

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



TRABAJO DE DIPLOMA

**CURSO TEMPORAL DEL POTENCIAL
EVOCADO AUDITIVO DE ESTADO ESTABLE
EN RATAS ADULTAS**

Autora: Laura María Reyes Díaz

Tutores: Lic. Armando Alvaré Jaramillo

MSc. Pavel Prado Gutiérrez

2010-2011

DEDICATORIA

*A mi madre, por ser tan maravillosa, por hacer tantos esfuerzos
para sacarme adelante en la vida y en este camino
hermoso e increíble del saber.*

*A mi hermano, por acompañarme en la vida, por confiar siempre en mí,
así como yo confío en él.*

*A mi esposo, por la paciencia, por las palabras exactas,
por la confianza en mí,
por ese amor tan grande que nos une.*

A mi padre, por darme esa tranquilidad que solo él sabe.

*A mi abuelita Juana, porque sé que le llena de orgullo esta tesis
y porque me llena de orgullo a mí poder hacerle este regalo.*

*A mis otros abuelitos, Magaly y Papán,
porque nada de lo que les diga aquí
puede corresponder lo que valen.*

*A Mabe, por las carreras, la preocupación, el cariño
y toda la ayuda incondicional en cada momento.*

*A la vida, y a la parte de suerte que me dio
para estudiar esta carrera tan bella.*

AGRADECIMIENTOS

*A Armando, por saber guiarme siempre en el camino exacto,
por ser un amigo, además de un tutor,
sabiendo el valor de ambas cosas.*

*A Pável, porque sin su apoyo incondicional y su presencia diaria hubiera sido
imposible realizar esta tesis, porque nunca dejó de guiarme,
incluso cuando los experimentos coincidieran con
algo tan grande como el nacimiento de su niña.*

*A Eduardo, por toda la ayuda tecnológica y la preocupación constante,
durante todo el tiempo de preparación de esta tesis.*

*A los trabajadores del Departamento de Neurociencias Básicas
y al Centro de Neurociencias de Cuba, por permitirme
realizar la fase experimental de mi trabajo.*

*A los profesores del CEETI, en la Universidad Central de Las Villas,
que tanto me ayudaron en los días de mayor incertidumbre.*

*A Rodrigo, Norberto y otros doctores de los Hospitales Frank País y Hermanos
Ameijeiras, por todas las atenciones durante mi enfermedad,
que por desgracia fue inherente a esta investigación.*

*A los compañeros del Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara, por
promover y estar siempre pendientes de los resultados obtenidos en la tesis.*

*A todos los que de una forma u otra contribuyeron
con la realización de este trabajo.*

*A los que, también de una forma u otra, lo obstaculizaron
y así me permitieron vencer
tantas pruebas increíbles.*

RESUMEN

Los registros eléctricos de la actividad del Sistema Nervioso Central constituyen una de las técnicas más explotadas en el mundo para evaluar el funcionamiento temporal de sus funciones. Entre ellos el registro de la actividad auditiva se destaca por la cantidad de información que brindan acerca de la morfología y fisiología de del sistema auditivo. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la intensidad y la frecuencia portadora del estímulo sobre la respuesta auditiva obtenida a partir de Potenciales Evocados Auditivos de Estado Estable (PEAEE) en ratas adultas. A partir del procesamiento de las respuestas y el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el registro de 8 ejemplares, se pudo demostrar que existe una caída de la amplitud al aumentar los parámetros de estimulación. Además se demuestra que esta caída en la amplitud de la respuesta, observada por los parámetros de estimulación, no se debe solamente a los efectos de ruido, sino también a procesos fisiológicos que ocurren a nivel neuronal.

Palabras clave: *parámetros de estimulación, potenciales evocados auditivos de estado estable, respuesta auditiva, sistema auditivo.*

ABSTRACT

The recording of the electrical activity of the central nervous system is one of the most widely used techniques in order to assess the temporal functioning of its operations. Among them the recordings of the auditory activity stands out for the high level of information they render on the morphology and physiology of the auditory system. The present work evaluated the effect of the stimulus intensity and the frequency on the auditory response that was measured from Auditory Steady-State Response (ASSR) on adult rats. From the processing of the response and the statistical analysis of the results on eight individuals, it could be demonstrated there is a descent on amplitude when stimulation parameters grow. It is also demonstrated that such a descent doesn't have to do with the noise effect only but also with physiological processes taking place at neuronal level.

Key words: *stimulation parameters grow, auditory steady-state response, auditory response, auditory system.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN / 1

