1 (Apaf-1) provocando la formación del apoptosoma. Esta estructura activa la caspasa iniciadora 9, que a su vez activa las caspasas efectoras como la caspasa 3 y caspasa 7. Mientras tanto, Smac/DIABLO y complejos HtrA2/Omi contrarrestan los efectos inhibitorios del inhibidor de moléculas de apoptosis (IAP) aumentando con ello la activación de la cascada apoptótica (FIGURA 56).

En la muerte celular por apoptosis se aprecian condensaciones nucleares en las CC y se han descrito en cobayas, chinchillas y ratas después de la exposición al ruido (130-133). La tinción de estas condensaciones mediante la técnica de TUNEL confirmó las observaciones iniciales, indicando que la apoptosis es probablemente la ruta de muerte celular más importante en las CC sensoriales en respuesta a la exposición al ruido (134), así como la activación de la cascada de caspasas en las CCE (130,135).

Se estima que un ruido de 105 dB SPL parece favorecer la necrosis, mientras que un ruido mucho más intenso (120 dB SPL) parece favorecer la apoptosis (130,131). Si extrapoláramos estos datos a nuestro estudio, el daño celular en los animales del grupo de ruido a 120 dB SPL se debería a apoptosis, y en el caso del grupo de 105 dB SPL y ruido “láser” sería por necrosis. En algunas secciones se aprecian condensaciones nucleares con la tinción de DAPI, pero para poder confirmar estos hallazgos tendríamos que haber realizado una tinción de TUNEL.

Otro factor importante a tener en cuenta es el intervalo de tiempo entre la exposición al ruido y el análisis morfológico. Las CCE comienzan a morir de inmediato tras el daño acústico y continúan haciéndolo hasta por lo menos 30 días después (136,137). La apoptosis es el principal mecanismo celular de muerte y extensión del daño inmediatamente después de la lesión. Sin embargo, 4 días después de la lesión, los eventos apoptóticos comienzan a disminuir, y alrededor del día 30 los mecanismos de necrosis y apoptosis contribuyen igualmente a la muerte celular aún en curso (137).

Hay estudios que han demostrado la liberación de AIF y EndoG en el citosol de mitocondrias de CC tras la exposición a ruido (138), y la activación de JNK como mediador de apoptosis en CCE (139,140). Todas estas moléculas permiten la transcripción en el núcleo de varios genes inductores de apoptosis (AIG).

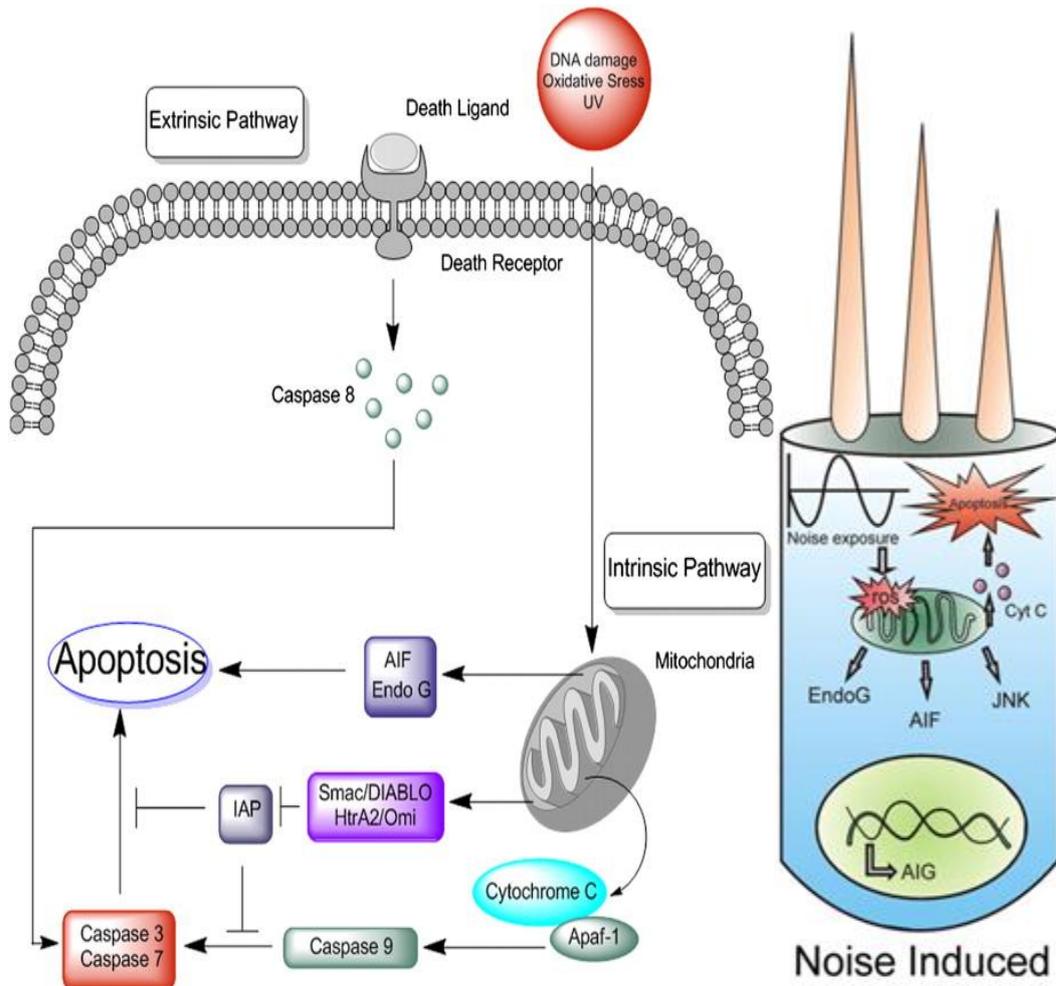


Figura 56. Esquema representativo de las diferentes vías apoptóticas de muerte celular. Imagen adaptada de Op de Beeck et al, 2011 (42).

5.2. EFECTOS DEL RUIDO EN LA FUNCIÓN AUDITIVA

Los roedores son animales ampliamente utilizados en investigación para generar modelos de daño por ruido y explorar nuevas aproximaciones terapéuticas. Para ello es fundamental tener en consideración el rango de frecuencias a las que oyen estas especies cuando van a ser sometidas a una estimulación por ruido.

Al diseñar los modelos de ruido se pueden utilizar ruidos continuos o discontinuos, según se produzcan variaciones en frecuencia y en intensidad a lo largo del tiempo. En nuestro estudio hemos utilizado un ruido discontinuo senoidal dentro del espectro de los ultrasonidos, llamado “*swept sine violeta*” (SSV). Al comparar el daño de exposición producido por diferentes tipos de sonido, podemos ver que los ruidos discontinuos son más lesivos que los ruidos constantes, como sería el caso de un ruido blanco enriquecido en frecuencias altas, que

hemos denominado “violeta” (V) (TABLA 9). Se aprecia que los ruidos de intensidades superiores a 100 dB SPL producen un daño auditivo más notable, incluso con tiempos de exposición reducidos, pudiendo llegar a ser el daño irreversible cuando la intensidad supera los 120 dB SPL (141). Estos datos concuerdan con los encontrados en nuestro estudio

Tabla 9. Comparación auditiva de diferentes tipos de ruido: Efectos en los umbrales auditivos de diferentes estirpes animales sometidas a ruido *swept sine* violeta y violeta a distintos umbrales y tiempos de exposición. Manuscrito en preparación Sanz et al y Murillo-Cuesta et al (Ver Anexo)

TIPO RUIDO	DURACION (minutos)	INTENSIDAD (dB SPL)	ESTIRPE	TTS (dB SPL)	PTS (dB SPL)
SSV	30	120	C57BL/6	50	40
SSV	30	110	CBA/CaJ	50	40
SSV	30	100	C57BL/6	25	10
SSV	60	100	CBA/CaJ	30	0
V	30	120	C57BL/6	50	40
V	30	100	C57BL/6	10	0

La pérdida auditiva inducida por ruido se caracteriza por la pérdida auditiva temporal o permanente tras la exposición a sonidos de alta intensidad, y sus efectos dependen de los parámetros físicos del ruido (70). Durante las primeras dos semanas los desplazamientos de los umbrales auditivos pueden ser transitorios y reversibles “*temporal threshold shift*” (TTS), mientras que una vez transcurrido un mes desde la lesión, la elevación del umbral auditivo es permanente “*permanent threshold shift*” (PTS). En este estudio hemos observado que los grupos de ruido de 105 dB SPL y ruido “láser” llegan a recuperar sus umbrales, aunque en el momento PR2d y PR14d sus TTS estuvieran elevados; sin embargo, en el grupo de ruido de 120 dB SPL tanto el TTS (PR2d-14d) como el PTS (PR28d) se encuentran elevados. Este efecto lo hemos visto también en cada uno de los tonos puros evaluados y se observa que los umbrales auditivos no empeoran en el mismo grado dependiendo del tipo de ruido administrado. Chen et al., aprecian un aumento de los umbrales alrededor de 60 dB al exponer a ratones a un ruido de 106 dB SPL comprendido entre 20 Hz- 20 kHz (29).

Se estima que siempre que se supere una intensidad de ruido por encima de los 110 dB SPL, aparecen pérdidas del 90 al 100% de las CCE, especialmente en la base (142). Hamernik et al, estudiaron la correlación que había entre los desplazamientos de umbral y la pérdida de CCE en 95 chinchillas expuestas a ruido. Se emitieron tonos puros de frecuencias entre 0,5, 1,

2, 4 y 8 kHz, presentando un ruido de banda estrecha a diferentes intensidades: 109, 115, 121 y 127 dB SPL. La duración de la exposición fue de 24 h/día durante 5 días ó 6 h/ día durante 20 días. Encontraron una correlación baja entre el PTS (< 25 dB SPL) después de la exposición a ruido durante 5 días, y alta entre TTS y PTS en el grupo expuesto a ruido durante 20 días. Sólo con el ruido de intensidades 121 y 127 dB SPL se vio una correlación alta entre el PTS y la pérdida de CCE (136).

Harding et al, compararon los desplazamientos del umbral auditivo de los ABR con el daño histopatológico de las CC en chinchillas, utilizando un ruido de 108 dB SPL centrado en 4 kHz durante 1-1,75 h y otro de 80-86 dB SPL a la misma frecuencia durante todo un día (133). Encontraron una relación con el desplazamiento del TS con la pérdida de CC y de fibras nerviosas. Los animales expuestos a ruido de 108 dB presentaban una elevación del PTS de 20-40 dB al final del ensayo y se correlacionaba con una pérdida focal de 70-100 % de las CCE. Sin embargo, los animales expuestos a ruido de 86 dB no presentaron lesiones focales en las CCE, sino un daño más generalizado en las CCE, y no se correlacionaba con el TTS ni con DPOAEs (143,144). Este estudio, reflejaba un daño inciso con lesiones focales al utilizar un ruido de 108 dB centrado en 4 kHz, que se asemejaría a lo ocurrido en el grupo de ruido “láser”.

Los niveles de TTS y PTS generalmente aumentan con el incremento intensidad sonora de dB SPL, y la recuperación de los umbrales es peor en función del aumento de la intensidad sonora acústica de la exposición (64). Estos datos concuerdan con lo encontrado en nuestro estudio, el grupo de ruido a 105 dB SPL y el ruido “láser” presentan unos umbrales de recuperación en los PR28d mejores que el grupo de ruido a 120 dB SPL.

En los grupos de ruido estudiados, la evolución de las latencias y las latencias IPL es similar. La latencia del pico I disminuye y se mantiene en el tiempo tras la exposición a ruido repercutiendo también en las latencias del resto de los picos medidos (II y IV) y en la latencia IPL I-II. Los resultados obtenidos parecen apuntar a que el daño por ruido lleva asociado un retraso diferencial en el tiempo de conducción central que puede ser debido a una aceleración en la velocidad de transmisión del impulso nervioso por parte de los receptores periféricos hacia el núcleo coclear de la vía auditiva, en contraste con el impacto que provoca el ruido en la supervivencia de las CC. En la literatura hay cierta controversia ya que también se ha documentado aumento en las latencias tras la exposición a ruido, pero en otros casos no se han visto cambios en este parámetro (75,145-147)

El hallazgo encontrado en las latencias también se podría deber a un fenómeno de “reclutamiento coclear”. El reclutamiento es una manifestación de la lesión del OC que ocurre en la NIHL. Consiste en la distorsión en la sensación de intensidad del sonido, que se presenta como una mayor sensación de sonoridad, percibiendo pequeñas diferencias de intensidad y alcanzando umbrales auditivos de discomfort a menor intensidad que en sujetos con normoacusia (148,149). Se produce por lo tanto un acortamiento del campo auditivo, que es el rango de intensidades comprendidas entre el umbral auditivo y el nivel de audición dolorosa. Existen varias teorías sobre el origen del reclutamiento y todas ellas se centran en las CC. La diferencia de función entre las CCI y CCE es la más aceptada para explicar el reclutamiento, en donde las CCI solo intervendrían ante estimulaciones de alta intensidad (a partir de 60 ó 80 dB). El reclutamiento estaría asociado a la lesión de las CCE, provocando hipoacusia ante estímulos de baja intensidad, y se produce retorno de la sensación de sonoridad normal al alcanzar el estímulo a altas intensidades gracias a la acción de las CCI que quedan intactas.

Ruggero et al, en 1991 elaboró una hipótesis que se centra en la amplificación y un aumento de la velocidad de señal de las CCE a lo largo de la membrana basilar antes de que ocurra un daño sobre las CCE (123). Por ende, la lesión asociada de las CCI compromete la transducción coclear y disminuye el número de fibras nerviosas estimuladas. Estos datos concuerdan con el resultado de la disminución de las latencias (37,150), en el que existe una situación paradójica de hiperexcitabilidad en las fibras auditivas centrales. Se produce un incremento anormal en la respuesta a estímulos sonoros, siendo resultado de un fenómeno de reclutamiento. Se cree que este mecanismo es un método de plasticidad homeostática para equilibrar la actividad neuronal después de un daño coclear (151-156).

En nuestro estudio las amplitudes de los picos I y II disminuyen tras la exposición a ruido siguiendo un patrón similar que se mantiene en el tiempo. Los cambios en el ABR por exposición a ruido han sido asociados con un aumento temporal o permanente del umbral auditivo, y con un descenso de las amplitudes de los picos, relacionándose con el número de neuronas que son capaces de despolarizarse (145,150,157).

La utilización de las DPOAES se considera como un método de detección precoz de NIHL, ya que se ha visto que en pacientes que no han llegado a mostrar alteración en la audiometría tonal liminar sí pueden reflejar cambios cocleares subclínicos (110).

Nuestro trabajo muestra cómo el efecto del ruido parece empeorar la función de las CCE en los grupos de ruido, aumentando sus umbrales de respuesta en las DPOAES. Esta técnica ha sido históricamente empleada en clínica, y los estudios en diferentes cepas de ratones han mostrado un empeoramiento en esta respuesta tras la exposición a ruido (158-161). Hay estudios que correlacionan la respuesta de las DPOAES con la capacidad de recuperación de TTS y PTS (110,162,163).

La pérdida de CCE observada parecería coincidir con la falta de función causada por el ruido y la evaluada mediante los DPOAES. La evaluación de la respuesta de los DPOAES en el grupo de ruido "láser" se centró en el análisis de las frecuencias centrales de 8 y 10 kHz, para profundizar si también existía tonotopía como en los datos encontrados en el audiograma, pero no se encontraron resultados concluyentes.

5.3. IMPORTANCIA DEL IGF-1 EN LA FUNCIÓN AUDITIVA

El IGF-1 es un miembro de la familia de péptidos relacionados con la insulina que interviene en aspectos fundamentales del desarrollo del sistema nervioso, como son la proliferación, diferenciación y supervivencia. Se conoce que participa en el desarrollo específico del oído interno promoviendo la proliferación y supervivencia así como la diferenciación de precursores neurales del oído interno (94,99,164).

El IGF-1 es esencial para mantener la fisiología cerebral normal y promover la neurogénesis. Hay estudios que sugieren que en el oído interno adulto este factor actúa como un protector ótico cuyos niveles predicen la pérdida auditiva relacionada con la edad. En la cóclea adulta el IGF-I parece mantener la fisiología de la estría vascular y promover la supervivencia de las neuronas auditivas (106).

En nuestro experimento hemos podido hallar una disminución progresiva de los niveles de IGF-1 en suero y además, existe una correlación inversa de los mismos con los umbrales auditivos. Estos datos reflejarían que los niveles en suero de IGF-1 en ratones CBA que han sido expuestos a un ruido de gran intensidad, disminuyen sin poder llegar a ofrecer un mecanismo de otoprotección que facilite la supervivencia en las CC. Podríamos decir que el descenso en suero de IGF-1 es un marcador de daño celular en el oído interno.

Estos datos concuerdan con la evolución fisiológica de IGF-1 observada en otras estirpes de ratón como (MF1*129 sv) (106). Se ha demostrado que en ratones deficientes en IGF-1 se reduce el tamaño de la cóclea, del ganglio espiral, y también hay una disminución significativa en el número y tamaño de las neuronas auditivas. El déficit de IGF-1 produce un retraso general en la diferenciación de las células ganglionares de la cóclea durante el desarrollo postnatal (164,165).

Hay estudios que corroboran que las CC pueden entrar en una apoptosis inducida por el daño acústico. Existe una relación del IGF-1 al unirse con su receptor de membrana, capaz de mantener la supervivencia celular a través del papel regulador de fosfoinositol 3 quinasa, permitiendo la inhibición de la apoptosis (166). Con mayores niveles en suero de IGF-1 la pérdida de las CC se podría prevenir.

Desde un punto de vista experimental, existen estudios que valoran el potencial papel de protección del IGF-1 ante diferentes procesos ototóxicos (96). Iwai K. y colaboradores en 2006 aplicaron un hidrogel embebido en IGF-1 en la ventana redonda de ratas Sprague-Dawley que habían sido expuestas a un ruido blanco de 120 dB SPL durante 2 horas, y encontraron que el tratamiento local redujo significativamente la elevación de los umbrales de ABR en los días 7 y 30 después de la exposición al ruido (95). El análisis histológico reveló que el IGF-1 disminuía significativamente la pérdida de CCE (167). Utilizaron un test de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas para medir IGF-1, en cobayas expuestas a ruido tratadas con un hidrogel en la ventana redonda, para evaluar el comportamiento funcional e histológico y encontraron también una reducción significativa de la elevación de los umbrales de ABR, y mayor supervivencia de las CCE.

Li et al, en 2008 (168) estudiaron el efecto terapéutico del IGF-1 en cobayas con hipoacusia neurosensorial provocada por la administración de gentamicina, administrando 10 µl de IGF-1 directamente tras la fenestración de la escala timpánica. Comprobaron que se redujo significativamente el umbral de respuesta del ABR en relación con el grupo control. Mediante un microscopio electrónico de barrido se observó daño severo de las CC en el grupo control, mientras que en el grupo de tratamiento con IGF-1 se apreciaban microvellosidades en la superficie de las CC dañadas.

Centrándonos en estudios clínicos, cabe destacar el único experimento de administración de IGF-1 recombinante hecho en humanos (169). Se seleccionaron 25 pacientes con sordera

brusca refractaria a corticoides sistémicos a los que se les introdujo un hidrogel biodegradable con IGF-1 en la ventana redonda, y los resultados demostraron una recuperación de los umbrales auditivos (ganancia de 20 dB) a las 4 semanas después del tratamiento.