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA / 5

1.1. Descripción general del sistema auditivo de mamíferos / 5

1.1.1. Aspectos morfológicos fundamentales del sistema auditivo periférico en mamíferos / 5

1.1.2. Aspectos morfológicos fundamentales del sistema auditivo central en mamíferos / 8

1.1.3. La selectividad a frecuencia de las diferentes regiones cocleares en mamíferos / 9

1.2. Procesamiento de estímulos repetitivos y de estímulos de amplitud modulada / 11

1.3. Los estudios de potenciales evocados auditivos en mamíferos / 15

1.3.1. Los estudios de potenciales evocados auditivos y sus aplicaciones generales como batería diagnóstica / 16

1.3.2. Los potenciales evocados auditivos de estado estable (PEAEE) / 17

2. MATERIALES Y MÉTODOS / 19

2.1. Animales de experimentación / 19

2.2. Estimulación acústica / 20

2.3. Registros de potenciales evocados auditivos de estado estable del nervio auditivo / 21

2.4. Obtención de datos primarios / 22

2.5. Procesamiento estadístico / 24

3. RESULTADOS / 26

3.1. Efecto de la frecuencia portadora y la intensidad del estímulo sobre la amplitud promedio del PEAEE / 26

3.2. Curso temporal de la amplitud del PEAEE durante la obtención de un registro / 27

3.3. Amplitud de la respuesta del PEAEE en segmentos no promediados / 31

4. DISCUSIÓN / 37

4.1. Consideraciones metodológicas / 37

4.2. Efecto de la frecuencia portadora y la intensidad del estímulo sobre la amplitud de la respuesta auditiva / 39

4.3. Curso temporal de la amplitud del PEAEE durante la obtención de un registro / 40

4.4. Amplitud de la respuesta del PEAEE en segmentos no promediados / 42

CONCLUSIONES / 44

RECOMENDACIONES / 45

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCIÓN

El sistema auditivo, después del visual, constituye el que mayor cantidad de información sensorial procesa. Este cobra notable importancia, en tanto desarrolla tareas complejas que incluyen, además del procesamiento del sonido, el desarrollo del habla, la memoria y el aprendizaje; funciones imprescindibles del hombre para su desenvolvimiento como especie en el medio que lo rodea. Dentro de este sistema, particularmente, resulta notable la codificación de las características espectrales y temporales de los estímulos acústicos.

El uso de técnicas electrofisiológicas para el estudio de la vía auditiva, ha sido, durante décadas, una herramienta importante para la comprensión de los fenómenos que tienen lugar en dicho sistema, incluyendo los registros de actividad eléctrica a nivel intracelular, celular y de poblaciones neuronales. De modo específico, el estudio de la respuesta de estas últimas puede realizarse de dos maneras: obteniendo la actividad eléctrica en la estructura que genera, o recogiendo las variaciones de potencial a una distancia relativamente considerable con respecto al sitio de generación. El carácter no invasivo de estos potenciales de campo lejano (también llamados potenciales evocados), hace que tengan gran relevancia para el diagnóstico de enfermedades del sistema auditivo, ofreciendo la posibilidad de ser utilizadas en el hombre sin que represente un riesgo para su salud.

Los Potenciales Evocados Auditivos de Estado Estable (PEAEE) han emergido como una aplicación clínica válida para la estimación de los umbrales de audición (Lins *et al.*, 1995; Perez-Abalo *et al.*, 2001; Picton *et al.*, 2003; Rickards *et al.*, 1994). Para lograr su obtención, el sistema es estimulado con un tono (estímulo acústico de frecuencia portadora constante) modulado en amplitud. La respuesta neuronal se sincroniza al estímulo, de manera que en ella se producen oscilaciones de la misma frecuencia que la frecuencia de modulación dada en la amplitud de dicho estímulo. Estas oscilaciones pueden analizarse tanto en el dominio del tiempo como en el de la propia frecuencia.

La obtención de los PEAAE, al igual que la del resto de los potenciales evocados de campo lejano, se basa en la promediación de la respuesta neuronal. Esto ocurre porque, debido a la gran distancia existente entre el sitio de registro y el de generación de la respuesta, la mayor parte de las variaciones de potencial detectadas por el electrodo de registro corresponden a ruido eléctrico y a la actividad generada por estructuras del sistema nervioso no relacionadas con la respuesta auditiva. Teóricamente, la promediación elimina las variaciones de potenciales no intrínsecas en la respuesta auditiva, a la vez que no afecta la actividad eléctrica asociada al estímulo. Para ello, se asume que la señal generada por este tiene, además de una amplitud constante, una relación de fase fija con el mismo estímulo que la provoca; mientras que el ruido (en este caso identificado con el resto de la actividad bioeléctrica) es de naturaleza aleatoria y no guarda ninguna relación de fase fija.

Los supuestos implícitos en el modelo de generación de potenciales evocados fueron formulados por Glaser y Ruchkin (1976) de la siguiente manera: (1) la señal y el ruido son aditivos (o sea, se suman linealmente en cada segmento de registro), (2) la respuesta permanece constante en amplitud y fase desde una repetición del estímulo hasta la siguiente, y (3) las variaciones de potencial no asociadas a la respuesta son suficientemente variables, pudiendo considerarlas como aleatorias y aproximadas a cero durante la promediación.

Sin embargo, se ha demostrado que la amplitud del PEAAE cambia durante este último proceso, pues disminuye durante las primeras promediaciones hasta alcanzar una meseta relativamente estable luego de transcurrido un tiempo determinado de registro (Torres-Fortuny *et al.*, 2011a). De este modo, se sugiere que la caída de amplitud pudiera ser consecuencia de la disminución del ruido en el registro. No obstante, se conoce que la respuesta de neuronas auditivas disminuye exponencialmente con la repetición de estímulos acústicos, como son los empleados en la generación del PEAAE. Este fenómeno es denominado habituación o adaptación repetitiva (Cardinali, 2007). Por tanto, la disminución de amplitud antes descrita pudiese ser intrínseca a la respuesta neuronal asociada al estímulo, y no solamente un reflejo de la disminución del ruido.

La utilización del PEAAE tiene un fin marcadamente clínico. Es decir, su aplicación está dirigida al humano. En cambio, el empleo de modelos experimentales en animales constituye un paso necesario para el desarrollo de metodologías de análisis que permitan una mayor eficiencia en el empleo de este tipo de respuesta. Los PEAAE se han obtenido tradicionalmente en diferentes grupos de mamíferos, incluyendo roedores (Dolphin *et al.*, 1994; Ottaviani *et al.*; 1990), felinos (Makela *et al.*, 1990; Snyder y Schreiner, 1987) y primates no humanos (Burton *et al.*, 1992). La rata albina (*Rattus norvegicus*) constituye uno de los modelos experimentales más extensamente empleadas, debido al gran conocimiento que se tiene sobre su genética y fisiología. Por tal razón, es precisamente esta la especie utilizada en la presente investigación.