Por tanto, ponemos de relieve el papel neurotrófico del IGF-1 y su potencial valor terapéutico en la protección del oído interno, así como la importancia de la disminución de los niveles serológicos del IGF-1 como posible marcador pronóstico de daño celular inducido por ruido. Estos datos proporcionan una base para futuros estudios que confirmen este potencial y profundicen en el conocimiento de las acciones del IGF-1.

5.4. EFECTOS DEL RUIDO EN LA MORFOLOGÍA COCLEAR

Es importante destacar que la estirpe de ratones CBA es más resistente a los efectos nocivos del ruido que la estirpe C57, especialmente en la conservación de la citoarquitectura coclear así como en la preservación de restos auditivos. Pero pese a ello, el ruido es capaz de provocar lesiones en la morfología coclear de la estirpe CBA que suele afectar al OC y a la pared lateral de la cóclea. En la literatura hay estudios que manifiestan la homogeneidad de los ratones CBA, presentando menor variabilidad individual en la respuesta al daño acústico, lo que permite evaluar de forma más clara las lesiones ocasionadas por la exposición al ruido (30,122,170-172).

En el análisis de la morfología coclear, los animales del grupo control no muestran alteraciones significativas en las estructuras pertenecientes a la escala timpánica de las tres espiras de la cóclea (FIGURA 57).

Las estructuras cocleares más susceptibles al daño causado por el ruido son el ligamento espiral, el limbo espiral, las CC y la estría vascular (29,173,174).

Se ha reportado la pérdida de fibrocitos de tipo II y tipo IV en el ligamento espiral (FIGURA 58), así como la pérdida de fibrocitos en el limbo (32,173,175). Estos datos concuerdan con los hallados en nuestro estudio especialmente en el grupo de ruido a 120 dB SPL. Estas estructuras son piezas fundamentales en la circulación del K^+ desde la perilinfa a la endolinfa en el oído interno, y por tanto responsables de la formación del potencial endococlear que tiene su

reflejo en la sensibilidad de las CC a la estimulación mecánica (35,175). Las lesiones encontradas en nuestro estudio son equiparables a las halladas en el limbo y ligamento espiral en ratones albinos y ratones mutantes YRT2 tras exposición a ruido (176), sin embargo en este estudio no se encontraron alteraciones en el OC.

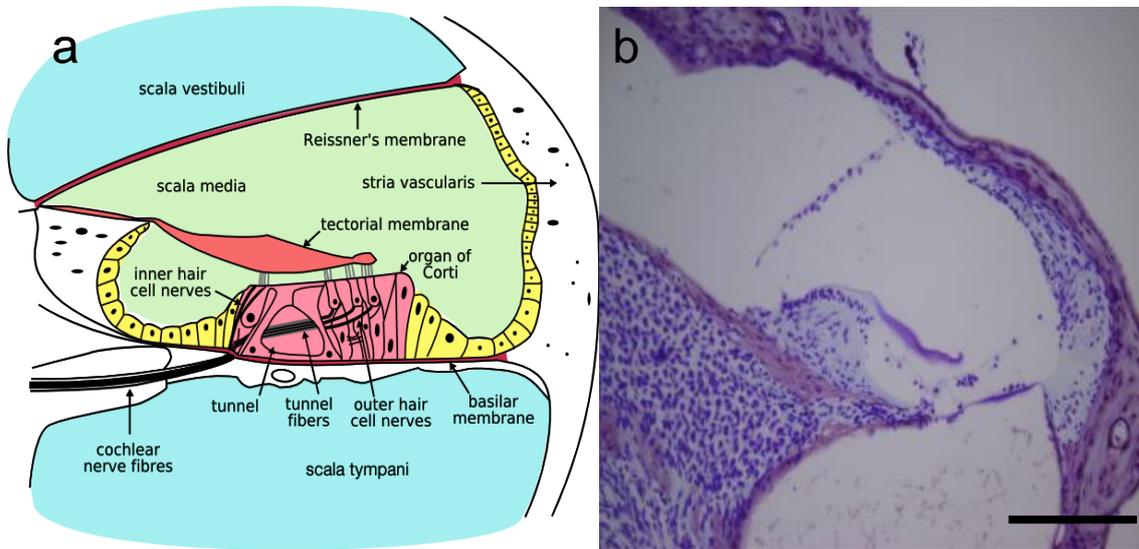


Figura 57. a) Esquema de las estructuras que componen la escala timpánica de la espira media de la cóclea. Imagen disponible en: (177). b) Sección representativa de la morfología coclear de la espira media de un animal del grupo control (10x). Barra de calibración 100 μ m.

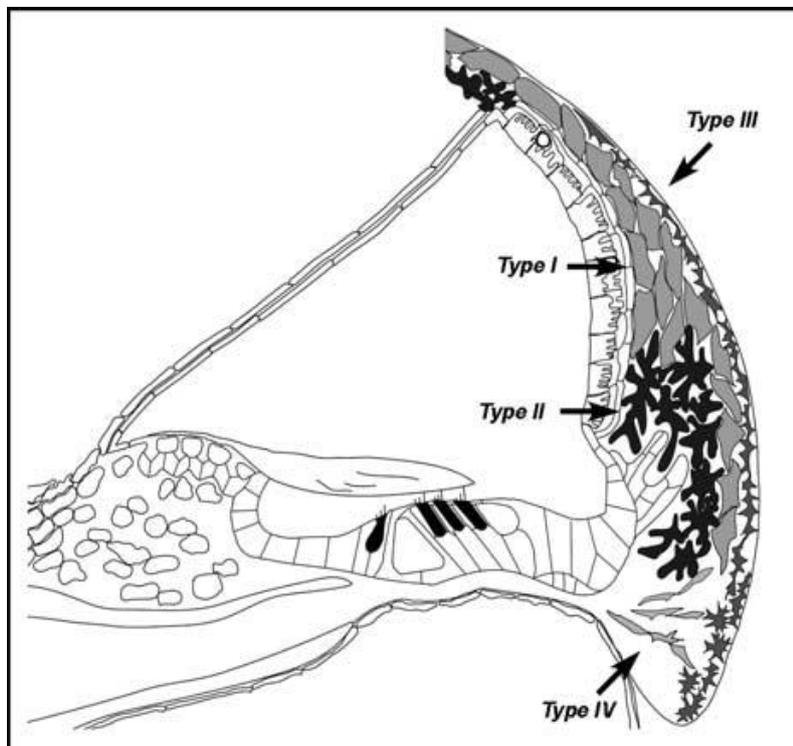


Figura 58. Representación de la distribución de los diferentes tipos de fibrocitos en el ligamento espiral. Imagen disponible en: (32)

Las CC son las dianas principales del OC que se afectan tras la exposición al ruido (29,30). Pero también se ha visto el colapso de células de soporte (especialmente en las células de Deiters y Hensen), tanto en efectos agudos como crónicos del ruido, y se ha relacionado con pérdida de sensibilidad auditiva (30,31) (FIGURA 59). Centrándonos en los datos encontrados en este trabajo, observamos que estas lesiones se encuentran en el grupo expuesto a ruido de 120 dB, en el que es prácticamente imposible diferenciar las CC de las células de soporte por el colapso del OC.

La pérdida de CC o incluso la producción de daños estructurales no irreversibles, como la pérdida de cilios o cambios en la conformación del OC, son las consecuencias de la exposición a ruido que explican mejor la aparición de aumentos permanentes de umbral (28-30,163,178). Se conoce que la pérdida de CC inmediatamente después de la exposición a ruido puede ser pequeña, pero la lesión aumenta tras 30 días después de la exposición (27). Esta pérdida además se puede extender hacia la base de la cóclea (29,178).

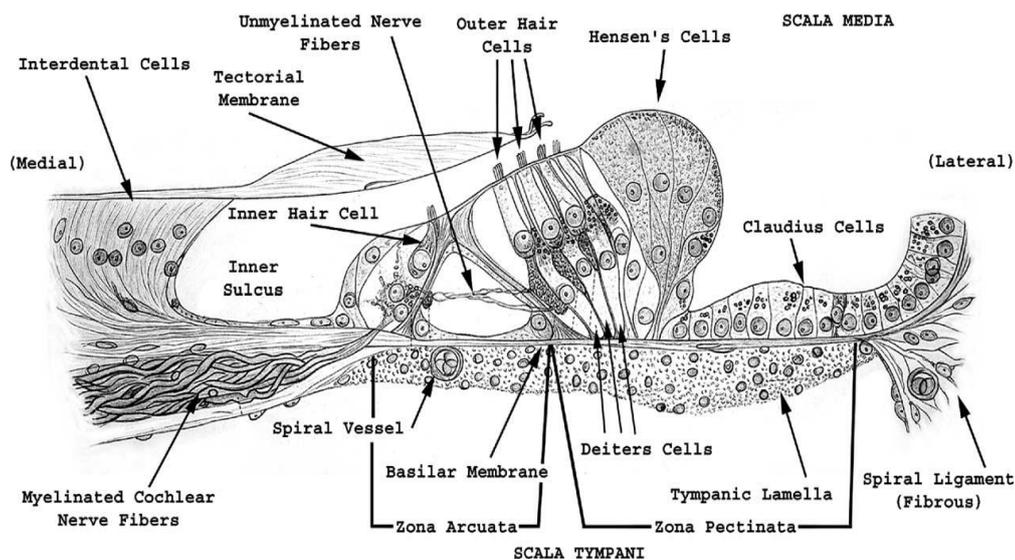


Figura 59. Esquema representativo de las CC y células de soporte en el OC. Imagen disponible en: (125).

En el limbo encontramos una pérdida muy llamativa de fibrocitos en los grupos expuestos a ruido y una cierta desorganización de las células interdentadas. Existen referencias en la literatura en relación a una pérdida ocasional de estas células en el limbo apical con la edad (179), sin embargo no se ha encontrado una relación clara entre la exposición a ruido y alteraciones en estas células (30,174,175) (FIGURA 60).

Comparando el grupo control con los respectivos grupos de ruido podemos ver una alteración importante en la citoarquitectura de la estría vascular, desde un adelgazamiento y atrofia (ruido “láser”) a una dilatación y vacuolización (ruido 120 dB SPL). Estos hallazgos también son encontrados por Ohlemiller en 2007 al analizar los efectos agudos (3 h) y permanentes (8 semanas) de un ruido de banda ancha (4-45 kHz) a 110 dB SPL en ratones CBA y C57/B6, donde se aprecian alteraciones en el espesor de la estría vascular, en la densidad de las células marginales y en la densidad de fibrocitos en el ligamento espiral y limbo (180). Cuando el daño es agudo se puede ver una vacuolización de las células basales dentro de la estría vascular, y a las 8 semanas se encuentra una estría mucho más atrófica y delgada con residuos extracelulares.

Las alteraciones encontradas en nuestro estudio en el OC, limbo, ligamento espiral y estría vascular son muy similares a los encontrados por Celaya et al, (181) al comparar ratones salvajes para el gen *Igf1*^{+/+} que son sometidos a un ruido (110 dB SPL durante 30 minutos) con sus respectivos controles. Murillo-Cuesta et al, en 2010 (176) encontraron estos hallazgos al exponer a ratones albinos y transgénicos pigmentados (YRT2 y Tyrth) a ruido, donde se aprecia una pérdida de fibrocitos en el limbo y en ligamento espiral sin afectación de las CC (FIGURA 60).

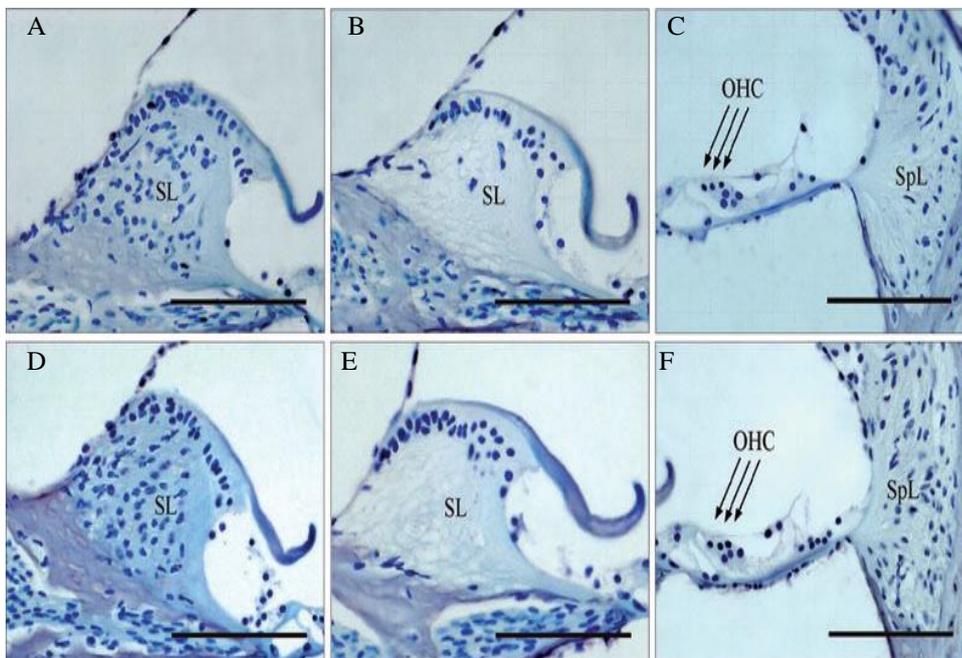


Figura 60. Morfología coclear de un ratón albino (A-C) y otro transgénico YRT2 (D-F) representativos de los resultados de este estudio, en los que se aprecia la pérdida de fibrocitos tras la exposición a ruido en el limbo (B,E) y en ligamento espiral (C). [OHC: CCE/ SL: limbo/ SpL: Ligamento espiral. Barra de escala 100 μ m. Imagen disponible en: (176).

Es importante destacar que en la literatura están descritas alteraciones en la morfología coclear que pueden estar relacionadas con una fase inicial de envejecimiento, puesto que en animales con más 6 meses de edad se han visto alteraciones en estructuras como ligamento espiral y estría vascular (179). Esta hipótesis no sería relevante en nuestro estudio ya que los ratones presentan una media de 3 meses de edad en el momento del sacrificio.

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en los diferentes grupos de ruido en relación con el control al estudiar el ganglio espiral. Estos datos concuerdan con el estudio de Liu y colaboradores, realizado en cobayas que no encontraron una pérdida de las neuronas ganglionares en los canales de Rosenthal después de la exposición a ruido de 110 dB SPL (182). Sin embargo, en la literatura hay estudios que hacen hincapié en que la supervivencia de las neuronas del ganglio espiral depende del soporte trófico proporcionado por las CCI (183). Estos datos son controvertidos ya que hay recientes investigaciones que indican que la degeneración de las neuronas del ganglio espiral sucede sin lesión en las CCI, y esto se debería sobre todo a la importancia de las células de sostén en la supervivencia neuronal en el oído interno (184).

Si nos centramos en las alteraciones morfológicas producidas a nivel de las CC podemos encontrar estudios que demuestran que las CC más dañadas tras la exposición del ruido son las CCE (37,143,144,185), seguidas de las células de sostén; posteriormente acaban dañándose las CCI. Se ha descrito que la primera manifestación de daño celular es la pérdida de la última línea de CCE (29,178). Estos datos concuerdan con los hallados en nuestro estudio, afectándose más las CCE en todos los grupos expuestos a ruido. En el grupo de ruido a 105 dB SPL se pone de manifiesto cómo se pierde la última fila de CCE como vimos en el apartado 4.3.2. de Resultados.

Sin embargo, en la literatura hay cierta controversia en relación a qué CC se lesionan de forma más precoz. Hay estudios que encuentran un daño progresivo en las CC, empezando por la primera línea de CCE, seguido de las CCI, y segunda y tercera fila de las CCE. (30,144,186,187). Por el contrario, exponen que las CCI son las más alteradas por el daño inducido por ruido (37,188).

Existen varias fases por las que van pasando las CC tras el daño: inicialmente aparece una fusión intercelular por medio de digitaciones, un colapso y posteriormente la muerte celular. Cuando se estudian microscópicamente las CC, podemos apreciar distintas lesiones que se

clasifican en puras (cuando afectan a un único tipo de CC), combinadas (si se afectan ambas CC), focales y generalizadas (143).

Cuando aparece un lesión de al menos un 50% de pérdida en las CC a lo largo de una longitud de 0,03 mm del órgano de Corti, recibe el nombre de lesión focal. Esta lesión equivaldría a un daño en tres CC consecutivas (126,143,185). Existe una lesión focal específica que se conoce como “wipeout”, es decir, como aniquilación o erradicación, que corresponde a la pérdida de CC y que sucede en una longitud superior a 0,03 mm pero inferior de 1,5 mm; esta lesión estaría causada por un daño acústico de gran energía (FIGURA 61). En nuestro estudio, en el grupo de ruido “láser” hemos objetivado estas lesiones “wipeout” en los sectores apicales 25% y 30%. En el grupo de ruido a 120 dB SPL, podríamos decir que también aparecen lesiones “wipeout” pero no de forma focal sino mucho más extensas afectando a la porción basal de la cóclea.

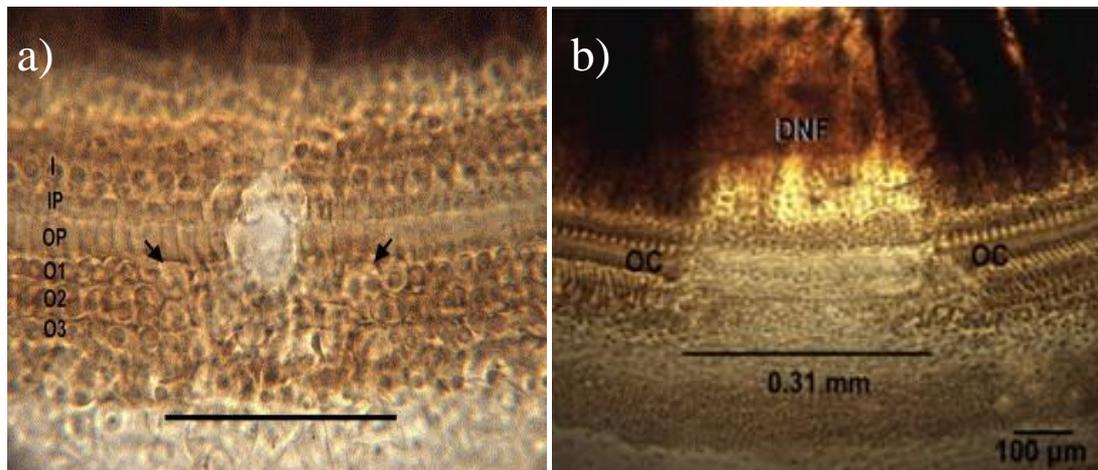


Figura 61. a) Lesión focal en el OC se aprecia una pérdida circunscrita de CCE (primera y segunda línea), células de soporte y CCI. b) Lesión de tipo “wipeout” en el OC, donde se aprecia una pérdida y barrido de CCE, CCI, soporte e incluso de la membrana basilar. Imagen disponible en: (144)

Las lesiones que se mantienen a lo largo de la longitud del OC, y son mayores de 1,5 mm se denominan generalizadas (63,143). En este caso suelen distribuirse desde al ápex hasta la base, y normalmente las regiones más distales al ápex son las que se ven más afectadas; estos datos concuerdan con los encontrados en nuestro estudio en los tres grupos de ruido especialmente en las CCE.

5.5. COCLEOGRAMAS

Un cocleograma es un mapa topográfico de la cóclea que nos da la información necesaria para poder interpretar las características estructurales y funcionales del oído interno, conociendo el lugar exacto que ocupan las frecuencias a lo largo de la cóclea de la forma más fisiológica posible.

En la literatura podemos encontrar muchas estimaciones acerca de los lugares tonotópicos específicos en mapas frecuencias cocleares. Hans Engström en 1966 fue el primero en utilizar esta técnica para conocer el comportamiento de las CC dentro de un cocleograma (189).

Existe una relación lineal simple de la ubicación frecuencial a lo largo de la longitud coclear que responde como una función logarítmica. Sin embargo, no hay consenso sobre qué ecuación es más adecuada para el estudio citococlear en cada especie. Estas ecuaciones pueden dar lugar a diferentes mapas frecuenciales oscilando en más de una octava entre ellos. Las más utilizadas en los estudios mediante mediciones indirectas matemáticas son la de Greenwood y Ehret (190,191); aunque también podemos encontrar otras basadas en inyecciones de trazadores neurales, bien en el núcleo coclear como en las fibras del nervio auditivo, como es el caso de Müller (TABLA 10) (30,122,190-193).

Tabla 10. Ecuaciones cocleográficas: Relación de las diferentes ecuaciones posibles de cálculo de cocleogramas.

ESPECIE	ECUACIÓN	UNIDADES	REFERENCIAS
Rata Wistar	$\chi = 102.048 * e^{(-0.04357 * f)} - 4.632$	% desde la base	Müller (1991)
Rata	$f = A(10^{ax} - k)$	% desde la ápex	Greenwood (1996)
Ratón	$f = 335010 * (10^{0.21x} - 1)$	mm desde el ápex	Ehret (1983)
Ratón C57BL/CBA	$f = 1460 * (10^{0.0177x})$	% desde la ápex	Ou (2000)
Ratón CBA/CaJ	$f = 3.109 * 10^{(100-d) * 0.0142 - 0.7719}$	% desde la base	Wang (2002)
Ratón CBA/CaJ	$\chi = 156.53 - 82 - 46 * \log(f)$	% desde la base	Müller (2005)

Es importante recalcar que debido a la variación de la longitud en la membrana basilar intraespecie se prefiere trazar los cocleogramas en porcentaje es vez de milímetros. Es por ello que en nuestro estudio dividimos el OC en sectores equidistantes en 5% desde el ápex hasta la base en toda la longitud de la cóclea. Como comentamos en el apartado de material y métodos, para hacer la representación cocleográfica de los datos nos basamos en la ecuación de Müller para la estirpe CBA.

La extracción total de la membrana basilar a lo largo de toda la cóclea es técnicamente difícil, la región distal del “hook” o gancho, tiene un carácter más frágil que hace que se lesione con facilidad. Es por ello que en los cocleogramas de nuestro estudio no se estima que obtengamos el 100% de la cóclea, sino que obtenemos de una manera indemne y fiable hasta el 75-80% de la longitud de la misma. Preferimos omitir el 20-25% restante para evitar cometer errores en relación a la integridad celular que no sean por el propio daño inducido por el ruido y sean por la técnica de disección; con ello no estamos valorando qué ocurre en las frecuencias comprendidas entre 50-80 kHz, pero esto no conlleva consecuencias de pérdida de información ya que los ruidos empleados en el estudio actúan en un rango entre 2-22 kHz, y con nuestro método valoramos la tonotopía coclear comprendida en ese rango e incluso lo doblamos.

Hay una necesidad de estandarización de los métodos utilizados para el trazado de los cocleogramas, con el fin de obtener una visión más uniforme del comportamiento de las CC, tanto en una forma fisiológica como tras la exposición a un daño celular; y de esta manera, poder correlacionar las lesiones histológicas de las CC con los desplazamientos de los umbrales auditivos obtenidos con las mediciones de ABR. Los resultados obtenidos en los cocleogramas y los estudios morfológicos de los animales expuestos a ruido concuerdan con el supuesto de que son las CC la principal diana que se afecta tras la exposición a ruido y se relaciona con la aparición de aumentos permanentes de umbrales frecuenciales específicos (29,30,122,163).

Hay estudios (133,136,194,195) que utilizan escalas de aproximación para poder llevar a cabo el recuento de las CC en cada una de las regiones de la cóclea. Se seleccionan regiones representativas y por medio de la escala se realizan estimaciones globales de la población de las CC. Estos datos cuantitativos pueden reflejar integridad y supervivencia celular, y otras veces porcentaje de pérdida de CC, pero en ninguno de ellos se representan densidades celulares como hacemos en nuestro método (FIGURA 62).

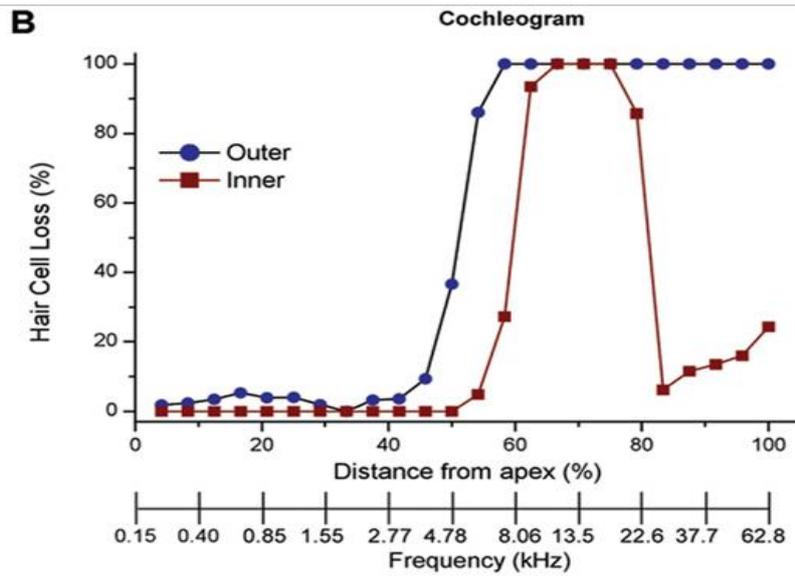


Figura 62. Cocleograma de un gerbo expuesto a ruido, donde se representa la pérdida de CC en porcentaje. Imagen disponible en: (194).

La ventaja de hacer un barrido sistemático a lo largo de la cóclea para estudiar la densidad poblacional de las CC, permite hacer un recuento con un nivel de precisión mucho mayor que las escalas de aproximación que solo hacen estimaciones.

Cabe resaltar que la aplicabilidad de este método de recuento no sólo es útil en daño celular, sino también permite evaluar la respuesta de las CC tras la aplicación de tratamientos de regeneración y protección celular.

6. CONCLUSIONES

1. Los ratones CBA expuestos a ruido excesivo experimentan un aumento en los umbrales de detección de las DPOAES y en los umbrales auditivos, cuya magnitud y reversibilidad depende del tipo de ruido:
 - 1.1. Los animales expuestos a ruido SSV de intensidad 105 dB SPL sufren un aumento de 60-70 dB SPL en los umbrales auditivos en la respuesta a estímulos click y a tonos puros.
 - 1.2. Los animales expuestos a ruido SSV de intensidad 120 dB SPL experimentaron un incremento del umbral auditivo de 70-80 dB SPL, y una peor recuperación que los animales expuesto a ruido de 105 dB SPL.
 - 1.3. Los animales expuestos a ruido "láser" de intensidad 105 dB SPL sufren un daño funcional a los 2 días de la exposición, que luego tiende a recuperarse y evolucionar igual que el grupo de ruido 105 dB. El audiograma del grupo de ruido "láser" en la respuesta a 10 kHz presenta un mayor umbral y una peor recuperación, reflejando una lesión específica en la región coclear encargada de la recepción de esta frecuencia.
 - 1.4. Los grupos expuestos a ruido experimentan una disminución de las latencias absolutas e interpico, así como una caída en las amplitudes de los picos ABR.

2. El método de recuento de densidad celular evalúa el número y daño de las CC indicado por células/área, así como la ubicación del daño en el OC localizando las lesiones en el rango frecuencial de tonotopía coclear.
 - 2.1. Los ratones CBA expuestos a ruido presentan una pérdida marcada de CC, tanto externas como internas, especialmente en los sectores correspondientes a las regiones media y basal. Las CCE son las más afectadas.

CONCLUSIONES

- 2.2. La pérdida de CC se correlaciona con el desplazamiento del umbral auditivo causado por el ruido, así se observa la siguiente gradación de mayor a menor pérdida tras exposición a daño 120 dB SPL > ruido 105 dB SPL > ruido “láser” > grupo control.
 - 2.3. El grupo expuesto a ruido “láser” muestra una pérdida de CC más intensa en los sectores apicales que se corresponden con la región de la cóclea sintonizada con las frecuencias en torno a 10 kHz.
- 3.** El descenso de los niveles de IGF-1 es un potencial marcador bioquímico de daño celular inducido por la exposición a ruido excesivo en ratones CBA.
- 3.1. Existe una correlación entre los niveles de IGF-1 en suero y el umbral auditivo, de manera que a menor nivel de IGF-1, hay un mayor nivel de umbral auditivo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Somma G, Magrini A, Bergamaschi A. Ipoacusia da rumore: nuovi approcci preventivi. *G Ital Med Lav Ergon* 2003;25 Suppl(3):275-276.
- (2) Stansfeld SA, Matheson MP. Noise pollution: non-auditory effects on health. *Br Med Bull* 2003;68:243-257.
- (3) Passchier-Vermeer W, Passchier WF. Noise exposure and public health. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 1:123-131.
- (4) Verbeek JH, Kateman E, Morata TC, Dreschler WA, Mischke C. Interventions to prevent occupational noise-induced hearing loss. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD006396.
- (5) Rosen G. A backward glance at noise pollution. *Am J Public Health* 1974;64(5):514-517.
- (6) Bacon F. Nueva Atlántida. Barcelona: Abraxas; 2006.
- (7) Jarcho S. Ramazzini on diseases of runners and miners (1713). *Am J Cardiol* 1959;4:514-518.
- (8) Paparella MM. Otorrinolaringología. Tomo II. 3ª ed. Buenos Aires ; Madrid: Médica Panamericana; 1994.
- (9) Hernández Sánchez H, Gutiérrez Carrera M. Hipoacusia inducida por ruido: estado actual. *Rev Cuba Med Mil.* 2006;35(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572006000400007&lng=es. Acceso 21 de agosto de 2013.
- (10) Julio Félix Muñoz. Estudio de la correlación existente entre el efecto supresor contralateral y la fatiga auditiva mediante otoemisiones acústicas transitorias [tesis doctoral]. Valencia: Universitat de València, Departament de Cirurgia; 2005.
- (11) Beranek LL. Acoustics. New York, NY: Published by the American Institute of Physics for the Acoustical Society of America; 1986.
- (12) ISO 1999:1990 - Acoustics -- Determination of occupational noise exposure and estimation of noise-induced hearing impairment. Disponible en: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=6759. Acceso 21 de agosto de 2013.
- (13) Directiva 2003/10/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de febrero de 2003, sobre las disposiciones mínimas de seguridad y de salud relativas a la exposición de los trabajadores a los riesgos derivados de los agentes físicos (ruido) (decimoséptima Directiva específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE). Disponible en: http://eurlex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!CELEXnumdoc&numdoc=32003l0010&lg=es. Acceso 21 de agosto de 2013.
- (14) Uimonen S, Maki-Torkko E, Sorri M. Hearing and occupation. *Int J Circumpolar Health* 1998;57(2-3):156-161.
- (15) Babisch W. Noise and health. *Environ Health Perspect* 2005;113(1):A14-5.
- (16) Bartosinska M, Ejsmont J. Health condition of employees exposed to noise--extra auditory health effects. *Wiad Lek* 2002;55 Suppl 1:20-25.

- (17) Phoon WH, Lee HS. Hearing protection plans require proper ear plug selection, usage. Train workers on noise hazards and motivate them to wear hearing protectors. *Occup Health Saf* 1993;62(5):98-100, 117.
- (18) Sulkowski WJ, Szymczak W, Kowalska S, Sward-Matyja M. Epidemiology of occupational noise-induced hearing loss (ONHL) in Poland. *Otolaryngol Pol* 2004;58(1):233-236.
- (19) Cruz Roja Española - Comunidad de Madrid - La contaminación acústica. Disponible en: http://www.cruzrojamadrid.org/que_hacemos/medioambiente/salud_ambiental/la_contaminacion_acustica/. Acceso 23 de agosto de 2013.
- (20) Reiss M, Reiss G. Employment and communication of hearing disabled patients. *Praxis (Bern 1994)* 2001;90(21):927-930.
- (21) Kight CR, Swaddle JP. How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. *Ecol Lett* 2011;14(10):1052-1061.
- (22) Turner JG, Parrish JL, Hughes LF, Toth LA, Caspary DM. Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. *Comp Med* 2005;55(1):12-23.
- (23) Ohlemiller KK, Wright JS, Heidbreder AF. Vulnerability to noise-induced hearing loss in 'middle-aged' and young adult mice: a dose-response approach in CBA, C57BL, and BALB inbred strains. *Hear Res* 2000;149(1-2):239-247.
- (24) Hernández Sánchez H. Otorrinolaringología. Hipoacusia inducida por ruido. Disponible en: <http://articulos.sld.cu/otorrino/?p=322>. Acceso 23 de agosto de 2013.
- (25) Eldredge DH, Covell WP, Gannon RP. Acoustic trauma following intermittent exposure to tones. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1959;68:723-732.
- (26) Eldredge DH, Miller JC. Acceptable noise exposures — damage risk criteria. ASHA reports nº 4: Proceedings of the Conference Noise as a Public Health Hazard. June 13-14.1968. Washington,D.C.: American Speech-Language-Hearing Association; 1969. p. 110-120.
- (27) Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 2006;27(1):1-19.
- (28) Ou HC, Bohne BA, Harding GW. Noise damage in the C57BL/CBA mouse cochlea. *Hear Res* 2000;145(1-2):111-122.
- (29) Chen YS, Liu TC, Cheng CH, Yeh TH, Lee SY, Hsu CJ. Changes of hair cell stereocilia and threshold shift after acoustic trauma in guinea pigs: comparison between inner and outer hair cells. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2003;65(5):266-274.
- (30) Wang Y, Hirose K, Liberman MC. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2002;3(3):248-268.
- (31) Flock A, Flock B, Fridberger A, Scarfone E, Ulfendahl M. Supporting cells contribute to control of hearing sensitivity. *J Neurosci* 1999;19(11):4498-4507.

- (32) Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003;4(3):339-352.
- (33) Canlon B. The effect of acoustic trauma on the tectorial membrane, stereocilia, and hearing sensitivity: possible mechanisms underlying damage, recovery, and protection. *Scand Audiol Suppl* 1988;27:1-45.
- (34) Bohne BA, Harding GW. Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am J Otol* 2000;21(4):505-509.
- (35) Hibino H, Kurachi Y. Molecular and physiological bases of the K⁺ circulation in the mammalian inner ear. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:336-345.
- (36) Clark JA, Pickles JO. The effects of moderate and low levels of acoustic overstimulation on stereocilia and their tip links in the guinea pig. *Hear Res* 1996;99(1-2):119-128.
- (37) Liberman MC, Kiang NY. Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. IV. Stereocilia damage and alterations in rate- and phase-level functions. *Hear Res* 1984;16(1):75-90.
- (38) Hsu CJ, Shau WY, Chen YS, Liu TC, Lin-Shiau SY. Activities of Na⁽⁺⁾,K⁽⁺⁾-ATPase and Ca⁽²⁺⁾-ATPase in cochlear lateral wall after acoustic trauma. *Hear Res* 2000;142(1-2):203-211.
- (39) Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC. Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res* 2002;164(1-2):231-239.
- (40) Li X, Yu N, Sun J, Zhao L. Prophylactic effect of Ca²⁺ -deficient artificial perilymph perfusion on noise-induced hearing loss. *Chin Med J (Engl)* 2003;116(3):440-443.
- (41) Gravendeel DW, Plomp R. Perceptive bass deafness. *Acta Otolaryngol* 1960;51:548-560.
- (42) Op de Beeck K, Schacht J, Van Camp G. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hear Res* 2011;281(1-2):18-27.
- (43) Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, Vaughn C, Mohler J, Li Y, et al. IGF-1 reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(12):2684-2690.
- (44) d'Aldin C, Cherny L, Devriere F, Dancer A. Treatment of acoustic trauma. *Ann N Y Acad Sci* 1999;884:328-344.
- (45) Real Decreto 286/2006, de 10 de marzo, sobre la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición al ruido. BOE, nº 60, (11 de marzo de 2006). Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2006-4414>. Acceso 22 de agosto de 2013.
- (46) Consensus conference. Noise and hearing loss. *JAMA* 1990;263(23):3185-3190.

- (47) Kirchner DB, Evenson E, Dobie RA, Rabinowitz P, Crawford J, Kopke R, et al. Occupational noise-induced hearing loss: ACOEM Task Force on Occupational Hearing Loss *J Occup Environ Med* 2012;54(1):106-108.
- (48) Nowak J, Bilski B. Factors modifying noise-induced hearing loss. *Med Pr* 2003;54(1):81-86.
- (49) Bergemalm PO, Borg E. Long-term objective and subjective audiologic consequences of closed head injury. *Acta Otolaryngol* 2001;121(6):724-734.
- (50) Bergstrom B, Nystrom B. Development of hearing loss during long-term exposure to occupational noise. A 20-year follow-up study. *Scand Audiol* 1986;15(4):227-234.
- (51) Ward WD. Endogenous factors related to susceptibility to damage from noise. *Occup Med* 1995;10(3):561-575.
- (52) Li HS. Influence of genotype and age on acute acoustic trauma and recovery in CBA/Ca and C57BL/6J mice. *Acta Otolaryngol* 1992;112(6):956-967.
- (53) Holme RH, Steel KP. Progressive hearing loss and increased susceptibility to noise-induced hearing loss in mice carrying a *Cdh23* but not a *Myo7a* mutation. *J Assoc Res Otolaryngol* 2004;5(1):66-79.
- (54) Davis RR, Newlander JK, Ling X, Cortopassi GA, Krieg EF, Erway LC. Genetic basis for susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res* 2001;155(1-2):82-90.
- (55) Spillmann T. Genetic diseases of hearing. *Curr Opin Neurol* 1994;7(1):81-87.
- (56) Abreu-Silva RS, Rincon D, Horimoto AR, Sguillar AP, Ricardo LA, Kimura L, et al. The search of a genetic basis for noise-induced hearing loss (NIHL). *Ann Hum Biol* 2011;38(2):210-218.
- (57) Dogru H, Tuz M, Uygur K. Correlation between blood group and noise-induced hearing loss. *Acta Otolaryngol* 2003;123(8):941-942.
- (58) Ferrite S, Santana V. Joint effects of smoking, noise exposure and age on hearing loss. *Occup Med (Lond)* 2005;55(1):48-53.
- (59) Lahoz Zamarro MT, Abenia Ingalaturre JM, Valles Varela H, Rubio Calvo E. The influence of hypercholesterolemia and noise on human auditory function. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 1993;20(6):659-671.
- (60) Mizoue T, Miyamoto T, Shimizu T. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. *Occup Environ Med* 2003;60(1):56-59.
- (61) McBride DI, Williams S. Audiometric notch as a sign of noise induced hearing loss. *Occup Environ Med* 2001;58(1):46-51.
- (62) Von Békésy G. Experiments in hearing. New York: McGraw-Hill; 1960.
- (63) Harding GW, Bohne BA, Ahmad M. DPOAE level shifts and ABR threshold shifts compared to detailed analysis of histopathological damage from noise. *Hear Res* 2002;174(1-2):158-171.