Partiendo de lo expuesto en los párrafos anteriores, este trabajo se plantea el siguiente *problema científico*: *¿Cuáles son las causas fundamentales de la disminución de amplitud que se produce durante el curso temporal de los PEAAE en ratas adultas?*

Para darle solución a dicha interrogante, se predeterminó la siguiente *hipótesis*: *La disminución de amplitud que se produce durante la obtención de los PEAAE en ratas adultas, además de ser consecuencia de procesos de eliminación de ruido, responde a mecanismos fisiológicos que tienen lugar a nivel neuronal.*

Partiendo de tales presupuestos y sobre la base de los antecedentes tenidos en cuenta para el diseño investigativo, la presente tesis se propone, como *objetivo general*: *Caracterizar el curso temporal del Potencial Evocado Auditivo de Estado Estable (PEAAE) en ratas adultas.*

Para lograr la demostración de la hipótesis ante la problemática enunciada y bajo la finalidad arriba propuesta, fueron definidos, a su vez, los siguientes *objetivos específicos*:

1. *Describir el efecto de la intensidad de estímulos acústicos modulados en amplitud sobre el curso temporal de la amplitud del PEAAE en ratas adultas.*

2. Describir el efecto de la frecuencia intrínseca de estímulos acústicos modulados en amplitud sobre el curso temporal de la amplitud del PEAAE en ratas adultas.

La verificación pretendida, o (en contraparte) su negación a través de los experimentos realizados, significan un aporte considerable a las investigaciones biológicas actuales; sobre todo si se toma en cuenta que los resultados expuestos durante este informe tienen una finalidad práctica inmediata, pues permiten establecer premisas que posibiliten optimizar los métodos actuales de obtención de este tipo de respuesta auditiva. De esta forma, contribuyen al desarrollo de procedimientos de registros dirigidos al mejor aprovechamiento de los PEAAE como herramienta diagnóstica ante trastornos del sistema auditivo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1)- Descripción general del sistema auditivo de mamíferos.

El sistema auditivo en mamíferos se puede dividir en dos partes, atendiendo a sus funciones: la fisiológica, de la cual se encarga el Sistema Auditivo Periférico; y la psicológica (también llamada *de percepción*), dirigida por el Sistema Nervioso Central (SNC). Ambas serán abordadas en los siguientes epígrafes, según la estructura de los elementos que se manejan en relación con el problema científico.

1.1.1)- Aspectos morfológicos fundamentales del sistema auditivo periférico en mamíferos.

El Sistema Auditivo Periférico (SAP) es el responsable de los procesos fisiológicos de la audición, los cuales permiten captar el sonido y transformarlo en impulsos eléctricos, que serán enviados al cerebro a través de los nervios auditivos. Este sistema lo constituye el oído, que a su vez, en el caso de los mamíferos, se subdivide en tres partes: el oído externo, el medio y el interno, respectivamente.

El oído externo está compuesto por el pabellón auditivo, que concentra las ondas sonoras en el conducto auditivo externo, el cual, a su vez, desemboca en el tímpano. El canal auditivo externo tiene unos 2,7 cm de longitud, y un diámetro promedio de 0,7 cm. Al comportarse como un tubo cerrado en el que oscila una columna de aire, la frecuencia de resonancia del canal es de aproximadamente 3.200 Hz.

El oído medio, por su parte, está lleno de aire, y se halla compuesto por el tímpano (o membrana timpánica), que lo separa del oído externo; así como por un sistema de tres huesecillos (martillo, yunque y estribo), ubicados en el interior del hueso temporal del cráneo, y que tienen como función acoplar las vibraciones de la membrana timpánica con las del líquido que llena la cavidad del oído interno. Sus movimientos amplifican el estímulo acústico, disminuyendo la pérdida de

energía dada por el paso de la onda mecánica desde el aire a un medio con mayor impedancia, como la linfa del oído interno (Rosowski *et al.*, 1986).

Por último, el oído interno se encuentra formado por el laberinto vestibular, que es uno de los órganos involucrados en el control del equilibrio; y la cóclea, que tiene función auditiva (figura 1A). La cóclea de mamíferos es una estructura con forma de espiral que se localiza en el interior del hueso temporal, dividiéndose anatómicamente en tres compartimentos: la escala timpánica, la escala media y la escala vestibular (figura 1B). Estos conductos se encuentran delimitados entre sí por estructuras membranosas, entre las cuales se localiza la membrana basal, que separa la escala timpánica de la media; y la membrana de Reissner, que separa el compartimento medio del vestibular (Kandell *et al.*, 2000).

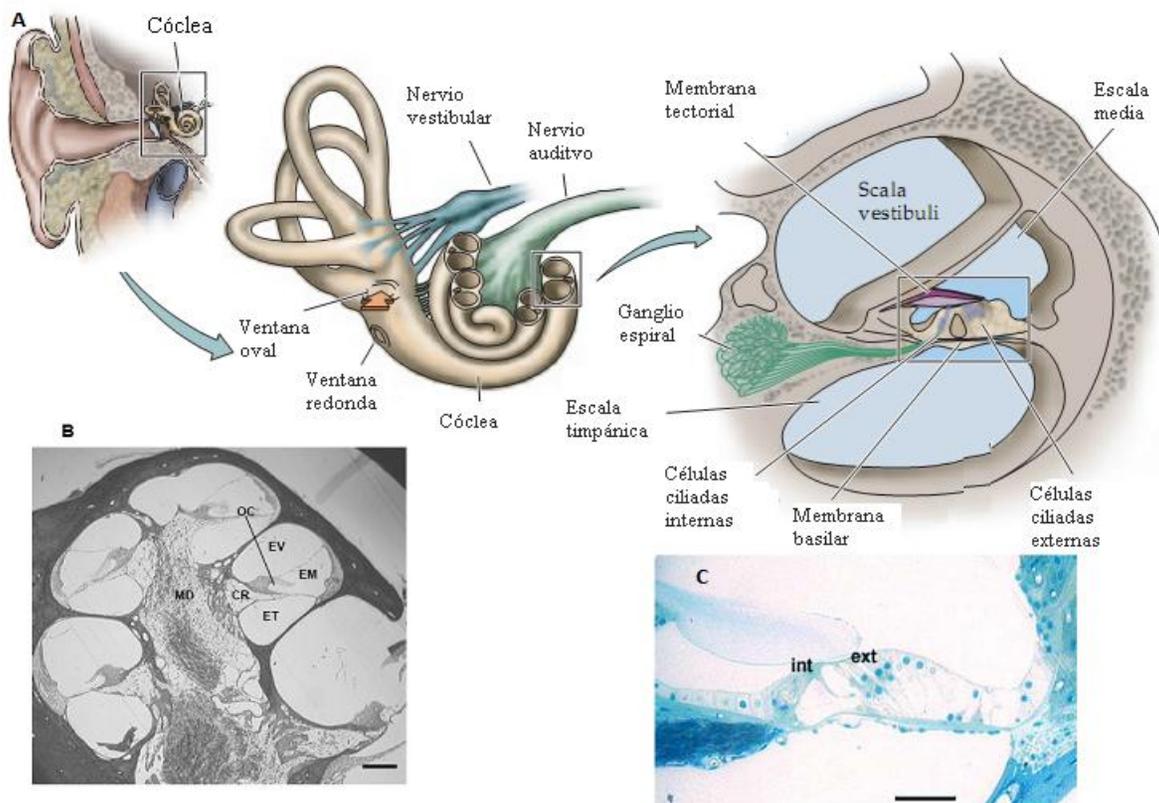


Figura 1: Características morfológicas del órgano receptor auditivo de mamíferos.

- A) Representación gráfica de las diferentes regiones del órgano, que señala algunas de sus principales estructuras.
- B) Fotografía tomada al microscopio óptico del corte longitudinal de una cóclea de ratas. La barra en la foto representa una distancia de 200 μm . (EV - escala vestibular, EM - escala media, ET - escala timpánica, OC - órgano de Corti, CR - canal de Rosenthal, MD - modiolo).
- C) Fotografía tomada al microscopio óptico del órgano de Corti de ratas. La barra en la foto representa una distancia de 50 μm . (int - células ciliadas internas, ext - células ciliadas externas).

Todos los compartimentos cocleares se encuentran llenos de líquido. Las escalas vestibular y timpánica contienen un fluido con una composición electrolítica, similar a la del líquido cefalorraquídeo y a la del plasma sanguíneo, denominado perilinfa. La escala media contiene endolinfa, un fluido con alta concentración de potasio y baja concentración de sodio (Smith *et al.*, 1954).

Las células transductoras de la cóclea son las células ciliadas, que se localizan en el Órgano de Corti, una estructura compleja situada sobre la membrana basilar (figura 1C). Las mismas, son de dos tipos: externas e internas.

El primero de estos grupos se encuentra formando por tres (en ocasiones cuatro) hileras de células. En total, existen alrededor de 12 000 células ciliadas externas, ubicadas en posición lateral a las células pilares (otro de los grupos celulares que forma el Órgano de Corti).

Por su parte, las células ciliadas internas forman una única hilera de aproximadamente 3 500 células, unidas a la cara media de las células pilares, y (a diferencia de las externas) rodeadas por células de soporte.

Pese a que ambas poblaciones tienen función sensorial, las células ciliadas externas también tienen un papel efector, provocando su actividad cambios en la sensibilidad y en la selectividad a frecuencias de las diferentes regiones cocleares (Nobili *et al.*, 1998).

1.1.2)- Aspectos morfológicos fundamentales del sistema auditivo central en mamíferos.

El Sistema Nervioso Auditivo Central (SNAC) es un complejo con múltiples componentes y niveles, muchos de ellos en paralelo y secuenciales, que a su vez mantienen una organización interactiva. Anatómicamente, el SNAC está constituido por neuronas que conforman el nervio auditivo y vías del tronco cerebral, así como por subcorteza, corteza auditiva primaria, corteza de asociación y cuerpo calloso. Estas neuronas se encuentran en la cóclea, existiendo aproximadamente 30 000 que llevan información aferente desde las células ciliadas de cada oído hasta el Sistema Nervioso Central (Nadol 1997).

El soma de estas células se localiza en el canal de Rosenthal, una estructura que forma parte del modiollo coclear (figura 1B). Sus cuerpos neuronales forman una estructura ganglionar denominada ganglio espiral, por lo que se les denomina neuronas del ganglio espiral (NGE). La mayoría de estas últimas son neuronas sensoriales bipolares. Presentan procesos dendríticos que se proyectan hacia el Órgano de Corti y axones que hacen sinapsis con neuronas localizadas en el núcleo coclear, las cuales, a su vez, conforman una estructura localizada en el bulbo raquídeo, constituyendo la primera estación de relevo de la vía auditiva (Lorente de Nó, 1981).