- (64) Harding GW, Bohne BA. Temporary DPOAE level shifts, ABR threshold shifts and histopathological damage following below-critical-level noise exposures. *Hear Res* 2004;196(1-2):94-108.
- (65) Konings A, Van Laer L, Wiktorek-Smagur A, Rajkowska E, Pawelczyk M, Carlsson PI, et al. Candidate gene association study for noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Ann Hum Genet* 2009;73(2):215-224.
- (66) Konings A, Van Laer L, Pawelczyk M, Carlsson PI, Bondeson ML, Rajkowska E, et al. Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Hum Mol Genet* 2007;16(15):1872-1883.
- (67) Van Laer L, Carlsson PI, Ottschytch N, Bondeson ML, Konings A, Vandeveld A, et al. The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss. *Hum Mutat* 2006;27(8):786-795.
- (68) Fortunato G, Marciano E, Zarrilli F, Mazzaccara C, Intrieri M, Calcagno G, et al. Paraoxonase and superoxide dismutase gene polymorphisms and noise-induced hearing loss. *Clin Chem* 2004;50(11):2012-2018.
- (69) Carlsson PI, Van Laer L, Borg E, Bondeson ML, Thys M, Fransen E, et al. The influence of genetic variation in oxidative stress genes on human noise susceptibility. *Hear Res* 2005;202(1-2):87-96.
- (70) Gratton MA, Eleftheriadou A, Garcia J, Verduzco E, Martin GK, Lonsbury-Martin BL, et al. Noise-induced changes in gene expression in the cochleae of mice differing in their susceptibility to noise damage. *Hear Res* 2011;277(1-2):211-226.
- (71) Harding GW, Bohne BA, Vos JD. The effect of an age-related hearing loss gene (Ahl) on noise-induced hearing loss and cochlear damage from low-frequency noise. *Hear Res* 2005;204(1-2):90-100.
- (72) Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Flood DG, Reaume AG, Hoffman EK, et al. Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss. *Audiol Neurootol* 1999;4(5):237-246.
- (73) Ohlemiller KK. Contributions of mouse models to understanding of age- and noise-related hearing loss. *Brain Res* 2006;1091(1):89-102.
- (74) Hakuba N, Koga K, Gyo K, Usami SI, Tanaka K. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST. *J Neurosci* 2000;20(23):8750-8753.
- (75) Chen TJ, Chen SS, Wang DC, Hsieh YL. Increased vulnerability of auditory system to noise exposure in mdx mice. *Laryngoscope* 2002;112(3):520-525.
- (76) Biesalski HK, Wellner U, Weiser H. Vitamin A deficiency increases noise susceptibility in guinea pigs. *J Nutr* 1990;120(7):726-737.
- (77) Derekoy FS, Koken T, Yilmaz D, Kahraman A, Altuntas A. Effects of ascorbic acid on oxidative system and transient evoked otoacoustic emissions in rabbits exposed to noise. *Laryngoscope* 2004;114(10):1775-1779.

- (78) Duan M, Qiu J, Laurell G, Olofsson A, Counter SA, Borg E. Dose and time-dependent protection of the antioxidant N-L-acetylcysteine against impulse noise trauma. *Hear Res* 2004;192(1-2):1-9.
- (79) Hou F, Wang S, Zhai S, Hu Y, Yang W, He L. Effects of alpha-tocopherol on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear Res* 2003;179(1-2):1-8.
- (80) McFadden SL, Woo JM, Michalak N, Ding D. Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear Res* 2005;202(1-2):200-208.
- (81) Quaranta A, Scaringi A, Bartoli R, Margarito MA, Quaranta N. The effects of 'supra-physiological' vitamin B12 administration on temporary threshold shift. *Int J Audiol* 2004;43(3):162-165.
- (82) Kuokkanen J, Aarnisalo AA, Ylikoski J. Efficiency of hyperbaric oxygen therapy in experimental acute acoustic trauma from firearms. *Acta Otolaryngol Suppl* 2000;543:132-134.
- (83) Ohinata Y, Miller JM, Altschuler RA, Schacht J. Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res* 2000;878(1-2):163-173.
- (84) Ohinata Y, Yamasoba T, Schacht J, Miller JM. Glutathione limits noise-induced hearing loss. *Hear Res* 2000;146(1-2):28-34.
- (85) Attias J, Bresloff I, Haupt H, Scheibe F, Ising H. Preventing noise induced otoacoustic emission loss by increasing magnesium (Mg²⁺) intake in guinea-pigs. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2003;14(2):119-136.
- (86) Hamaguchi K, Yamamoto N, Nakagawa T, Furuyashiki T, Narumiya S, Ito J. Role of PGE-type receptor 4 in auditory function and noise-induced hearing loss in mice. *Neuropharmacology* 2012;62(4):1841-1847.
- (87) Jallali N, Ridha H, Thrasivoulou C, Butler P, Cowen T. Modulation of intracellular reactive oxygen species level in chondrocytes by IGF-1, FGF, and TGF-beta1. *Connect Tissue Res* 2007;48(3):149-158.
- (88) Konig O, Winter E, Fuchs J, Haupt H, Mazurek B, Weber N, et al. Protective effect of magnesium and MK 801 on hypoxia-induced hair cell loss in new-born rat cochlea. *Magnes Res* 2003;16(2):98-105.
- (89) Scheibe F, Haupt H, Ising H. Preventive effect of magnesium supplement on noise-induced hearing loss in the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257(1):10-16.
- (90) Cassandro E, Sequino L, Mondola P, Attanasio G, Barbara M, Filippo R. Effect of superoxide dismutase and allopurinol on impulse noise-exposed guinea pigs--electrophysiological and biochemical study. *Acta Otolaryngol* 2003;123(7):802-807.
- (91) Pouyatos B, Gearhart CA, Fechter LD. Acrylonitrile potentiates hearing loss and cochlear damage induced by moderate noise exposure in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204(1):46-56.

- (92) Shibata SB, Osumi Y, Yagi M, Kanda S, Kawamoto K, Kuriyama H, et al. Administration of amitriptyline attenuates noise-induced hearing loss via glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induction. *Brain Res* 2007;1144:74-81.
- (93) Yamasoba T, Schacht J, Shoji F, Miller JM. Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res* 1999;815(2):317-325.
- (94) Okano T, Xuan S, Kelley MW. Insulin-like growth factor signaling regulates the timing of sensory cell differentiation in the mouse cochlea. *J Neurosci* 2011;31(49):18104-18118.
- (95) Sanchez-Calderon H, Rodriguez-de la Rosa L, Milo M, Pichel JG, Holley M, Varela-Nieto I. RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One* 2010;5(1):e8699.
- (96) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, Matsuoka Y, Kita T, Kim TS, et al. Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 2006;116(4):529-533.
- (97) Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol* 2011;48(1):1-9.
- (98) Wikipedia. Factor de crecimiento insulínico tipo 1. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Factor de crecimiento insulínico tipo 1](http://es.wikipedia.org/wiki/Factor_de_crecimiento_insulínico_tipo_1). Acceso 23 de agosto de 2013.
- (99) Murillo-Cuesta S, Rodriguez-de la Rosa L, Cediell R, Lassaletta L, Varela-Nieto I. The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci* 2011;4:11.
- (100) Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 1996;335(18):1363-1367.
- (101) Bonapace G, Concolino D, Formicola S, Strisciuglio P. A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet* 2003;40(12):913-917.
- (102) Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, et al. Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(5):2855-2864.
- (103) Netchine I, Azzi S, Houang M, Seurin D, Perin L, Ricort JM, et al. Partial primary deficiency of insulin-like growth factor (IGF)-I activity associated with IGF1 mutation demonstrates its critical role in growth and brain development. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(10):3913-3921.
- (104) Van Duyvenvoorde HA, van Doorn J, Koenig J, Gauguin L, Oostdijk W, Wade JD, et al. The severe short stature in two siblings with a heterozygous IGF1 mutation is not caused by a dominant negative effect of the putative truncated protein. *Growth Horm IGF Res* 2011;21(1):44-50.
- (105) Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993;75(1):59-72.

- (106) Riquelme R, Cediél R, Contreras J, la Rosa Lourdes RD, Murillo-Cuesta S, Hernandez-Sanchez C, et al. A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor I deficient mice. *Front Neuroanat* 2010;4:27.
- (107) Parham K, Sun XM, Kim DO. Noninvasive assessment of auditory function in mice: Auditory Brainstem Response and distortion product otoacoustic emissions. In: Willott JF, editor. *Handbook of mouse auditory research: from behavior to molecular biology* Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 37-58.
- (108) Murillo-Cuesta S, Camarero G, Gonzalez-Rodriguez A, De La Rosa LR, Burks DJ, Avendano C, et al. Insulin receptor substrate 2 (IRS2)-deficient mice show sensorineural hearing loss that is delayed by concomitant protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) loss of function. *Mol Med* 2012;18:260-269.
- (109) Cobo P, Murillo-Cuesta S, Cediél R, Moreno A, Lorenzo-García P, Varela-Nieto I. Design of a reverberant chamber for noise exposure experiments with small animals. *Appl Acoust* 2009;70(8):1034-1040.
- (110) Martin GK, Stagner BB, Lonsbury-Martin BL. Assessment of cochlear function in mice: distortion-product otoacoustic emissions. *Curr Protoc Neurosci* 2006;Chapter 8:Unit8.21C.
- (111) IIBm. Instituto de Investigaciones Biomédicas"Alberto Sols" - Servicio de Evaluación Neurofuncional No Invasiva. Disponible en: <http://www.iib.uam.es/portal/web/enni>. Acceso 23 de agosto de 2013.
- (112) Mouse: Decision tree for blood sampling. Disponible en: <http://www.nc3rs.org.uk/bloodsamplingmicrosite/page.asp?id=419>. Acceso 22 de agosto de 2013.
- (113) IIBm. Instituto de Investigaciones Biomédicas"Alberto Sols" - Servicio de Histología. Disponible en: <http://www.iib.uam.es/portal/web/histologia>. Acceso 22 de agosto de 2013.
- (114) Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005;11(3):271-276.
- (115) Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, Gundersen HJ. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol* 2010;38(7):1011-1025.
- (116) Marcos R, Monteiro RA, Rocha E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *J Anat* 2012;220(4):303-317.
- (117) Olympus. The Computer Assisted Stereological Toolbox (CAST). Disponible en: http://www.olympuslatinoamerica.com/spanish/seg/img/Catalog/seg_imgsystoolbox_cast_bro.pdf. Acceso 22 de agosto de 2013.
- (118) Mammano F. ATP-dependent intercellular Ca²⁺ signaling in the developing cochlea: facts, fantasies and perspectives. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24(1):31-39.

- (119) Viberg A, Canlon B. The guide to plotting a cochleogram. *Hear Res* 2004;197(1-2):1-10.
- (120) Larsen JO. Stereology of nerve cross sections. *J Neurosci Methods* 1998;85(1):107-118.
- (121) Slepecky N. Overview of mechanical damage to the inner ear: noise as a tool to probe cochlear function. *Hear Res* 1986;22:307-321.
- (122) Ou HC, Harding GW, Bohne BA. An anatomically based frequency-place map for the mouse cochlea. *Hear Res* 2000;145(1-2):123-129.
- (123) Ruggero MA, Rich NC. Furosemide alters organ of corti mechanics: evidence for feedback of outer hair cells upon the basilar membrane. *J Neurosci* 1991;11(4):1057-1067.
- (124) Niedzielski AS, Wenthold RJ. Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci* 1995;15(3 Pt 2):2338-2353.
- (125) Raphael Y, Altschuler RA. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull* 2003;60(5-6):397-422.
- (126) Bohne BA, Harding GW, Lee SC. Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hear Res* 2007;223(1-2):61-70.
- (127) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-257.
- (128) Saunders JC, Dear SP, Schneider ME. The anatomical consequences of acoustic injury: A review and tutorial. *J Acoust Soc Am* 1985;78(3):833-860.
- (129) Le Prell CG, Dolan DF, Schacht J, Miller JM, Lomax MI, Altschuler RA. Pathways for protection from noise induced hearing loss. *Noise Health* 2003;5(20):1-17.
- (130) Hu BH, Cai Q, Manohar S, Jiang H, Ding D, Coling DE, et al. Differential expression of apoptosis-related genes in the cochlea of noise-exposed rats. *Neuroscience* 2009;161(3):915-925.
- (131) Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear Res* 2002;166(1-2):62-71.
- (132) Niu X, Canlon B. Protective mechanisms of sound conditioning. *Adv Otorhinolaryngol* 2002;59:96-105.
- (133) Harding GW, Bohne BA, Lee SC, Salt AN. Effect of infrasound on cochlear damage from exposure to a 4 kHz octave band of noise. *Hear Res* 2007;225(1-2):128-138.
- (134) Aarnisalo AA, Pirvola U, Liang XQ, Miller J, Ylikoski J. Apoptosis in auditory brainstem neurons after a severe noise trauma of the organ of Corti: intracochlear GDNF treatment reduces the number of apoptotic cells. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2000;62(6):330-334.
- (135) Nicotera TM, Hu BH, Henderson D. The caspase pathway in noise-induced apoptosis of the chinchilla cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003;4(4):466-477.

- (136) Hamernik RP, Qiu W. Correlations among evoked potential thresholds, distortion product otoacoustic emissions and hair cell loss following various noise exposures in the chinchilla. *Hear Res* 2000;150(1-2):245-257.
- (137) Yang WP, Henderson D, Hu BH, Nicotera TM. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear Res* 2004;196(1-2):69-76.
- (138) Yamashita D, Miller JM, Jiang HY, Minami SB, Schacht J. AIF and EndoG in noise-induced hearing loss. *Neuroreport* 2004;15(18):2719-2722.
- (139) Wang J, Ruel J, Ladrech S, Bonny C, van de Water TR, Puel JL. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase-mediated mitochondrial cell death pathway restores auditory function in sound-exposed animals. *Mol Pharmacol* 2007;71(3):654-666.
- (140) Meltser I, Tahera Y, Canlon B. Differential activation of mitogen-activated protein kinases and brain-derived neurotrophic factor after temporary or permanent damage to a sensory system. *Neuroscience* 2010;165(4):1439-1446.
- (141) Sociedad Española de Otorrinolaringología y de Patología Cérvico-Facial Comisión de Otoneurología. Manual de Investigación en otorrinolaringología: comisión de investigación 2010-2012. Tres Cantos, Madrid: GlaxoSmithKline; 2011.
- (142) Chen GD, Fechter LD. The relationship between noise-induced hearing loss and hair cell loss in rats. *Hear Res* 2003;177(1-2):81-90.
- (143) Harding GW, Bohne BA. Distribution of focal lesions in the chinchilla organ of Corti following exposure to a 4-kHz or a 0.5-kHz octave band of noise. *Hear Res* 2007;225(1-2):50-59.
- (144) Harding GW, Bohne BA. Relation of focal hair-cell lesions to noise-exposure parameters from a 4- or a 0.5-kHz octave band of noise. *Hear Res* 2009;254(1-2):54-63.
- (145) Henry KS, Kale S, Scheidt RE, Heinz MG. Auditory brainstem responses predict auditory nerve fiber thresholds and frequency selectivity in hearing impaired chinchillas. *Hear Res* 2011;280(1-2):236-244.
- (146) Xu ZM, Vinck B, De Vel E, van Cauwenberge P. Mechanisms in noise-induced permanent hearing loss: an evoked otoacoustic emission and auditory brainstem response study. *J Laryngol Otol* 1998;112(12):1154-1161.
- (147) Donaldson GS, Ruth RA. Derived-band auditory brain-stem response estimates of traveling wave velocity in humans: II. Subjects with noise-induced hearing loss and Meniere's disease. *J Speech Hear Res* 1996;39(3):534-545.
- (148) Moore BC. Testing the concept of softness imperception: loudness near threshold for hearing-impaired ears. *J Acoust Soc Am* 2004;115(6):3103-3111.
- (149) Sherlock LP, Formby C. Estimates of loudness, loudness discomfort, and the auditory dynamic range: normative estimates, comparison of procedures, and test-retest reliability. *J Am Acad Audiol* 2005;16(2):85-100.

- (150) Popelar J, Grecova J, Rybalko N, Syka J. Comparison of noise-induced changes of auditory brainstem and middle latency response amplitudes in rats. *Hear Res* 2008;245(1-2):82-91.
- (151) Schaette R, Kempster R. Development of tinnitus-related neuronal hyperactivity through homeostatic plasticity after hearing loss: a computational model. *Eur J Neurosci* 2006;23(11):3124-3138.
- (152) Cai S, Ma WL, Young ED. Encoding intensity in ventral cochlear nucleus following acoustic trauma: implications for loudness recruitment. *J Assoc Res Otolaryngol* 2009;10(1):5-22.
- (153) Syka J, Rybalko N. Threshold shifts and enhancement of cortical evoked responses after noise exposure in rats. *Hear Res* 2000;139(1-2):59-68.
- (154) Syka J. Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. *Physiol Rev* 2002;82(3):601-636.
- (155) Graham CE, Basappa J, Turcan S, Vetter DE. The cochlear CRF signaling systems and their mechanisms of action in modulating cochlear sensitivity and protection against trauma. *Mol Neurobiol* 2011;44(3):383-406.
- (156) Rybalko N, Bures Z, Burianova J, Popelar J, Grecova J, Syka J. Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. *Physiol Behav* 2011;102(5):453-458.
- (157) Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 2009;29(45):14077-14085.
- (158) Park SN, Back SA, Park KH, Seo JH, Noh HI, Akil O, et al. Comparison of functional and morphologic characteristics of mice models of noise-induced hearing loss. *Auris Nasus Larynx* 2013;40(1):11-17.
- (159) Vazquez AE, Jimenez AM, Martin GK, Luebke AE, Lonsbury-Martin BL. Evaluating cochlear function and the effects of noise exposure in the B6.CAST+Ahl mouse with distortion product otoacoustic emissions. *Hear Res* 2004;194(1-2):87-96.
- (160) Jamesdaniel S, Hu B, Kermay MH, Jiang H, Ding D, Coling D, et al. Noise induced changes in the expression of p38/MAPK signaling proteins in the sensory epithelium of the inner ear. *J Proteomics* 2011;75(2):410-424.
- (161) Lapsley Miller JA, Marshall L, Heller LM. A longitudinal study of changes in evoked otoacoustic emissions and pure-tone thresholds as measured in a hearing conservation program. *Int J Audiol* 2004;43(6):307-322.
- (162) Attias J, Horovitz G, El-Hatib N, Nageris B. Detection and Clinical Diagnosis of Noise-Induced Hearing Loss by Otoacoustic Emissions. *Noise Health* 2001;3(12):19-31.
- (163) Nordmann AS, Bohne BA, Harding GW. Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hear Res* 2000;139(1-2):13-30.