Según su morfología, las neuronas del ganglio espiral pueden ser de dos tipos (Spoendling, 1981; Kiang *et al.*, 1982). El más abundante, denominado NGE tipo I, incluye del 85 al 95 % del total de neuronas que forman el ganglio. Estas neuronas hacen sinapsis con las células ciliadas internas y presentan cuerpos celulares grandes, con un núcleo redondo y un nucleolo prominente (Bernard; Spoendlin; 1973). Cada una de las NGE tipo I, hace sinapsis con sólo una célula ciliada interna. Sin embargo, la información transducida por cada una de estas células ciliadas es llevada al SNC por aproximadamente 10 NGE tipo I (Kandell *et al.*, 2000).

Las NGE tipo II son las neuronas ganglionares que hacen sinapsis con las células ciliadas externas. A diferencia de las NGE tipo I, presentan un núcleo de

forma lobulada, con un nucleolo muy pequeño y axones que carecen de mielina. Además, presentan un patrón de inervación que se diferencia del arriba descrito, llegando incluso a sugerirse que forman sinapsis recíprocas con las células ciliadas externas (Spoendlin, 1984).

Por simple que pueda ser un proceso auditivo, este se ve influido por funciones de nivel cognitivo superior, como la atención, el aprendizaje, la motivación, la memoria y la decisión de procesamiento. La comprensión del lenguaje hablado depende, en primera instancia, de la detección sensorial inicial, así como del análisis perceptual de la señal acústica que es procesada por el SNAC. Los parámetros de un estímulo dado, son probablemente modificados de forma sucesiva en los diferentes niveles de la vía auditiva central (Cañete, 2006). Esta vía es una cadena interconectada de núcleos con varios eslabones, donde los impulsos llegan por las fibras del nervio coclear y también a nivel troncoencefálico.

Pueden distinguirse tres grupos de núcleos dedicados al procesamiento de la señal sonora: los núcleos cocleares, el complejo olivar superior, y los núcleos del lemnisco lateral (Heimer, 1995). A nivel del mesencéfalo, el colículo inferior constituye una estación obligatoria de relevo de la información auditiva que va a alcanzar el tálamo, así como el lugar de donde parten circuitos descendentes hacia el complejo olivar superior o los núcleos cocleares (Geniec *et al.*, 1971).

1.1.3)- La selectividad a frecuencia de las diferentes regiones cocleares en mamíferos.

La gama de frecuencias intrínsecas de los estímulos acústicos detectables por un individuo varía entre las diferentes especies de mamíferos, siendo para los humanos de 20 Hz a 20 kHz. A lo largo de la cóclea, existe un gradiente de selectividad a frecuencias. En este proceso de selectividad está implicada directamente la membrana basilar, de composición fibrosa, que separa la rampa media de la timpánica. Contiene de 20 000 a 30 000 fibras basilares, que se extienden desde el centro óseo de la cóclea (el modiolo) hasta su pared externa.

Estas fibras son estructuras con forma de junco, rígidas y elásticas, ancladas por sus extremos basales al modiolo, pero no sujetas por sus extremos distales, que se encuentran insertados en la laxa membrana basilar. Como las fibras son rígidas y tienen un extremo libre, vibran como las lengüetas de una armónica.

La longitud de las fibras basales va aumentando en la medida que se avanza a partir de la base (ventanas oval y redonda) al vértice de la cóclea, desde una longitud de unos 0.04 milímetros cerca de aquella, hasta 0.5 milímetros en el vértice de la cóclea (helicotrema), lo que supone un aumento de longitud por 12 veces.

El diámetro de las fibras, en cambio, desciende desde la base hasta el helicotrema, de modo que su rigidez global disminuye más de 100 veces. En consecuencia, las fibras cortas y rígidas próximas a la ventana oval de la cóclea vibran más con una frecuencia alta, mientras que las fibras largas y flexibles del vértice vibran mejor en una frecuencia baja.

Así pues, la resonancia de la membrana basilar para altas frecuencias tiene lugar cerca de la base, donde las ondas sonoras entran en la cóclea por la ventana oval; mientras que la resonancia para bajas frecuencias tiene lugar cerca del helicotrema, fundamentalmente por las diferencias en la rigidez de las fibras, pero también por el aumento de la “carga”, como masas adicionales de líquido que vibran en todo el trayecto entre la membrana basilar, por un lado, y las ventanas oval y redonda, por el otro (Guyton y Hall, 2001).

Además de las características mecánicas de la membrana basilar para discriminar las frecuencias en la cóclea, son importantes las características de la actividad eléctrica desarrollada por las células ciliadas. Este es un proceso complejo, donde los diminutos cilios o estereocilios se proyectan hacia arriba desde las células ciliadas, rozando o introduciéndose en la capa superficial de gel de la membrana tectoria, el cual se sitúa por encima de los estereocilios, en la rampa mediana.

La inclinación de los cilios en una dirección concreta despolariza las células ciliadas, mientras que una dirección contraria las hiperpolariza. Esto, a su vez, excita las fibras nerviosas auditivas, que establecen sinapsis con sus bases

(Kandell *et al.*, 2000). El mecanismo por el cual la vibración de la membrana basilar excita las terminaciones ciliadas se representa en la figura 2.

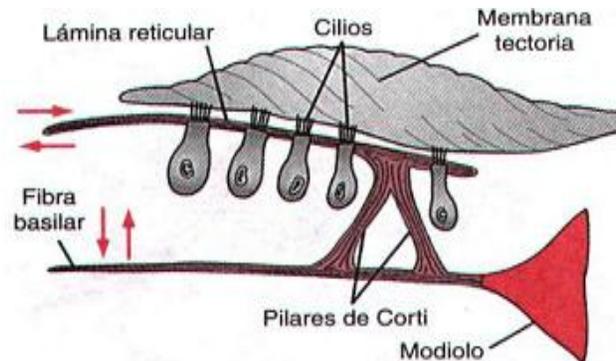


Figura 2: Estimulación de las células ciliadas por el movimiento de vaivén de los cilios que se introducen en la cubierta de gel de la membrana tectoria.

1.2)- Procesamiento de estímulos repetitivos y de estímulos de amplitud modulada.

Contar con estímulos acústicos más eficientes, ha sido siempre un aspecto de gran importancia en el terreno de la electroaudiometría. Diversos estudios se han centrado en la búsqueda de estímulos capaces de generar respuestas más específicas en frecuencia, con énfasis en aquellos que provoquen respuestas de mayor amplitud, facilitando la detección y extracción del potencial evocado.

Para el caso particular de las respuestas de estado estable, el interés en reducir el error de estimación presente en la detección y extracción de la respuesta (particularmente en frecuencias graves), así como la preocupación por lograr una detección más rápida de las respuestas (capaz de traducirse dentro la práctica clínica en una reducción del tiempo necesario para cumplimentar una evaluación objetiva de la audición), han motivado la búsqueda de nuevas variantes de estimulación acústica (Dolphin, 1997; Stürzebecher *et al.*, 2001; John *et al.*, 2001, 2002).

Los primeros estímulos empleados para obtener respuestas auditivas de estado estable, fueron el clic (o chasquido) y los estímulos tonales breves (Geisler, 1960). El clic, muy utilizado para la obtención de PEAT, se caracteriza por su breve duración, con tiempos de subida y caída inferiores a los 5 ms, capaces de provocar la activación sincrónica de múltiples subpoblaciones neurales.

Existe, sin embargo, una relación inversa entre la duración del estímulo acústico y el grado de dispersión de su energía espectral. Desde que el chasquido se produce, al aplicar a un audífono un pulso de voltaje de muy corta duración (menos de 200 μ s), que en la mayoría de los casos tiene la forma de un pulso rectangular, la energía acústica espectral se distribuye en forma aproximadamente plana, con un límite superior de frecuencia que corresponde al recíproco de la duración del pulso cuadrado que le dio origen.

Los estímulos tonales breves (ETB), por su parte, han sido también empleados en la obtención de respuestas transientes. A diferencia del estímulo clic, estos se obtienen a partir de sinusoides puras moduladas por pulsos de voltaje con determinada envolvente (exponencial o trapezoidal), representando un compromiso entre el clic y los estímulos tonales de larga duración utilizados en la audiometría convencional (Torres-Fortuny, 2004). El espectro del ETB tiene una banda central de mayor energía correspondiente a su frecuencia nominal, y bandas laterales hacia frecuencias mayores y menores. La periodicidad de las bandas laterales está determinada por la duración del estímulo tonal, y la energía relativa contenida en cada una de las bandas laterales es mayor mientras más breve sea el tiempo de ascenso y caída del estímulo.

La selección de los parámetros de duración del ETB se determina, en cierta medida, por el tipo de PEA que se quiere registrar. Mientras menor sea la latencia de los componentes del PEA, más breves han de ser los estímulos que lo provoquen. Por tanto, el problema de la dispersión de frecuencia del estímulo es más grave cuando se registran PEA de corta latencia. La forma más utilizada para intentar solucionar el problema de la dispersión de energía acústica del estímulo en los PEAT ha sido emplear técnicas de enmascaramiento (Stapells *et. al.*, 1985), pero estas, a pesar de lograr respuestas más específicas en frecuencia que las

provocadas por el estímulo clic o el ETB, son costosas en tiempo, complejas desde el punto de vista técnico, y requieren de una alta experticia para la interpretación y análisis de los resultados. Por otra parte, no se conoce adecuadamente el posible efecto del estímulo (ruido) enmascarante sobre oídos con daño coclear (Torres-Fortuny, 2004).

Campbell y colaboradores (1977) fueron los primeros en obtener PEAAE, mediante el uso de tonos continuos modulados sinusoidalmente en amplitud. Se conoce que un tono continuo modulado en amplitud (tono AM) tiene un componente espectral a nivel de la frecuencia portadora (F_p) y otros dos componentes de menor energía a la frecuencia portadora más / menos la frecuencia moduladora (FM) (Lins *et al.*, 1995). Esto significa que la modulación de la amplitud no es más que un tipo de modulación no lineal, consistente en hacer variar la amplitud de la onda portadora de forma que esta cambie de acuerdo con las variaciones de nivel de la señal moduladora. Se trata, pues, de modificar la amplitud de una señal de alta frecuencia (portadora) en función de otra de frecuencia baja (moduladora), la cual constituye la señal que contiene la información a transmitir (figura 3).