- (164) Sanchez-Calderon H, Milo M, Leon Y, Varela-Nieto I. A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear. *Int J Dev Biol* 2007;51(6-7):557-570.
- (165) Camarero G, Villar MA, Contreras J, Fernandez-Moreno C, Pichel JG, Avendano C, et al. Cochlear abnormalities in insulin-like growth factor-1 mouse mutants. *Hear Res* 2002;170(1-2):2-11.
- (166) D'Mello SR, Borodezt K, Soltoff SP. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling *J Neurosci* 1997;17(5):1548-1560.
- (167) Lee KY, Nakagawa T, Okano T, Hori R, Ono K, Tabata Y, et al. Novel therapy for hearing loss: delivery of insulin-like growth factor 1 to the cochlea using gelatin hydrogel. *Otol Neurotol* 2007;28(7):976-981.
- (168) Li YH, Chen H, Guo MH. Therapeutic effect of insulin-like growth factor-1 injection into the inner ears through scala tympani fenestration on gentamicin-induced hearing loss in guinea pigs. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2008;28(2):200-203.
- (169) Nakagawa T, Ogino-Nishimura E, Hiraumi H, Sakamoto T, Yamamoto N, Ito J. Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids. *Otol Neurotol* 2012;33(6):941-946.
- (170) Yoshida N, Liberman MC. Sound conditioning reduces noise-induced permanent threshold shift in mice. *Hear Res* 2000;148(1-2):213-219.
- (171) Taylor RR, Nevill G, Forge A. Rapid hair cell loss: a mouse model for cochlear lesions. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008;9(1):44-64.
- (172) Forge A, Wright T. The molecular architecture of the inner ear. *Br Med Bull* 2002;63:5-24.
- (173) Ohlemiller KK. Reduction in sharpness of frequency tuning but not endocochlear potential in aging and noise-exposed BALB/cJ mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 2002;3(4):444-456.
- (174) Ohlemiller KK, Rosen AD, Rellinger EA, Montgomery SC, Gagnon PM. Different cellular and genetic basis of noise-related endocochlear potential reduction in CBA/J and BALB/cJ mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 2011;12(1):45-58.
- (175) Cui Y, Sun GW, Yamashita D, Kanzaki S, Matsunaga T, Fujii M, et al. Acoustic overstimulation-induced apoptosis in fibrocytes of the cochlear spiral limbus of mice. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268(7):973-978.
- (176) Murillo-Cuesta S, Contreras J, Zurita E, Cediell R, Cantero M, Varela-Nieto I, et al. Melanin precursors prevent premature age-related and noise-induced hearing loss in albino mice. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23(1):72-83.
- (177) Wikipedia. Endolinfa. Available at: <http://es.wikipedia.org/wiki/Endolinfa>. Accessed 17 de septiembre, 2013.

- (178) Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13(6):343-348.
- (179) Ohlemiller KK, Gagnon PM. Cellular correlates of progressive hearing loss in 129S6/SvEv mice. *J Comp Neurol* 2004;469(3):377-390.
- (180) Ohlemiller KK, Gagnon PM. Genetic dependence of cochlear cells and structures injured by noise. *Hear Res* 2007;224(1-2):34-50.
- (181) Cekaya A, Murillo-Cuesta S, Rodriguez-de la Rosa L, Cediel R, Contreras J, Avendaño C, Varela-Nieto I. IGF-I deficit predisposes to noise-induced hearing loss in mice. En: Abstract Book. 49th Workshop on Inner Ear Biology (IEB) and Symposium The Inner Ear in Translational Research: Closing the GAP toward Causal Treatment. 29-30 September-02 October; Tübingen. Germany, 2012.
- (182) Liu L, Wang H, Shi L, Almklass A, He T, Aiken S, et al. Silent damage of noise on cochlear afferent innervation in guinea pigs and the impact on temporal processing *PLoS One* 2012;7(11):e49550.
- (183) Bao J, Ohlemiller KK. Age-related loss of spiral ganglion neurons *Hear Res* 2010;264(1-2):93-97.
- (184) Zilberstein Y, Liberman MC, Corfas G. Inner hair cells are not required for survival of spiral ganglion neurons in the adult cochlea. *J Neurosci* 2012;32(2):405-410.
- (185) Harding GW, Bohne BA. Noise-induced hair-cell loss and total exposure energy: analysis of a large data set. *J Acoust Soc Am* 2004;115(5 Pt 1):2207-2220.
- (186) Robertson D. Effects of acoustic trauma on stereocilia structure and spiral ganglion cell tuning properties in the guinea pig cochlea *Hear Res* 1982;7(1):55-74.
- (187) Fredelius L, Wersall J. Hair cell damage after continuous and interrupted pure tone overstimulation: a scanning electron microscopic study in the guinea pig *Hear Res* 1992;62(2):194-198.
- (188) Raphael Y. Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration. *Br Med Bull* 2002;63:25-38.
- (189) Engström H, Ades HW, Andersson A. Structural pattern of the organ of Corti; a systematic mapping of sensory cells and neural elements. Baltimore: Williams & Wilkins Co; 1966.
- (190) Ehret G. Peripheral anatomy and physiology II. En: Willott JF, editor. *The Auditory psychobiology of the mouse* Springfield, Ill.: C.C. Thomas; 1983. p. 169-200.
- (191) Greenwood DD. Comparing octaves, frequency ranges, and cochlear-map curvature across species. *Hear Res* 1996;94(1-2):157-162.
- (192) Muller M. Frequency representation in the rat cochlea. *Hear Res* 1991;51(2):247-254.
- (193) Muller M, von Hunerbein K, Hoidis S, Smolders JW. A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res* 2005;202(1-2):63-73.

(194) Choudhury B, Adunka OF, Demason CE, Ahmad FI, Buchman CA, Fitzpatrick DC. Detection of intracochlear damage with cochlear implantation in a gerbil model of hearing loss. *Otol Neurotol* 2011;32(8):1370-1378.

(195) Lang H, Li M, Kilpatrick LA, Zhu J, Samuvel DJ, Krug EL, et al. Sox2 up-regulation and glial cell proliferation following degeneration of spiral ganglion neurons in the adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 2011;12(2):151-171.

8. ANEXO

MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN PARA LA REVISTA JARO (BACK TO BACK)

Sanz L, Murillo-Cuesta S, Cobo P, Cediel R, Varela-Nieto I, Rivera T, Avendaño C. **Functional and anatomical characterisation of high frequency-enriched swept-sine noise-induced hearing loss mouse model.**

Murillo-Cuesta S, Rodríguez-de la Rosa L, Sanz L, Camarero G, Avendaño C, Varela-Nieto I, Rivera T. **Reducing noise-induced hearing loss by peptides targeting Transforming Growth Factor- β 1.**

Drug Delivery to the Inner Ear: Strategies and Their Therapeutic Implications for Sensorineural Hearing Loss

Teresa Rivera^{1,2,*}, Lorena Sanz^{1,2}, Guadalupe Camarero^{2,3} and Isabel Varela-Nieto^{2,3,4}

¹University Hospital Prince of Asturias, University of Alcalá, Ctra. Alcalá-Meco s/n, 28805 Alcalá de Henares Madrid;

²Centre for the Biomedical Research Network on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Alvaro de Bazan 10, 46010 Valencia, Spain; ³Institute of Biomedical Research Alberto Sols (CSIC-UAM), Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain;

⁴IdiPAZ, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain

Abstract: Hearing aids or cochlear implants constitute almost exclusively the treatment options currently available to patients suffering from sensorineural hearing loss and related conditions, such as noise-induced hearing loss, ototoxicity or autoimmune inner ear disease. While some systemic treatments exist, they generally exert adverse secondary effects and their efficacy is hampered by the blood-cochlear barrier that limits drug access to the inner ear. Hence, the new therapies that are being developed for hearing loss focus on strategies for direct drug delivery to the inner ear. The passive and active methods for local delivery can be categorized into two general groups: intratympanic or intracochlear. The intratympanic approach is a non-invasive method that preserves hearing and takes advantage of the permeability of the round window to gain access to the cochlea. However, this technique is limited by not knowing the dose of the drug that reaches the cochlea, (a handicap which might be overcome by the use of tagged drugs). While direct access to the inner ear by intracochlear administration avoids this problem, this method requires surgery. Currently, laboratory animals are being used to explore which therapeutic approaches are best suited to address this problem. These include cochleostomy and the insertion of devices that pump drugs into the inner ear without inducing cochlear damage. In this article, we review the different techniques under evaluation in animal models of deafness, and their potential use for drug delivery and treatment of human inner ear diseases.

Keywords: Sensorineural deafness, intratympanic, intracochlear, local therapy, mutant mice, microcatheter, round window, osmotic pump, cochleostomy.

INTRODUCTION

Hearing impairment is a significant health-care problem with tremendous socio-economic impact. Approximately 10% of the population suffers hearing difficulties, increasing to over 25% for individuals over the age of 65. In children, early hearing loss affects language acquisition, while acquired hearing loss in adults impairs social integration [1].

The sense of hearing depends upon the integrity of the sensory epithelia in the inner ear and when this tissue is disrupted, hearing loss occurs [2]. Hearing deficits are generally associated with the loss of the sensory "hair" cells and/or neurons due to primary genetic defects or secondary to environmental factors, including ototoxic damage, noise trauma, ageing or interactions between these factors [3] (Fig. (1)). Indeed, hearing loss due to noise trauma represents the third most common occupational disease, and the impact of hearing impairment is continuously growing due to increases both in noise pollution and in the average age of the population [4]. There are currently no specific pharmacological treatments for sensorineural hearing loss and thus, the clinical options are based on the use of prostheses, including hearing aids, cochlear implants, middle ear implantable devices and osseointegrated implants.

Given these limited treatment options, several new lines of research are directed towards the development of treatments to preventive and reparative strategies for sensorineural hearing loss, especially that of cochlear origin. Most of the cochlear and spiral ganglia cells share a common developmental origin in the otic placode. As such, much interest has focused on the growth and transcription factors that modulate the early development of the inner ear. This developmental information is expected to provide clues for the design of new therapeutic approaches based on trophic factors and the generation of otic cells [5-8]. Moreover, systemic treatments appear to have limited efficacy for such approaches since the cochlear blood-brain barrier limits drug passage to the inner ear, requiring the use of high doses that are associated with a large number of adverse side effects. Consequently, there has been considerable interest in the development of treatments that can be locally administered to the inner ear using either intratympanic or intracochlear routes of administration. Several such approaches are currently being explored in animal models and some intratympanic treatments are widespread clinical use gentamicin instillation to treat Meniere's disease and of corticosteroids to treat immune-mediated inner ear disease, sudden deafness and Meniere's disease.

Here, we describe several forms of sensorineural hearing loss that could benefit from the local administration of drugs, and we discuss the different methods available for local drug delivery to the inner ear.

*Address correspondence to this author at the University Hospital Prince of Asturias, University of Alcalá, Ctra. Alcalá-Meco s/n, 28805 Alcalá de Henares Madrid, Spain; Tel./Fax: +34918801825; E-mail: trivera.hupa@salud.madrid.org

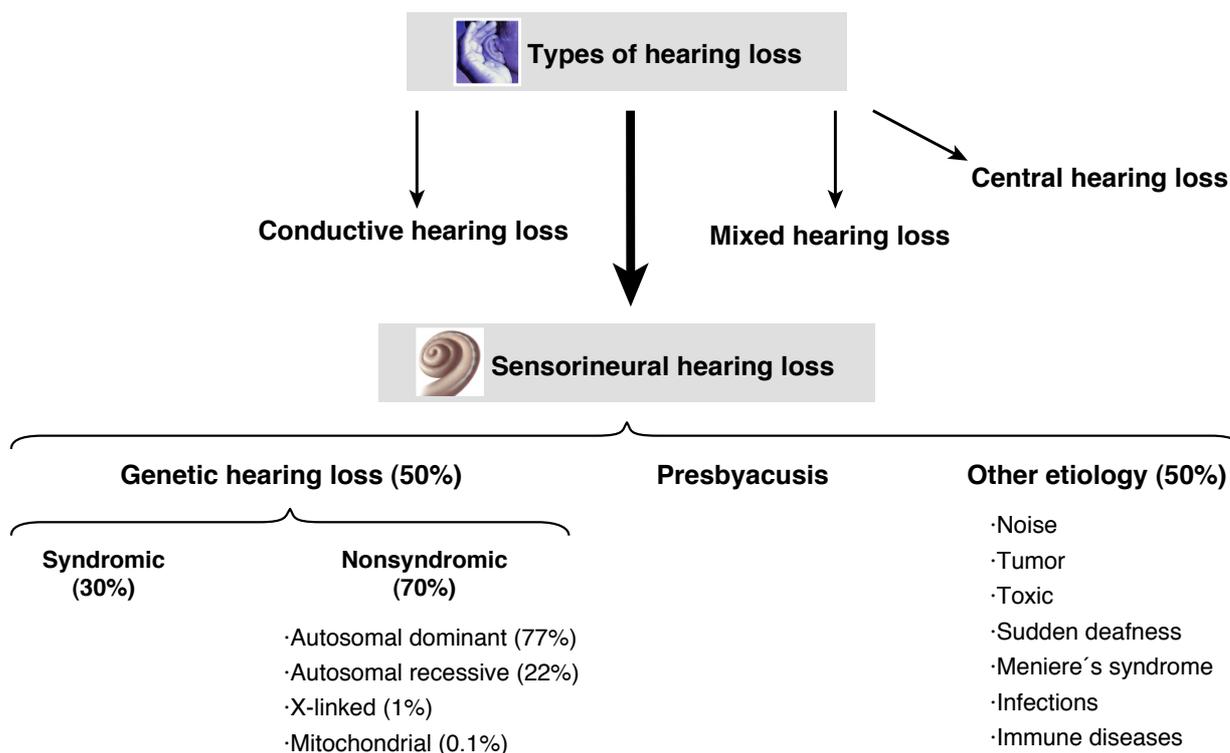


Fig. (1). Classification of hearing loss and associated aetiology.

SENSORINEURAL HEARING LOSS

Local drug administration has considerable potential to treat sensorineural hearing loss of primarily cochlear origin, including ototoxic-induced damage, immune-mediated inner ear disease, sudden deafness, noise-induced hearing loss, presbycusis and some vestibular diseases that can also affect the cochlea (e.g., Meniere's disease).

Ototoxicity

Many substances, pharmaceuticals and industrial chemicals can exert toxic effects on the inner ear and toxicity can also occur as a side effect of certain metabolic diseases. Among the main ototoxic drugs currently known, we can find:

a) Aminoglycoside Antibiotics

These are water-soluble drugs that are mainly effective in the treatment of infection caused by Gram-negative bacteria. These compounds are toxic to both vestibular and cochlear hair cells, and while streptomycin and gentamicin preferentially target vestibular hair cells, neomycin, kanamycin and amikacin primarily damage cochlear cells [9,10]. Auditory and vestibular toxicity is caused by the progressive accumulation of the toxin in the perilymph and endolymph of the inner ear, the result of active transport through the vascular stria. Moreover, the half-life of the toxins in the labyrinthine fluids is five to six times higher than in the plasma. However, it is unclear if the levels of aminoglycoside accumulation are directly related to their effects on inner hair cells [11] and indeed, concentrations in the perilymph were found to be similar to those obtained in other undamaged organs,

such as the heart or lungs [12]. The toxicity of these compounds also damages the stria vascularis, thereby compromising endolymph homeostasis and causing sensory cell injury secondary to an imbalance of cochlear homeostasis. Upon cochlear insult, the outer hair cells are the first elements affected, with damage progressing toward the apex, and from the inner to the outer row of outer hair cells. Subsequently, the inner hair cells and the supporting cells are damaged, followed by retrograde damage of the auditory nerve. Nevertheless, the incidence of cochlear insult in humans is not well established and it is reported to range from 2.5-20%.

b) Erythromycin

This antibiotic can cause reversible hearing loss in humans, primarily affecting conversational and high frequencies. Ototoxicity is believed to occur through the central auditory pathway [13].

c) Loop Diuretics

Furosemide and bumetanide are among the most common examples of this type of compound that act on the epithelial cells of Henle's loop where they inhibit the reabsorption of Na^+ , K^+ and Cl^- ions by the Na^+/K^+ pump. These diuretics cause an increase in the Na^+ concentration and a decrease in K^+ ions in the endolymph, and they can also inhibit ion transport at the stria vascularis [14]. At the histopathological level, loop diuretics produce interstitial oedema of the stria vascularis, along with a decrease in the numbers of intermediate cells and an increase in the volume of marginal cells.

d) Salicylates

These are stored in almost all body tissues, and they are biotransformed in the liver and excreted by the kidneys. The use of doses higher than 6-8 g/day can cause ototoxicity. These compounds reach the cochlea quickly, attaining maximum concentrations in the perilymph about 2 hours after administration [15]. Associated histopathological effects are observed at the vascular (bleeding inside the semicircular canals and organ of Corti, vasoconstriction of the capillaries in the stria vascularis) and cellular levels (destruction of outer hair cells and impaired mitochondrial stria cells).

e) Cisplatin

This is an antineoplastic agent that is effectively incorporated by the stria vascularis and that exhibits uptake into the organ of Corti, exerting toxic effects on the marginal cells. Outer hair cells are the first to be affected, mainly at the level of the basal turn of the cochlea. Subsequently, the cilia of the outer hair cells eventually disappear and the supporting cells are also damaged, although inner hair cells are not usually affected. Cisplatin also negatively affects the cochlear nerve, and cisplatin-induced hearing loss is bilateral and can appear during treatment administration or years later. Responses in the high frequency range are initially affected and damage is usually permanent, although some cases of partial or even complete recovery have been described [16].

f) Industrial Ototoxicity

This occurs following exposure to organic solvents used for industrial purposes in the manufacture of paints, varnishes, solvents and glues, as well as others used in petrol blends, such as benzene. These solvents damage the outer hair cells and alter cochlear micromechanics [17]. Indeed, carbon monoxide primarily produces deafness as a result of the neurological sequelae triggered by the elevated levels of carboxyhemoglobin that accumulate [18]. Heavy metals such as arsenic are frequently found in insecticides or rodenticides, and they too can lead to degeneration of the stria vascularis followed by hair cell loss.

g) Cellular Stress Secondary to Metabolic Diseases

Hyperbilirubinemia and alterations in glucose metabolism are among the toxic endogenous stresses that can cause hearing loss. Hyperbilirubinemia is a risk factor for neonatal hearing loss, and high levels of bilirubin in the basal ganglia are toxic and cause bilateral severe to profound sensorineural hearing loss. In diabetes mellitus, cochlear microangiopathic changes [19] are associated with poor blood supply, leading to the degeneration of spiral ganglion neurons, auditory nerve fibers and the sensory cells of the organ of Corti. Neurophathy is also associated with several vascular disorders.

Immune-Mediated Inner Ear Disease

Immune-mediated inner ear disease can occur as either an organ-specific or systemic disorder. Inner ear disease may occur due to an autoimmune reaction against the membranous labyrinth proteins themselves, or as a host defence reaction against infection, tumours or toxins. It can occur second-

dary to a systemic disorder, either as a direct effect (e.g., the production of autoantibodies against inner ear antigens in other organs) or indirectly through the trapping of circulating immune complexes, which alter local biochemical phenomena or cause inflammatory destruction of blood vessels (vasculitis) in the inner ear [20]. This form of hearing loss exhibits a progressive or fluctuating pattern, and it is usually asymmetrical, with or without associated vertigo. Occasionally it is accompanied with elevated ear pressure and tinnitus, and while it normally develops progressively over weeks or months, hearing loss may also occur suddenly. Medium or high doses of glucocorticoids remain the treatment of choice for almost all autoimmune diseases, either alone or in combination with cytotoxic drugs [21]. The administration of these glucocorticoids is typically systemic, either oral or parenteral, and when systemic use is contraindicated or these compounds are used as a rescue therapy, the intratympanic route of administration is typically employed.