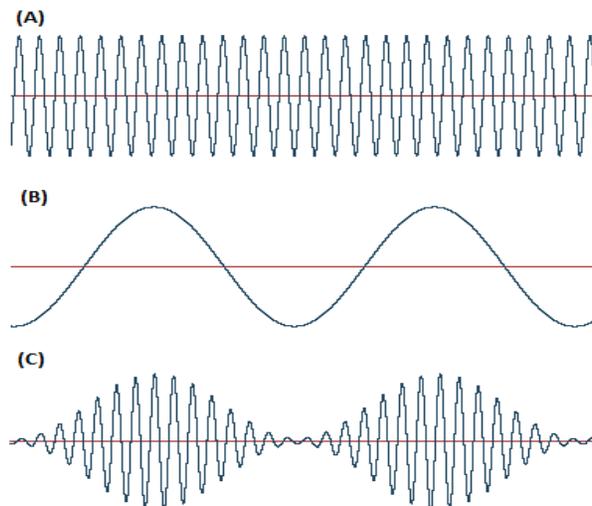


Figura 3: Modulación de la amplitud de una onda. A)- Onda portadora de alta frecuencia. B)- Onda moduladora que porta la señal que se quiere transmitir. C)- Onda resultante de amplitud modulada.

Basada en las propiedades de rectificación del oído interno, la respuesta a este tipo de estímulo, una vez transformada al dominio de la frecuencia, quedaría representada como un componente espectral a la frecuencia con la que se moduló dicho tono portador. Esta característica de los tonos modulados los convierten en estímulos más específicos en frecuencia que los chasquidos y los ETB comúnmente usados para obtener los PEAAE.

Hasta ahora, el estímulo más utilizado en la práctica clínica para la obtención del PEAAE es el tono AM, ya sea presentado de forma aislada o en combinación con otros tonos AM. También se presentan los estímulos repetitivos durante todo el tiempo de registro, a lo que el sistema auditivo responde con el fenómeno de adaptación, ya que, invariablemente, un estímulo constante hace que el receptor deje de descargar o responder. A este último fenómeno se le conoce como adaptación o acomodación (Cardinali, 2007).

Estos tipos de estímulo han sido empleados con alentadores resultados en la determinación objetiva de los umbrales de audibilidad en niños y adultos, así como en pacientes hipoacúsicos, sobre todo para la detección temprana de defectos auditivos. Varios estudios han examinado la efectividad del PEAAE, particularmente a frecuencias entre 80 y 110 Hz, demostrando sus autores la validez de la técnica de PEAAE múltiples como herramienta electroaudiométrica (Herdman *et. al.*, 2003).

Aún así, dichos resultados ponen en evidencia algunas limitaciones del estímulo AM en la generación de la respuesta, particularmente en la que se da a altas frecuencias. Esto puede ser explicado de tres formas diferentes: (1) por la poca sincronía o variabilidad de las señales, lo que genera respuestas de baja amplitud (Lins *et. al.*, 1996); (2) por la posible influencia enmascarante del ruido ambiental (Picton *et. al.*, 2004); o (3) por un mecanismo de supresión de las altas sobre las bajas frecuencias. Además, debe tomarse en cuenta que la mayoría de los estudios que utilizan estimulación múltiple mezclan aisladamente los tonos calibrados, sin realizar una compensación de su energía relativa según las diferencias de audibilidad particulares. Esto pudiera también explicar la distinta efectividad relativa de la técnica entre frecuencias graves y agudas.

Por las razones antes señaladas, varios autores se han centrado en la búsqueda de nuevas variantes de estimulación (Prado, 2005; Sussman *et al.*, 2008; Torres-Fortuny *et al.*, 2011). La búsqueda de estímulos que generen respuestas de mayor amplitud, se basa en la modificación de alguno de los parámetros que caracterizan los tonos modulados (estímulo portador, tipo, o profundidad de modulación y/o envolvente del estímulo).

1.3) - Los estudios de potenciales evocados auditivos en mamíferos.

En efecto, la respuesta del sistema auditivo a diferentes estímulos ha sido estudiada con diferentes técnicas de registros electrofisiológicos, incluyendo la realización de registros unineuronales, multineuronales y de potenciales de campo lejano (potenciales evocados). El hecho de que estos últimos haya sido de los más estudiados y utilizados en su variante de PEAAE, responde, sobre todo, a que la estimulación acústica produce cambios eléctricos en el sistema nervioso desde los receptores auditivos de la cóclea hasta las áreas secundarias y terciarias de la corteza cerebral, así como en áreas frontales asociadas con el lenguaje (Prado, 2005). Esta actividad eléctrica evocada se inicia desde apenas un milisegundo después de presentado el estímulo, y dura varios cientos de milisegundos.

Lógicamente, el rango de latencias en que se distribuyen los Potenciales Evocados Auditivos (PEA) es tan grande que resulta imposible analizar en un solo trazado todos los eventos eléctricos que lo constituyen. De ahí que, para su estudio, se halla dividido convencionalmente en rangos de latencia, los cuales se clasifican en PEA de corta latencia (0 a 10 ms), PEA de latencia media (10 a 50 ms) y PEA de larga latencia (más de 50 ms) (Picton *et al.*, 1974).

Dentro de los PEA de corta latencia, se ubican la actividad generada en la cóclea y su vecindad inmediata, los Potenciales Evocados Auditivos de Tallo Cerebral (PEATC), y los Potenciales Evocados Auditivos de Estado Estable (PEAAE), que incluyen actividad generada en el nervio auditivo y en las estructuras de la vía auditiva ubicadas en el tallo encefálico (Coutin, 2002).

1.3.1)- Aplicaciones generales de los potenciales evocados como batería diagnóstica.