Sudden Deafness

Sudden deafness is defined as sudden sensorineural hearing loss that develops in less than 72 hours, with a loss of over 30 dB in at least three consecutive frequencies in tone audiometry tests, and with no previous otologic history [22-24]. Several theories have been proposed to explain idiopathic sudden deafness, the most documented of which is the viral theory [25]. However, specific serological profiles have not been described [26] and there is no evidence of positive responses to antiviral treatments such as acyclovir [27]. Alternatively, the impact of disturbing inner ear microcirculation was proposed on the basis of some prethrombotic genetic susceptibility [28], while the incidence of sudden deafness may augment among patients with cardiovascular risks of different aetiologies [29]. The involvement of the immune system has also been proposed based on pathological studies, spontaneous recovery and the response to steroid treatment [23, 24, 30-33]. Several different causes of sudden deafness have been described [22-24], including inflammation (viruses, bacteria, syphilis), vascular and haematological (anaemia, stroke) trauma, immune-mediated diseases (Cogan's disease, scleroderma, ulcerative colitis, sarcoidosis), endolymphatic hydrops or Meniere's disease, diabetes, ototoxicity, bone disease of the otic capsule, meningitis, multiple sclerosis and acoustic neuroma. The effects on hearing can vary considerably, affecting only a specific region of the cochlea, or resulting in alterations at all frequencies. Treatment is based on the application of systemic steroids, usually taken orally, occasionally supported by intratympanic corticosteroid administration as a rescue therapy [22]. It was demonstrated recently that topic application of insulin-like growth factor (IGF-1) using gelatin hydrogels is well tolerated and may aid hearing recovery in patients with sudden sensorineural hearing loss that is resistant to systemic glucocorticoids [34]. IGF-I is a trophic factor that improves cell function in many physiological scenarios. Indeed, its promise as a therapy for hearing loss is based on the fundamental role of IGF-I in inner ear development and function [35, 36], although its therapeutic potential must be further demonstrated.

Noise-Induced Hearing Loss

Otologic injuries caused by acoustic insults are often occupational diseases that are accompanied by the common sequelae of hearing loss [37]. The ear damage resulting from exposure to excessive noise is known as acoustic trauma when the lesions are irreversible or listening fatigue in the case of reversible lesions. Listening fatigue provokes alterations in outer hair cells due to acoustic over-stimulation and persistent or very intense loud noise can result in irreversible acoustic trauma, which is classified as acute or chronic. Acute acoustic trauma causes sudden and severe hearing loss within a few minutes, accompanied by severe tinnitus that usually ameliorates with time. The associated hearing loss mainly affects the 4,000 Hz frequency, although if noise exposure persists, this can be extended to affect higher acute frequencies, and even up to 20,000 Hz, eventually affecting all frequencies. Excessive sound pressure produces extreme vibration of the cochlear mechanical system, mainly provoking damage to the external and internal hair cells at the basal turn of the cochlea. By contrast, chronic acoustic trauma is caused by persistent exposure to noise, which can be harmful to hearing upwards of 80 dB, depending on the exposure time.

Other factors that affect the degree of cochlear damage include a combination of genetic predisposition and environmental influences. Thus, the extent of noise-induced damage is related to the individual's susceptibility due to genetic factors [38], age [39], pre-existing ear disease [40] and nutritional deficiencies such as vitamin B12 [41]. Exposure to excessive noise is associated with an increase in oxidative metabolism, increased oxygen consumption and the production of toxic free radicals [42-45]. Currently, the only available treatment for this form of hearing loss involves the use of hearing aids. Animal models of otic damage caused by noise exposure have been developed to study this phenomenon, taking into account the different ranges of frequencies at which rodents hear [46].

Presbycusis

Presbycusis, or age-related hearing loss is the most common form of hearing loss, affecting 40% of individuals over 65 in whom it is the most prevalent neurodegenerative disease [47]. The prevalence of presbycusis is thought to be growing exponentially, due to the lack of preventive treatment for hearing loss and the increasingly ageing population. Presbycusis has a significant impact in the elderly as it decreases their ability to communicate and limits their autonomy and social participation. Presbycusis is classified as: sensory (loss of outer hair cells), neural (loss of spiral ganglion cells), metabolic (strial atrophy), or mixed and indeterminate cochlear conductive or mechanical (stiffness of the basilar membrane) that accounts for over 25% of cases [48-50]. In addition to affecting the peripheral organ, presbycusis can also cause alterations of a central origin (central presbycusis), and it may even involve altered middle ear behaviour (conductive presbycusis).

Several factors have been related to the pathogenesis of presbycusis, including genetic factors [51], age-related cellular processes, environmental factors and associated diseases. While human genetic factors have not been clearly identi-

fied, alterations to the *ahl* gene (age related hearing loss) located on chromosome 10 have been described in C57 mice [52], and in the cadherin 23 protein that is expressed in hair cell stereocilia [53]. Acquired mitochondrial mutations are also thought to contribute to presbycusis [54]. Recently, we described premature hearing loss in the NMRI mouse, a model of oculocutaneous human albinism (OCA1), when compared with transgenic mice in which melanin synthesis has been rescued [55]. Finally, IGF-I levels decrease with age in both mice and humans, a phenomenon that appears to be correlated with hearing loss in a mouse model that exhibits stria vascularis degeneration and cochlear neuron loss [56]. Screening of ENU-generated mouse mutants with hearing or vestibular phenotypes has furthered our knowledge of genetic deafness [57]. Several age-associated cellular changes occur in the cochlea, including decreased proliferation of spiral ligament fibrocytes and stria vascularis cells [58]. Moreover, cochlear sensory cells, neurons and hair cells are not replaced in adult mammals. Hence, the repair and maintenance of these cells is critical for hearing. These processes may be intrinsically limited by the state of the mitochondria, which is central to the production of energy, and the generation of free radicals as metabolic by-products. Thus, the loss of cochlear sensory cells with age may be the result of accumulated mitochondrial damage, which leads to decreased function and increased production of free radicals as part of an accelerating age-related cycle of deterioration [59]. The environmental factors most associated with presbycusis are related to noise exposure.

Meniere's Disease

The aetiology of Meniere's disease is unknown, although it is characterised by endolymphatic hydrops that occurs due to the dysfunction of type I and II of spiral ligament fibrocytes. The resulting alteration in the recycling of potassium causes an osmotic imbalance and an expansion of the endolymphatic compartment [60]. Symptoms include episodes of spontaneous recurrent vertigo accompanied by fluctuating hearing loss and intermittent tinnitus. The hearing loss is sensorineural and initially, it usually affects the low frequencies before subsequently impacting on other frequencies. Treatment of Meniere's disease involves the intratympanic administration of gentamicin and corticosteroids in order to control episodes of vertigo, with generally good results.

COCHLEAR PHARMACOKINETICS

The anatomy of the cochlea and the difficulties inherent to the *in situ* analysis of this organ have hampered the accumulation of relevant pharmacokinetic data. However, it is plausible that the pharmacokinetic processes occurring at the systemic level in the human body after administration of a drug are similar to those that occur in inner ear fluids. As such, the same parameters should be considered for efficient treatment in both scenarios, namely liberation, absorption, distribution, metabolism and elimination [61].

Liberation refers to the release of the drug under study as a function of the dose administered. Current efforts in the field of drug delivery therapies, specifically those targeting the inner ear, are focused on the development of drugs and

drug carriers that allow controlled release over a specific time period. Several sustained release formulations have been developed in recent years, including liposomes, biodegradable microspheres loaded with drugs and drug-polymer conjugates, nanoparticles, gels, etc [62, 63]. The release of drugs into the cochlea through the perilymph and endolymph, is influenced by concentration gradients, physical and Chemicals factors such as temperature and pH [61].

Absorption refers to the uptake of the drug at the site of administration and its entry into the inner ear fluid. Moreover, the extracellular fluid spaces of the ear exhibit different pharmacological characteristics (Fig. (2)). The perilymph is a fluid with a similar composition to cerebrospinal fluid that is mainly produced locally through the vascular supply to the cochlea, providing a favourable environment for the function of sensory cells and neurons. The endolymph is a fluid that has a high concentration of potassium ions that provide the electrochemical basis for sensory cell function. The endolymph is mainly produced in the stria vascularis and it is secreted by marginal cells of the stria vascularis to the scala media. The extracellular fluid of the cochlear bone represents the transition between the systemic circulation and perilymph. Most of the structures of the cochlea are protected from the systemic circulation by the haematoencephalic barrier, a continuous capillary endothelium of blood vessels and the main element influencing drug absorption. Systemic circulation is largely confined to the stria vascularis, vessels and capillaries. Thus, drugs entering through systemic circulation would be expected to be distributed both inside and outside the capillary endothelium; into the perilymph via the marginal cells of the stria vascularis and the capillary wall of the scala media; although this might reduce the endocochlear potential [62]. The vascularity of the rest of the cochlea is

relatively poor, with the exception of the modiolus and the walls of the scala tympani [64]. The endothelial cells lining the vessels are connected by tight junctions without fenestrations [65,66]. The properties of the drugs themselves also significantly influence their absorption. For example, high molecular weight drugs with high liposolubility or negative charges can spread more passively than drugs with positive charges. Drugs with high protein binding are less likely to cross. The unusual positive potential in the scala media poses an additional constraint for drug entry. Drugs that are positively charged tend not to enter the scala media since the electrical gradient of endocochlear potential works against them.

Distribution refers to the process by which drugs pass through different fluid compartments (perilymph and endolymph), and how they spread from the fluid spaces to the different tissue compartments of the inner ear. Upon entering the cochlear fluid, drugs are distributed potentially homogeneously throughout the perilymph, and thus, they can diffuse into the organ of Corti, which contains the hair cells, nerve terminals and other specialized cells. The spiral ganglion and structures within the modiolus of the cochlea are also bathed in perilymph, allowing continuous diffusion. Drug distribution along the length of the cochlea and within the inner ear depends on the point of drug entry, which may be the scala tympani, near the round window niche and the oval window. The inter-scala distribution is highly dependent upon the particular drug administered [67, 68].

Drug distribution in the inner ear can be subdivided into radial and longitudinal processes [65]. Most drugs administered by intratympanic techniques act at the round window niche, entering the cochlea by diffusion through the round

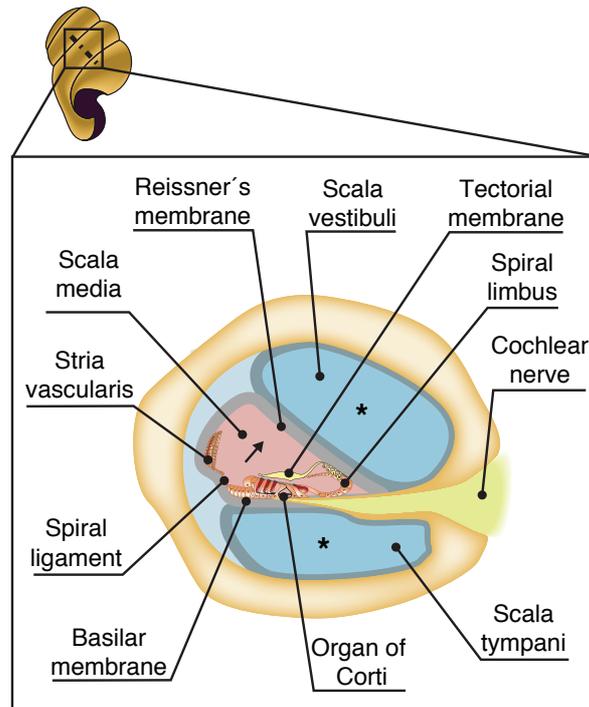


Fig. (2). Schematic representation of a section of the cochlea showing the three scala.
 * drug distribution of through the perilymph to capillary endothelium of blood vessels.
 ↑ systemic administration is largely confined to the stria vascularis

window and dispersion through the scala tympani. The transfer of substances through the round window to the scala tympani of the inner ear primarily appears to be a passive process. This process also involves communications between the round window, the scala and the vascular systems of the endothelial cells [62, 66]. Drugs administered by intracochlear methods do not act directly at the round window and drug distribution occurs longitudinally. The diffusion of the drug along the scala tympani and vestibule occurs through the helicotrema, at the cochlear apex, and by the open communication between the basal part of the scala vestibuli and the vestibulum [67]. Thus, drugs can be distributed over greater distances through round window niche, scala tympani and longitudinal process.

Finally, metabolism is the chemical transformation of drugs into active groups or compounds that are more easily removed. Clearance is the removal of drugs or their metabolites from the inner ear. Drug metabolism and elimination is specific to each compound and some of the same barriers that limit drug entry also limit their clearance, such as tight junctions. Furthermore, the intracochlear plasma contains enzymes of the esterase family that may alter the structure of the drugs that enter the perilymph [69].

METHODS OF LOCAL ADMINISTRATION

Local therapy in the inner ear of humans was first used more than half a century ago for the treatment of Meniere's disease with local anaesthetics [70,71]. Since then, it has been widely used for the treatment of vestibular symptoms associated with this disease through the local application of gentamicin [72, 73]. In addition to aminoglycosides and anaesthetics, a variety of drugs have been administered by application to the human round window niche, including neurotransmitters for tinnitus, monoclonal antibodies for autoimmune diseases of the ear or inhibitors of apoptosis (AM-111) for noise-induced hearing loss [74]. However, the most common use of local drug application in the inner ear is for glucocorticoid administration for the treatment of Meniere's disease [75], sudden deafness [76-78], autoimmune disease inner ear [79] and tinnitus [80]. The corticosteroids most frequently used in humans are dexamethasone, methylprednisolone and hydrocortisone, of which methylprednisolone shows the best diffusion through the round window [81-84]. Intratympanic administration of corticosteroid achieves a higher cochlear dose compared to safe dosing via systemic, oral or intravenous administration [85]. Corticosteroids decrease the response of non-lymphoid inflammatory cells such as neutrophils, macrophages and mast cells, as well as decreasing the activity of T and B cells, protecting the fibroblasts and the endothelial cells. On the other hand, some corticosteroids exert a regulatory effect on the Na^+/K^+ -ATPase enzyme in the stria vascularis, which plays an important role in regulating intracochlear water balance [86].

In addition to the concentration and pharmacokinetic characteristics of the drugs themselves, several additional factors influence the level of drug that reaches the perilymph. These include the permeability of the round window niche (which in turn is affected by fibrosis at the niche), the speed with which the drug is eliminated from the round win-

dow, the local pH and temperature, the diffusion of the drug through the mucosa of the middle ear and temporal bone spaces, and drug absorption through the eustachian tube. One key parameter influencing drug concentration is the duration of contact between the drug and the round window niche [87]. This variable is particularly difficult to control, often necessitating the use of high drug doses [78,88] and underscoring the current need to develop new materials for controlled drug administration.

Several methods are used to deliver drugs into the inner ear, classified primarily according to the site at which the drug is introduced (*i.e.*, intratympanic or intracochlear: (Fig. (3)). Additionally, these methods can be classified as passive or active, depending on the mode of drug dissemination. Intratympanic administration involves less surgical trauma than the intracochlear route, as surgical access to the middle ear is relatively simple and general anaesthesia is not required. Several such approaches are currently under development, although they have only been tested in laboratory animals to date.

Intratympanic Administration

Local drug application at the round window niche through minimally invasive surgery or injection through the eardrum can be achieved by several different methods. Drugs can be administered directly to actively penetrate the round window niche or indirectly via the middle ear, using carriers that permit passive diffusion. Different protocols for active intratympanic application can involve a single direct injection (one-shot), repeated injections (three times per week) or continuous application through a microcatheter [74,89]. Despite the increased cochlear drug concentrations and the reduced side effects associated with local therapy as opposed to systemic delivery methods [87,89], several major impediments to the development of controlled and reproducible intratympanic administration remain. The limitations of direct intratympanic injection include limited control of the residence time and the local concentration of the drug administered, which is affected by the exact site of infusion, the presence/absence of residual fluid in the middle ear and the permeability of the eustachian tube [74]. To overcome these problems, several devices have been developed for sustained drug release at the round window, including microcatheters, acetate wicks and semi or fully implantable osmotic infusion pumps. In turn, these strategies can be divided into two groups, depending on whether application is directly to the round window niche or into the middle ear.

a) Direct Action at the Round Window Niche

Round window microcatheters (M-Cath™ and e-Cath™) are available in different diameters for drug infusion or fluid extraction, and they contain an electrode to monitor signals from the ear. The tip of the catheter system is compressible and it is designed specifically to block the round window niche [78, 90-92] (Fig. (3)).

Polyvinyl acetate wicks (MicroWick Silverstein™) are strips of 1 mm in diameter and 9 mm in length, which absorb the externally administered medication and transport it directly to the round window. These strands are inserted through a vent pipe passing through the tympanic membrane

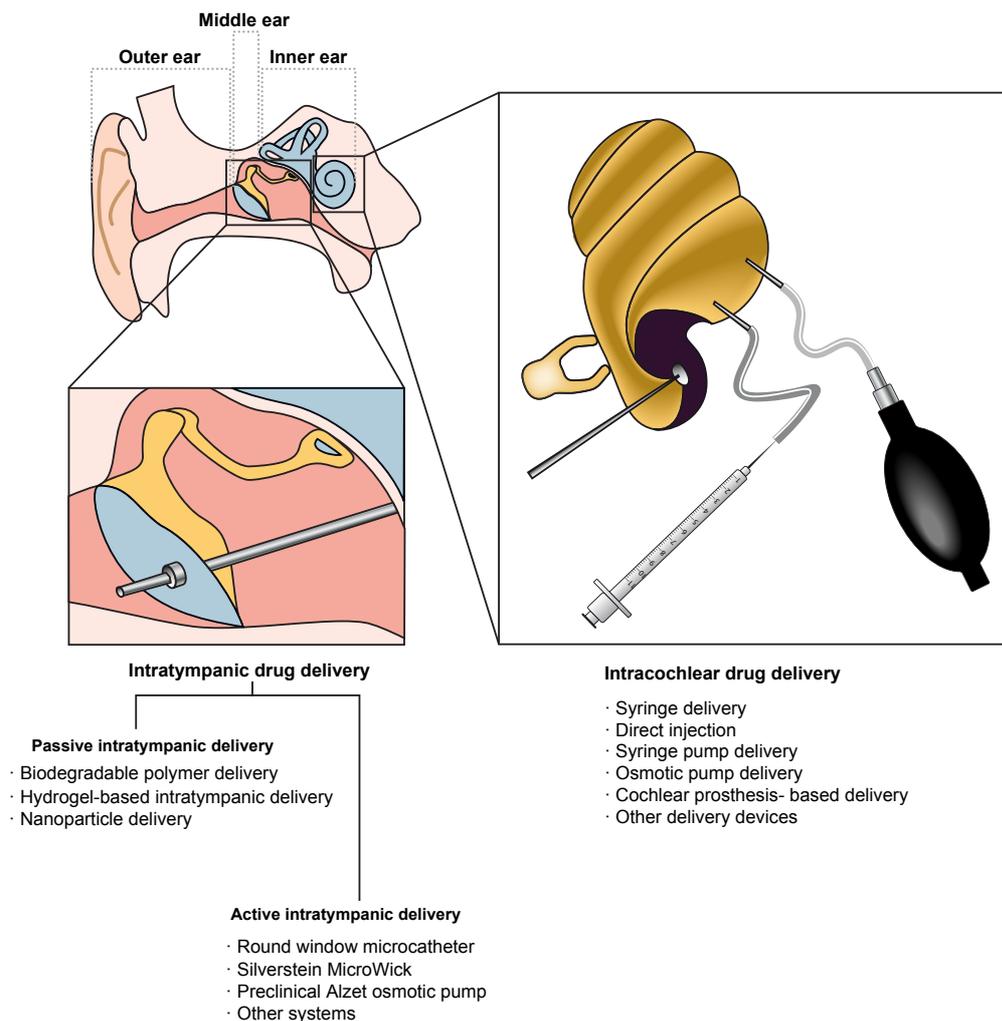


Fig. (3). Schematic representation of the ear showing the two strategies described for local drug delivery: intratympanic and intracochlear.

after myringotomy, a procedure that can be performed under local anaesthesia. In humans, this approach was first used to administer gentamicin to treat the vertigo crisis associated with Meniere's disease [93]. Subsequently, it has been used to administer dexamethasone to treat sudden deafness and immune-mediated inner ear disease [93, 94]. Before selecting this procedure certain considerations should be taken into account, including earwax removal, the extrusion of the ventilation tube and the interactions with topical antibiotics in cases of otorrhea.

The permanence time of an actively administered drug can be increased in the presence of polymers or other compounds in the round window [95, 96]. Drugs can be administered within matrices or contained in deposits with layers of polymers or nanoparticles. These are known as passive methods, despite acting on the round window. Drug administration via hydrogels may facilitate drug access to the inner ear, although these gels are influenced by a number of factors including chemical (pH, ionic bonds or the presence of certain molecules) and physical reactions (such as temperature, pressure or electrical potential). These factors will affect how the hydrogel releases the drug, and those used for the treatment of inner ear diseases should be biodegradable, often consisting of hyaluronic acid or glutaraldehyde poly-

mers combined with collagen [97-99]. Moreover, it is important to note that maintaining the concentration of the drug depends on the specific kinetics of polymers and the degradation characteristics of the carrier [99-101]. The first biodegradable polymer system used for drug administration consisted of a polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and a gelatin sponge complex (Gelfoam®) or alginate polymers. Gentamicin-soaked Gelfoam provides optimal results in reducing vertigo and tinnitus [100].

The use of nanoparticles has emerged as a promising new strategy for sustained and controllable drug delivery to the inner ear. The procedure used for application in the round window niche is similar to that described above, although to date these techniques have only been tested in laboratory animals. Nanoparticles can consist of biodegradable or non-biodegradable materials, depending on the application and the desired pharmacokinetic profile. Nanoparticles have a diameter ranging typically up to 300 nm and they are prepared from a range of material types and through a variety of methods – one example being a 50/50 ratio of lactic acid and glycolic acid. The drug of choice is introduced into this matrix for delivery into the inner ear. Silica matrices containing a dispersion of electromagnetic molecules have also been used for this purpose. Once exposed to magnetic fields, these

molecules indicate the exact location of the deposits within the turns of the cochlea [102, 103]. Nanoparticles have been investigated as an alternative to viral vector systems, the latter of which are considered to be promising for the treatment of diseases of the inner ear but are limited by biosafety issues, and they do not allow accurate cellular and tissue-specific delivery. Liposomes are also used as drug delivery vehicles and they represent a promising system for gene therapy methods, particularly as they can be mixed with DNA to transfect numerous cell types and they can be introduced into the cochlea by microinjection [103, 104]. In most of these cases, the presence of the drug within the cochlea can be demonstrated by immunohistochemistry.

b) Indirect Action at the Round Window Niche through Drug Application to the Middle Ear

Implantable osmotic pumps provide a steady, continuous and controlled supply of drugs, and they are minimally invasive due to their small size (Alzet, TI-DDS[®]) [105-107]. In general, access to the round window is achieved via a hole in the bulla (bullostomy), allowing placement of either the pump itself or a microtube connected to a reservoir implanted subcutaneously [105]. The pump typically holds a volume of 100µl, 200µl or 2 ml with flow rates ranging from 0.11 to 10 l/h. The pump has an outer semi-permeable membrane surrounded by an osmotic conductive agent, which in turn houses an impermeable drug reservoir. The entry of water into the chamber of the osmotic agent exerts pressure on the reservoir of the drug, which is then forced out through the cannula [102, 105, 107]. Depending on the model, these pumps allow 1 day to 6 weeks of continuous infusion (Alzet[®]). To date, this approach has only been used in animals to investigate novel therapies.

Despite the significant advances in this field [67, 78, 108, 109], further progress is hindered by the inability to define standard operation procedures to recover and analyse fluid samples from the inner ear during preclinical studies in animals. Indeed, most of the results from clinical studies do not include the measurement of drug concentration at the round window or in the middle ear, rather using the rate of liquid clearance to estimate the approximate concentration. Even in preclinical animal experiments, the measurement of intracochlear drug concentrations is difficult. Thus, methods must be developed and improved further to efficiently quantify drug concentrations in both the medium and in the inner ear.

Intracochlear Administration

The second means of local drug administration to the inner ear is the intracochlear method (Fig. (3)), which produces better drug bioavailability (the percentage of drug that enters the inner ear) than extracochlear administration. Direct injection of drugs into the perilymph is expected to yield 100% bioavailability and as such, it is comparable to intravenous delivery. However, 100% bioavailability cannot be achieved by intracochlear administration due to leakage at either the site of application or at other sites of fluid exit, such as the cochlear aqueduct. While sealing the injection site in the otic capsule with bone powder, fat or fascia may be effective, the possibility that leakage will affect the perilymphatic drug concentration should be borne in mind [87, 89] (Table 1).

Intracochlear methods create a means of access by puncture through the round window or by cochleostomy, and they do not involve significant drug activity at the round window niche. Access to the cochlea has also been described via surgery of the most medial part of the lateral semicircular canal, and even in the endolymphatic sac [89], allowing the drug to be distributed via the capillary endothelium of blood vessels to the organ of Corti and stria vascularis. A variety of tools for these procedures has recently been developed for pre-clinical studies, including syringes, osmotic pumps and other devices. A simple method for drug delivery to the inner ear involves the direct injection of drugs into the cochlea using a syringe [74,87], which allows the pharmacological effects to be studied without complications. This method has been used both in clinical studies and animal research. Currently, direct intracochlear injection has been used clinically prior to electrode insertion of cochlear implants, in a research study. Direct injection has the potential to disrupt endolymph homeostasis and should be limited to cases where hearing does not depend on this. The trauma generated by the electrode along the scala tympani provokes reactive fibrosis that can increase electrode impedance. Direct injection of steroids at the time of insertion of the prosthesis reduces fibrosis and ensures the optimal performance of the implant [110,111]. Direct drug administration has also been used in laboratory animals after cochleostomy to explore the transfer and effects of new therapies for the inner ear [112-114], such as when using adenoviruses, liposomes with DNA plasmids, glutamate antagonists and inhibitors of the apoptotic cascade, like the Jun-N-terminal kinase antagonist, D-JNKI-1 [78,87,113]. A variation on the direct injection method involves sealing the

Table 1. Advantages and Disadvantages of Intratympanic and Intracochlear Administration

	Intratympanic	Intracochlear
Advantages	Easy access Minimal risk of hearing loss Less surgical trauma Local anesthesia	Dose control Increased bioavailability Minor residual loss Ideal method in conjunction with cochlear implants
Disadvantages	Lower bioavailability Variability in dosage control Round window niche fibrosis	Difficult to Access General anesthesia

cochlea after implanting the cannula connected to a drug infusion pump. Through programming such a pump could permit consistent drug delivery. These experiments have only been performed in animals under general anaesthesia and the surgical procedure usually involves creating a hole in the apex of the cochlea. Several pharmacokinetic studies have been carried out with ions and microspheres using this procedure [67, 115, 116].

As with intratympanic methods, osmotic pumps are important elements in intracochlear drug administration and have been proven to be safe and effective in laboratory animals. This approach has been used to study residual hearing after cochleostomy by analyzing brainstem evoked potentials 3 and 7 days after implantation of a minipump containing different toxins that diffuse into the perilymph [117]. Such controlled drug delivery through osmotic pumps has been useful to study the effect of various drugs on neuronal conservation and otoprotection, demonstrating (for example) the effectiveness of intracochlear steroid therapy in preventing hearing loss after acoustic trauma [118]. Steroids prevent hair cell death after exposure to ototoxic substances and they provide tissue protection after mechanical trauma produced by electrode arrays in cochlear implants [118, 119]. Osmotic pumps have also allowed new treatments to be studied, such as growth factor-mediated preservation of hair cells and neurons in the inner ear. Accordingly, neurotrophins such as BDNF, D-JNKI-1 (a peptide inhibitor of the apoptotic pathway) and BN82270 (an inhibitor of peroxidation that can reduce free radical production) have been studied as potential treatments to preserve neurons and protect the cochlea in rodents [89, 119, 120].

Since the first use of cochlear prostheses, continuous efforts have been made to increase their effectiveness. Cochlear implants stimulate the auditory neurons in the cochlea via an electrode inserted into the scala tympani. Accumulating evidence suggests that better results might be obtained if drugs could be used in combination with the electrode [121-124]. The combination of a drug delivery platform (*e.g.*, to administer neurotrophic factors) with electrode implantation could effectively prevent degradation of the neural circuit. This in turn could improve innervation, increasing neuronal survival and ultimately enhancing the effectiveness of cochlear implants for long-term use [124]. In addition, the administration of steroids and other compounds could prevent the growth of tissues on the electrode and maintain the low electrode impedances [87, 122, 124].

Multiple pump devices are currently being developed, including a microinjector and a drug delivery device [78,125]. Indeed, a micro-injection syringe equipped with a system to regulate the volume of the drug infused was tested in laboratory animals [89]. This device uses a fluid exchange system with a cannula implanted directly in the scala tympani, acting both as the input and outlet. The drug is concentrated in this fluid, which is diffused and mixed with the perilymph in the scala tympani. During withdrawal, an equivalent volume is returned to the device. This pulsing method can protect hair cells from disruptive changes in cochlear volumes and increases in pressure, while creating a net increase in drug concentration. Several electronically controlled drug delivery methods are also currently under devel-

opment, which can provide precise control of delivery volumes and allow multi-dose drug delivery and administration routines in time [111, 123, 126].

CONCLUSION

Current research is focused on the development of administration procedures for local, controlled drug delivery without damaging the inner ear. Laboratory animals are a fundamental tool for the development of these approaches, which aim to reduce variability in dosage and increase drug bioavailability. Improvements in local drug administration to the inner ear will benefit patients with hearing impairments by offering better treatment options with reduced side effects, and hence, a better quality of life.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful for the technical support of J. Pérez (IIBM-CSIC-UAM). This work was supported by the "Spanish Ministry of Science and Innovation" SAF2008-00470 to IVN and a Spanish FIS project PI10/00394 to TR. GC holds a postdoctoral contract from the CSIC JAE program. The funding bodies had no role in the study design, data collection and analysis, the decision to publish or the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- [1] World Health organization. <http://www.who.int/topics/deafness/en/> [Accessed June 16, 2011]
- [2] Promenade the round cochlea. <http://www.neuroreille.com/promenade/english/corti/fcorti.htm> [Accessed April 28, 2011]
- [3] Dror, A.A.; Avraham, K.B. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu. Rev. Genet.*, **2009**, *43*, 411-437.
- [4] National institutes of Health. National Institute of Deafness and other Communications Disorders. <http://www.nidcd.nih.gov/> [Accessed May 12, 2011]
- [5] Jongkamonwivat, N.; Zine, A.; Rivolta, M.N. Stem cell based therapy in the inner ear: appropriate donor cell types and routes for transplantation. *Curr. Drug. Targets.*, **2010**, *11*(7), 888-897.
- [6] Rivolta, M.N. Stem cells and cell lines from the human auditory organ: applications, hurdles and bottlenecks in the development of regenerative therapies for deafness. *Drug. Discov. Today*, **2010**, *15*(7-8), 283-286.
- [7] Sanchez-Calderon, H.; Milo, M.; Leon, Y.; Varela-Nieto, I. A network of growth and transcription factors controls neuronal differentiation and survival in the developing ear. *Int. J. Dev. Biol.*, **2007**, *51*(6-7), 557-570.
- [8] Magariños, M.; Aburto, M.R.; Sánchez-Calderón, H.; Muñoz-Agudo, C.; Rapp, U.R.; Varela-Nieto, I. RAF kinase activity regulates neuroepithelial cell proliferation and neuronal progenitor cell differentiation during early inner ear development. *PLoS One*, **2010**, *5*(12), e14435.
- [9] Murillo-Cuesta, S.; Contreras, J.; Cediell, R.; Varela-Nieto, I. Comparison of different aminoglycoside antibiotic treatments to refine ototoxicity studies in adult mice. *Lab. Anim.*, **2010**, *44*(2), 124-131.
- [10] Murillo-Cuesta, S.; García-Alcántara, F.; Vacas, E.; Sistiaga, J.A.; Camarero, G.; Varela-Nieto, I.; Rivera, T. Direct drug application to the round windows: a comparative study of ototoxicity in rats. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2009**, *14*(5), 584-590.
- [11] Henley, C.M.; Schacht, J. Pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics in blood, inner ear fluids and tissues and their relationship to ototoxicity. *Audiology*, **1998**, *27*, 137-146.
- [12] Schacht, J. Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. *Otol. Clin. North. Am.*, **1993**, *26*, 843-854.

- [13] McGhan, L.J.; Merchant, S.N. Erythromycin ototoxicity. *Otol. Neurotol.*, **2003**, *24*(4),701-702.
- [14] Ikeda, K.; Oshima, T.; Hidaka, H.; Takasaka, T. Molecular and clinical implications of loop diuretic ototoxicity. *Hear. Res.*, **1997**, *107* (1-2), 1-8.
- [15] Jung, T.T.; Rhee, C.H.; Lee, C.S.; Park, Y.S.; Choi, D.C. Ototoxicity of salicylate, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and quinine. *Otol. Clin. North Am.*, **1993**, *26*,787-807.
- [16] Rybak, L.P. Mechanisms of cisplatin ototoxicity and progress in otoprotection. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2007**, *15*, 364-369.
- [17] Vyskocil, A.; Leroux, T.; Truchon, G.; Lemay, F.; Gagnon, F.; Gendron, M.; Viau, C. Ototoxicity of trichloroethylene in concentrations relevant for the working environment. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2008**, *27*(3), 195-200.
- [18] Tawackoli, W.; Chen, G.D.; Fechter, L.D. Disruption of cochlear potentials by chemical asphyxiants. Cyanide and carbon monoxide. *Neurotoxicol. Teratol.*, **2001**, *23*(2), 157-165.
- [19] Karkalapudi, V.; Sawyer, R.; Staecker, H. The effect of Diabetes on Sensorineural Hearing Loss. *Otol. Neurotol.*, **2003**, *24*, 382-386.
- [20] García-Berrocal, J.R.; Ramírez-Camacho, R. Immune response and immunopathology of the inner ear: an update. *J. Laryngol. Otol.*, **2000**, *114*, 101-107.
- [21] García-Berrocal, J.R.; Ramírez-Camacho, R.; Lobo, D.; Trinidad, A.; Verdager, J.M. Adverse effects of glucocorticoid therapy for inner ear disorders. *Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, **2008**, *70*(4), 271-274.
- [22] Plaza, G.; Durio, E.; Herraiz, C.; Rivera, T.;García-Berrocal, J.R. Consensus on diagnosis and treatment of sudden hearing loss. *Acta Otorrinolaringol. Esp.*, **2011**, *62*, 144-157.
- [23] Rauch, S.D. Clinical practice. Idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *N. Engl. J. Med.*, **2008**, *359*, 833-840.
- [24] Schreiber, B.E.; Agrup, C.; Haskard, D.O.; Luxon, L.M. Sudden sensorineural hearing loss. *Lancet*, **2010**, *375*, 1203-1211.
- [25] Merchant, S.N.; Durand, M.L.; Adams, J.C. Sudden deafness: is it viral?. *O.R.L. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, **2008**, *70*, 52-56.
- [26] García-Berrocal, J.R.; Ramirez-Camacho, R.; Portero, F.; Vargas, J.A. Role of viral and Mycoplasma pneumoniae infection in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol.*, **2000**, *835*-859.
- [27] Zadeh, M.H.; Storper, I.S.; Spitzer, J.B. Diagnosis and treatment of sudden-onset sensorineural hearing loss: a study of 51 patients. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2003**, *128*, 92-98.
- [28] Capaccio, P.; Cuccharini, V.; Ottaviani, F.; Fracchiolla, N.S.; Bossi, A.; Pignataro, L. Prothrombotic gene mutations in patients with suddensensorineural hearing loss and cardiovascular thrombotic disease. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **2009**, *118*, 205-210.
- [29] Marcucci, R.; Alessandrello Liotta, A.; Cellai, A.P.; Rogolino, A.; Berloco, P.; Lepri, E.; Pagnini, P.; Abbate, R.; Prisco, D. Cardiovascular and thrombophilic risk factors for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *J. Thromb. Haemost.*, **2005**, *3*, 929-934.
- [30] Echarri, R.M.; Rivera, T.; Mate, M.A.; Cobeta, I. Sudden hearing loss: effectiveness of a therapeutic protocol. *Acta Otorrinolaringol. Esp.*, **2000**, *51*, 490-494.
- [31] Weber, P.C. Sudden sensorineural hearing loss. In: UpToDate, Dechler DJ (Ed.), UpToDate, Waltham, MA, **2009**.
- [32] Chau, J.K.; Lin, J.R.; Atashband, S.; Irvine, R.A.; Westerberg, B.D. Systematic review of the evidence for the etiology of adult sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope*, **2010**, *120*, 1011-1021.
- [33] Garcia- Berrocal, J.R.; Trinidad, A.; Ramirez-Camacho, R.; Verdager, J.M.; Ibañez, A. Immunologic work-up study for inner ear disorders: looking for a rational strategy. *Acta Otolaryngol.*, **2005**, *125*, 814-818.
- [34] Nakagawa, T.; Sakamoto, T.; Hiraumi, H; Kikkawa, Y.S.; Yamamoto, N.; Hamaguchi, K.; Ono, K.; Yamamoto, M.; Tabata, Y.; Teramukai, S.; Tanaka, S.; Tada, H.; Onodera, R.; Yonezawa, A.; Inui, K.; Ito, J. Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden hearing loss: a prospective clinical trial. *B.M.C. Med.*, **2010**, *8*, 76.
- [35] Varela-Nieto, I.; Hartl, M.; Gorospe, I.; León, Y. Anti-apoptotic actions of insulin-like growth factors: lessons from development and implications in neoplastic cell transformation. *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, *13*(7),687-703.
- [36] Fleissner, F.; Thum, T. The IGF-1 receptor as a therapeutic target to improve endothelial progenitor cell function. *Mol. Med.*, **2008**, *14*(5-6), 235-237.
- [37] Ohlemiller, K.K. Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury. *Hear Res.*, **2008**, *245* (1-2), 5-17.
- [38] Konings, A.; Van Laer, L.; Van Camp, G. Genetic studies on noise-induced hearing loss: a review. *Ear Hear.*, **2009**, *30*(2), 151-159.
- [39] Dobie, R.A. Separating noise-induced from age-related hearing loss. *West J. Med.*, **1994**, *160*, 564-565.
- [40] McShane, D.P.; Hyde, M.L.; Finkelstein, D.M.; Alberti, P.W. Unilateral otosclerosis and noise-induced occupational hearing loss. *Clin. Otolaryngol.*, **1991**, *16*, 70-75.
- [41] Shemesh, Z.; Attias, J.; Oman, M.; Shapira, N.; Shahar, A. Vitamin B12 deficiency in patients with chronic-tinnitus and noise-induced hearing loss. *Am. J. Otolaryngol.*, **1993**, *14*, 94-99.
- [42] Yamane, H.; Nakai, Y.; Takayama, M.; Nakagawa, T.; Kojima, A. Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, **1995**, *252*, 504-508.
- [43] Yamane, H.; Nakai, Y.; Takayama, M.; Konishi, K.; Nakagawa, T.; Shibata, S.; Kato, A.; Sunami, K.; Kawakatsu, C. The emergence of free radicals after acoustic trauma and strial blood flow. *Acta Otolaryngol. Suppl. (Stockh.)*, **1995**, *519*, 87-92.
- [44] Le Prell, C.G.; Yamashita, D.; Minami, S.B.; Yamasoba, T.; Miller, J.M. Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention. *Hear Res.*, **2007**, *226*(1-2), 22-43.
- [45] Heinrich, U.R.; Feltens, R. Mechanisms underlying noise-induced hearing loss. *Drug Discovery today: disease mechanisms*, **2006**, *3*, 131-135.
- [46] Cobo, P.; Murillo-Cuesta, S.; Cediél, R.; Moreno, A.; Lorenzo-García, P.; Varela- Nieto, I. *Appl. Acoustic.*, **2009**, *70*(8), 1034.
- [47] Ohlemiller, K.K. Age-related hearing loss: the status of Schuknecht's tipology. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2004**, *12*, 439-443.
- [48] Schuknecht, H.F. Presbycusis. *Laryngoscope*, **1995**, *65*, 402-419.
- [49] Schuknecht, H.F.; Gacek, M.R. Cochlear pathology in presbycusis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, **1993**, *102*, 1-16.
- [50] Scholtz, A.W.; Kammen-Jolly, K.; Felder, E.; Hussl, B.; Rask-Andersen, H.; Scrott-Fisher, A. Selective aspects of human pathology in high-tone hearing loss of the aging inner ear. *Hear Res.*, **2001**, *157*, 77-86.
- [51] Van Eyken, E.; Van Laer, L.; Fransen, E.; Topsakal, V.; Hendrickx, J.J.; Demeester, K.; Van de Heyning, P.; Mäki-Torkko, E.; Hannula, S.; Sorri, M.; Jensen, M.; Parving, A.; Bille, M.; Baur, M.; Pfister, M.; Bonaconsa, A.; Mazzoli, M.; Orzan, E.; Espeso, A.; Stephens, D.; Verbruggen, K.; Huyghe, J.; Dhooge, I.; Huygen, P.; Kremer, H.; Cremers, C.; Kunst, S.; Manninen, M.; Pyykkö, I.; Rajkowska, E.; Pawelczyk, M.; Sliwiska-Kowalska, M.; Steffens, M.; Wienker, T.; Van Camp, G. The contribution of GJB2 (conexin 26) 35delG to age-related hearing impairment and noise-induced hearing loss. *Otol. Neurotol.*, **2007**, *28*(7), 970-975.
- [52] Johnson, K.R.; Enway, L.C.; Cook, S.A.; Willott, J.F.; Zheng, Q.Y. A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res.*, **1997**, *114*, 83-92.
- [53] Bolz, H.; Brederlow, B.; Ramirez, A.; Bryda, E.C.; Kutsche, K.; Nothwang, H.G.; Seeliger, M.; del C-Salcedó Cabrera, M.; Vila, M.C.; Molina, O.P.; Gal, A.; Kubisch, C. Mutation of CDH23 encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat. Genet.*, **2001**, *27*, 108-112.
- [54] Fishel-Ghodsian, N. Mitochondrial deafness. *Ear. Hear.*, **2003**, *24*, 303-313.
- [55] Murillo-Cuesta, S.; Contreras, J.; Zurita, E.; Cediél, R.; Cantero, M.; Varela-Nieto, I.; Montoliu, L. Melanin precursors prevent premature age-related and noise-induced hearing loss albino mice. *Pigment. Cell. Melanoma Res.*, **2010**, *23*(1), 72-83.
- [56] Riquelme, R.; Cediél, R.; Contreras, J.; la Rosa, L.; Murillo-Cuesta, S.; Hernández-Sánchez, C.; Zubeldia, J.M.; Cerdan, S.; Varela-Nieto, I. A comparative study of age-related hearing loss in wild type and insulin-like growth factor 1 deficient mice. *Front. Neuroanat.*, **2010**, *4*, 27.
- [57] Hardisty-Hughes, R.E.; Parker, A.; Brown, S.D. A hearing and vestibular phenotyping pipeline to identify mouse mutants with hearing impairment. *Nat. Protoc.*, **2010**, *5* (1), 177-190.
- [58] Lang, H.; Schulte, B.A.; Schmiedt, R.A. Effects of chronic furosemide treatment and age on cell division in the adult gerbil inner ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, **2003**, *4*, 164-175.
- [59] Seidman, M.D. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope*, **2000**, *110*, 727-738.

- [60] Kuts, J.W. Jr. The dizzy patient. *Med. Clin. North Am.*, **2010**, 94(5), 989-1002.
- [61] Salt, A.N. Pharmacokinetics of drug entry into cochlear fluids. *Volta Rev.*, **2005**, 105, 277-298.
- [62] Suckfuell, M.; Canis, M.; Strieth, S.; Scherer, H.; Haisch, A. Intratympanic treatment of acute acoustic trauma with a cell-permeable JNK ligand: a prospective randomized phase I/II study. *Acta Otolaryngol.*, **2007**, 127, 938-942.
- [63] Gopen, Q.; Rosowski, J.; Merchant, S. Anatomy of the normal human cochlear aqueduct with functional implications. *Hear Res.*, **1997**, 107, 9-22.
- [64] Juhn, S.; Hamaguchi, Y.; Goycoolea, M. Review of round window membrane permeability. *Acta Otolaryngol. Suppl.*, **1989**, 457, 43-45.
- [65] Salt, A.N. Simulation of methods for drug delivery to the cochlear fluids. *Adv. Otorhinolaryngol.*, **2002**, 59, 140-148.
- [66] Shepherd, R.; Colreavy, M. Surface microsuture of the perilymphatic space: implications of cochlear implants and cell or drug based therapies. *Arch. Otolaryngol.*, **2004**, 123, 518-523.
- [67] Salt, A.N.; Hale, S.A. Longitudinal distribution of drugs in perilymph assessed by cochlear action potentials, 28th Mid Winter Research Meeting of the JARO, **2005**.
- [68] Ohyama, K.; Salt, A.N.; Thalmann, R. Volume flow Rate of perilymph in the guinea pig cochlea. *Hear Res.*, **1988**, 35, 119-130.
- [69] Salt, A.N.; Plontke, S.K.R. Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov. Today*, **2005**, 10, 1299-1306.
- [70] Ersner, M.S.; Spiegel, E.A.; Alexander, M.H. Transtympanic injection of anesthetics for the treatment of Ménière's syndrome. *AMA. Arch. Otolaryngol.*, **1951**, 54, 43-52.
- [71] Schuknecht, H.F. Ablation therapy for the relief of Ménière's disease. *Laryngoscope*, **1956**, 66, 859-870.
- [72] Blakley, B.W. Clinical forum: a review of intratympanic therapy. *Am. J. Otol.*, **1997**, 18, 520-526.
- [73] Carey, J. Intratympanic gentamicin for the treatment of Meniere's disease and other forms of peripheral vertigo. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **2004**, 37, 1075-1090.
- [74] Richardson, R.; Noushi, F.; O'Leary, S. Inner ear therapy for neural preservation. *Audiol. Neurootol.*, **2006**, 11(6), 343-56.
- [75] Barrs, D.M. Intratympanic corticosteroids for Meniere's disease and vertigo. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **2004**, 37, 955-972.
- [76] Rauch, S.D. Intratympanic steroids for sensorineural hearing loss. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **2004**, 37, 1061-1074.
- [77] Haynes, D.S.; O'Malley, M.; Cohen, S.; Watford, K.; Labadie, R.F. Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. *Laryngoscope*, **2007**, 117, 3-15.
- [78] Plontke, S.K.; Löwenheim, H.; Mertens, J.; Engel, C.; Meisner, C.; Weidner, A.; Zimmermann, R.; Preyer, S.; Koitschev, A.; Zenner, H.P. Randomized, double blind, placebo controlled trial on the safety and efficacy of continuous intratympanic dexamethasone delivered via a round window catheter for severe to profound sudden idiopathic sensorineural hearing loss after failure of systemic therapy. *Laryngoscope*, **2009**, 119, 359-369.
- [79] Light, J.P.; Silverstein, H. Transtympanic perfusion: indications and limitations. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2004**, 12, 378-383.
- [80] Sakata, E.; Ito, Y.; Itoh, A. Clinical experiences of steroid targeting therapy to inner ear for control of tinnitus. *Int. Tinnitus J.*, **1997**, 3, 117-121.
- [81] Silverstein, H.; Silverstein, H.; Choo, D.; Rosenberg, S.I.; Kuhn, J.; Seidman, M.; Stein, I. Intratympanic steroid treatment of inner ear disease and tinnitus. *Ear Nose Throat J.*, **1996**, 75, 468-471.
- [82] Lin, J.; Juhn, S.K.; Adams, G.L.; Giebink, G.S.; Kim, Y. Dexamethasone inhibits mucous glycoprotein secretion via a phospholipase A2 dependent mechanism in cultured chinchilla middle ear epithelial cells. *Acta Otolaryngol.*, **1997**, 117 (3), 406-413.
- [83] Arriaga, M.A.; Goldman, S. Hearing results of intratympanic steroid treatment of endolymphatic hydrops. *Laryngoscope*, **1998**, 108 (11), 1682-1685.
- [84] Sennaroglu, L.; Sennaroglu, G.; Gursel, B.; Dini, F.M. Intratympanic dexamethasone, intratympanic gentamicin, and endolymphatic sac surgery for intractable vertigo in Meniere's disease. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2002**, 127(5), 491-492.
- [85] Parnes, L.S.; Sun, A.H.; Freeman, D. J. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope*, **1999**, 109 (7), 1-17.
- [86] McCormick, D.P.; Saeed, K.; Uchida, T.; Baldwin, C.D.; Deskin, R.; Lett-Brown, M.A.; Heikkinen, T.; Chonmaitree, T. Middle ear fluid histamine and leukotriene B4 in acute otitis media: effect of antihistamine or corticosteroid treatment. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, **2003**, 67 (3), 221-230.
- [87] Johnson, K.R.; Enway, L.C.; Cook, S.A.; Willott, J.F.; Zheng, Q.Y. A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res.*, **1997**, 114, 83-92.
- [88] Banerjee, A.; Parnes, L.S. The biology of intratympanic drug administration and pharmacodynamics of round window drug absorption. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **2004**, 37, 1035-1051.
- [89] McCall, A.A.; Swan, E.E.; Borenstein, J.T.; Sewell, W.F.; Kujawa, S.G.; McKenna, M.J. Drug delivery for treatment of inner ear disease: current state of knowledge. *Ear Hear.*, **2010**, 31(2), 156-165.
- [90] Plontke, S.K.R.; Wood, A.W.; Salt, A.N. Analysis of gentamicin kinetics in fluids of the inner ear with round window administration. *Otol. Neurotol.*, **2002**, 23, 967-974.
- [91] Seidman, M.D. Glutamate antagonists, steroids, and antioxidants as therapeutic options for hearing loss and tinnitus and the use of an inner ear drug delivery system. *Int. Tinnitus J.*, **1998**, 4, 148-154.
- [92] Seidman, M.D.; Van de Water, T.R. Pharmacologic manipulation of the labyrinth with novel and traditional agents delivered to the inner ear. *Ear Nose Throat J.*, **2003**, 82, 276-300.
- [93] Silverstein, H. Use of a new device, the microwick, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J.*, **1999**, 78, 595-600.
- [94] Hillman, T.M.; Arriaga, M.A.; Chen, D.A. Intratympanic steroids: do they acutely improve hearing in cases of cochlear hydrops?. *Laryngoscope*, **2003**, 113, 1903-1907.
- [95] Blakley, B.W. Update on intratympanic gentamicin for meniere's disease. *Laryngoscope*, **2000**, 110, 236-240.
- [96] Hoffer, M.; Balough, B.; Henderson, J.; DeCicco, M.; Wester, D.; O'Leary, M.; Kopke, R. Use of sustained release vehicles in the treatment of Meniere's disease. *Otolaryngol. Clin. North Am.*, **1997**, 30, 1159-1166.
- [97] Iwai, K.; Nakagawa, T.; Endo, T.; Matsuoka, Y.; Kita, T.; Kim, S.; Tabata, Y.; Ito, J. Cochlear protection by local insulin-like growth factor-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope*, **2006**, 116, 529-533.
- [98] Ito, J.; Endo, T.; Nakagawa, T.; Kita, T.; Kim, T.S.; Iguchi, F.A. A new method for drug application to the inner ear. *O.R.L. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, **2005**, 67, 272-275.
- [99] Endo, T.; Nakagawa, T.; Kita, T.; Iguchi, F.; Kim, T.S.; Tamura, T.; Iwai, K.; Tabata, Y.; Ito, J. Novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope*, **2005**, 115, 2016-2020.
- [100] Pasic, T.; EW, R. Rapid changes in cochlear nucleus cell size following blockage of auditory nerve electrical activity in gerbils. *J. Comp. Neurol.*, **1989**, 283, 474-480.
- [101] Arnold, W.; Senn, P.; Hennig, M.; Michaelis, C.; Deingruber, K.; Scheler, R.; Steinhoff, H.J.; Riphagen, F.; Lamm, K. Novel slow and fast-type drug release roundwindow microimplants for local drug application to the cochlea: an experimental study in guinea pigs. *Audiol. Neurootol.*, **2005**, 10, 53-63.
- [102] Praetorius, M.; Limberger, A.; Muller, M.; Lehner, R.; Schick, B.; Zenner, H.; Plinkert, P.; Knipper, M. A novel microperfusion system for the long term local supply of drugs to the inner ear: implantation and function in the rat model. *Audiol. Neurootol.*, **2001**, 6, 250-258.
- [103] Tamura, T.; Kita, T.; Nakagawa, T.; Endo, T.; Kim, T.S.; Ishihara, T.; Mizushima, Y.; Higaki, M.; Ito, J. Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope*, **2005**, 115, 2000-2005.
- [104] Ge, X.; Jackson, R.L.; Liu, J.; Harper, E.A.; Hoffer, M.E.; Wassel, R.A.; Dormer, K.J.; Kopke, R.D.; Balough, B.J. Distribution of PLGA nanoparticles in chinchilla cochleae. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **2007**, 137, 619-623.
- [105] Brown, J.N.; Miller, J.M.; Altschuler, R.A.; Nuttall, A.L. Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear. *Hear Res.*, **1993**, 70, 167-172.
- [106] Theeuwes, F.; Yum, S.I. Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann. Biomed. Eng.*, **1976**, 4, 343-353.
- [107] Lehner, R.; Brugger, H.; Maassen, M.M.; Zenner, H. A totally implantable drug delivery system for local therapy of the middle and inner ear. *Ear Nose Throat J.*, **1997**, 76, 567-570.
- [108] Salt, A.N.; Hale, S.A.; Plontke, S.K. Perilymph sampling from the cochlear apex: a reliable method to obtain higher purity perilymph

- samples from the scala tympani. *J. Neurosci. Methods*, **2006**, *153*, 121-129.
- [109] Salt, A.N.; Ma, Y. Quantification of solute entry into cochlear perilymph through the round window membrane. *Hear Res.*, **2001**, *154*, 88-97.
- [110] De Ceulaer, G.; Johnson, S.; Yperman, M.; Daemers, K.; Offeciers, F.E.; O'Donoghue, G.M.; Govaerts, P.J. Long-term evaluation of the effect of intracochlearsteroid deposition on electrode impedance in cochlear implant patients. *Otol. Neurotol.*, **2003**, *24*, 769-774.
- [111] Paasche, G.; Bockel, F.; Tasche, C.; Lesinski-Schiedat, A.; Lenarz, T. Changes of postoperative impedances in cochlear implant patients: the short-term effects of modified electrode surfaces and intracochlear corticosteroids. *Otol. Neurotol.*, **2006**, *27*, 639-647.
- [112] Praetorius, M.; Baker, K.; Brough, D.E.; Plinkert, P.; Staecker, H. Pharmacodynamics of adenovector distribution within the inner ear tissues of the mouse. *Hear Res.*, **2007**, *227*, 53-58.
- [113] Oestreicher, E.; Arnold, W.; Ehrenberger, K.; Felix, D. New approaches for inner ear therapy with glutamate receptors. *Acta Otolaryngol.*, **1999**, *119*, 174-178.
- [114] Stover, T.; Yagi, M.; Raphael, Y. Cochlear gene transfer: round window versus cochleostomy inoculation. *Hear Res.*, **1999**, *136*, 124-130.
- [115] Salt, A.N.; Sirjani, D.B.; Hartsock, J.J.; Gill, R.M.; Plontke, S.K. Marker retention in the cochlea following injections through the round window membrane. *Hear Res.*, **2007**, *232*, 78-86.
- [116] Richardson, R.T.; Wise, A.; O'Leary, S.; Hardman, J.; Casley, D.; Clark, G. Tracing neurotrophin-3 diffusion and uptake in the guinea pig cochlea. *Hear Res.*, **2004**, *198*, 25-35.
- [117] Carvalho, G.J.; Lalwani, A.K. The effect of cochleostomy and intracochlear infusion on auditory brain stem response threshold in the guinea pig. *Am. J. Otol.*, **1999**, *20*, 87-90.
- [118] Eshraghi, A.A.; Adil, E.; He, J.; Graves, R.; Balkany, T.J.; Van de Water, T.R. Local dexamethasone therapy conserves hearing in an animal model of electrodeinsertion trauma-induced hearing loss. *Otol. Neurotol.*, **2007**, *28*, 842-849.
- [119] Wang, J.; Ladrech, S.; Pujol, R.; Brabet, P.; Van de Water, T.R.; Puel, J.L. Caspase inhibitors, but not c-jun NH2-terminal kinase inhibitor treatment, prevent cisplatin-induced hearing loss. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 9217-9224.
- [120] Schindler, R.A.; Gladstone, H.B.; Scott, N.; Hradek, G.T.; Williams, H.; Shah, S.B. Enhanced preservation of the auditory nerve following cochlear perfusion with nerve growth factor. *Am. J. Otol.*, **1995**, *16*, 304-309.
- [121] Wang, J.; Pignol, B.; Chabrier, P.E.; Saido, T.; Lloyd, R.; Tang, Y.; Lenoir, Y.M.; Puel, J.L. A novel dual inhibitor of calpains and lipid peroxidation (bn82270) rescues the cochlea from sound trauma. *Neuropharmacology*, **2007**, *52*, 1426-1437.
- [122] Pettingill, L.N.; Richardson, R.T.; Wise, A.K.; O'Leary, S.; Shepherd, R.K. Neurotrophic factors and neural prostheses: potential clinical applications based upon findings in the auditory system. *I.E.E.E. Trans. Biomed. Eng.*, **2007**, *54*, 1138-1148.
- [123] Duan, M.L.; Ulfendahl, M.; Laurell, G.; Counter, A.S.; Pyykko, I.; Borg, E.; Rosenhall, U. Protection and treatment of sensorineural hearing disorders caused by exogenous factors: experimental findings and potential clinical application. *Hear Res.*, **2002**, *169*, 169-178.
- [124] Hochmair, I.; Nopp, P.; Jolly, C.N.; Schmidt, M.; Schober, H.; Garnham, C.; Anderson, I. Med-el cochlear implants: state fo the art and a glimpse into the future. *Trends Amplif.*, **2006**, *10*, 201-220.
- [125] Kingma G.G.; Miller J.M.; Myers M.W. Chronic drug infusion into the Scala tympani if the guinea pig cochlea. *J. Neurosci. Methods*, **1992**, *45*, 127-134.
- [126] Leary Swan, E.E. ; Fiering J.O.; Sewell W.F.; Kujawa S.G.; McKenna M.J.; Borenstein J.T.; Mescher M.J. *Microfabricated Components For Fully Implantable Microfluidic Drug Delivery To The Inner Ear*, 34th Annual Meeting and Exhibition of the Controlled Release Society, Long Beach, CA, **2007**.