Una de las aplicaciones clínicas más difundidas de los PEA ha sido su empleo como indicador funcional para la evaluación objetiva de la audición. El conocimiento de sus mecanismos de generación, ha permitido que en los últimos años se elaboren baterías diagnósticas de gran efectividad para el estudio de las vías sensoriales. Sin embargo, estos potenciales constituyen una disciplina relativamente joven en comparación con otros campos de la electrofisiología (como el EEG o el EMG), pues, para poder registrarlos y analizarlos de modo confiable, se ha hecho imprescindible el desarrollo impetuoso de la electrónica y la computación en mayor medida que en ninguna otra área electrofisiológica, lo cual responde, sobre todo, a la necesidad de extraer la "señal" desde el seno del "ruido" de fondo en que están habitualmente sumergidos. Dicho ruido, a su vez, está constituido por el EEG, el EMG, el ruido interno electrónico, las interferencias y las corrientes parásitas.

Aún así, los PEA permiten obtener un estimado confiable y sensible del estado de la función de las vías sensoriales. Lógicamente, su valor está en función del conocimiento existente en torno al significado anatomofuncional de los componentes y las alteraciones con que cuenta. Su utilidad real, específicamente los de corta latencia, está dada en que reflejan fundamentalmente actividad en los receptores y vías aferentes subcorticales, y, con grado limitado, en áreas sensoriales corticales primarias.

El beneficio de la aplicación de los PEA que pueda obtener el clínico práctico, depende de su conocimiento sobre el modo en que las enfermedades que estudia pueden comprometer la anatomía y fisiología de las vías y estructuras generadoras. No obstante, quedan aún muchos puntos oscuros en el conocimiento de los mecanismos generadores y la significación de las alteraciones de aquellos, por lo que se hacen necesarios nuevos estudios dirigidos a mejorar sus técnicas y aplicaciones.

1.3.2)- *Los potenciales evocados auditivos de estado estable (PEAEE).*

Específicamente, los PEAEE fueron descubiertos y utilizados como equipo clínico desde 1972, y en lo adelante se ha venido desarrollando y perfeccionando la técnica. Primero se probó en animales de laboratorio, pero ya en 1973 se hizo el primer registro en humanos. Luego, en 1978, se desarrollaron métodos para el análisis de amplitud y fase, produciéndose, hasta la actualidad, varios estudios en busca de un mejor aprovechamiento de los resultados que arrojan los registros, intentando diagnosticar y resolver tempranamente problemas de cualquier patología auditiva.

Los *potenciales auditivos de estado estable* son básicamente la respuesta cerebral obtenida por un estímulo acústico repetitivo, sostenida en el transcurso del tiempo en que dura el estímulo (Regan, 1989). Para ellos, este último se caracteriza por ser un tono puro que estimula unas pocas neuronas de la vía auditiva, en dependencia de la intensidad que se escoja; de manera que constituye una prueba mucho más específica para conocer el estado de las neuronas que se registran en ese momento por las características del propio registro que se obtiene. Se diferencian así de otras pruebas dirigidas a evaluar la audición, como es el caso de los PEATC, que tienen la posibilidad de determinar el umbral auditivo en un amplio espectro y de manera específica por frecuencias (Pérez Abalo *et al.*, 2003). Se caracterizan, además, porque la magnitud de la respuesta crece a medida que se incrementa el nivel de estímulo supra-umbral, además de que la fase varía sistemáticamente con el estímulo en frecuencia e intensidad.

En los PEAEE se ha encontrado actividad oscilatoria, fundamentalmente, en tres rangos de estimulación, cada una con un valor diferente desde el punto de vista audiométrico. En el rango entre 4 y 8 Hz, el PEAEE se origina por superposición de los PEA de larga latencia, representando la activación más completa de la vía auditiva (Maiste y Picton, 1989). Si se utilizan frecuencias de estimulación más rápidas, entre 70 y 110 Hz, el PEAEE se origina básicamente por superposición de respuestas transientes de más corta latencia (potenciales de

tronco cerebral). Por esta razón, no son afectadas por el sueño y la sedación, pudiendo ser registradas consistentemente en lactantes y niños pequeños (Pérez Abalo *et al.*, 2003).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tomando en cuenta los elementos anteriores, se procedió a diseñar y ejecutar la fase experimental de la presente investigación, instrumentando los recursos necesarios para obtener los resultados que más adelante permitieran dar respuesta a los objetivos planteados en la introducción de este trabajo.

2.1)- Animales de experimentación.

La muestra fue conformada por 8 ratas adultas, sin hacer diferenciación de sexo. Previo a los experimentos, a cada animal le fue realizado un examen otoscópico, para comprobar que no presentara daños en la membrana timpánica.

Además, fueron comprobados los umbrales de audición mediante registros de PEATC. Ninguno de los sujetos presentó anomalías de la membrana timpánica ni de los umbrales auditivos. En todos los casos, los resultados fueron inferiores a 25 dB SPL (1 dB SPL~20 μ Pa).

Los animales fueron mantenidos en cajas estándar, bajo ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura de entre 22 y 24°C. Durante todo el estudio, tuvieron libre acceso a comida y agua.

Para la realización de los registros electrofisiológicos, fueron anestesiados con la coadministración de Ketamina (75.0 mg/kg, ip) y Diazepán (0.5 mg/kg, ip). En algunos casos, fue necesario administrar Atropina (0.1 mg/kg, ip) para disminuir la secreción del aparato digestivo, provocada por efecto de la Ketamina.

Además, fueron suministradas dosis suplementarias de anestesia, manteniendo al animal en un estado donde los reflejos motores no resultasen evidentes. Estas dosis consistieron en 1/3 de la dosis inicial, y generalmente fueron suministradas cada 30 min.

Los protocolos y métodos utilizados en el experimento, estuvieron en correspondencia con las Directivas 13 y 14 del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Además, fueron realizados con la

aprobación del Comité de Ética del Centro de Neurociencias de Cuba, en la Ciudad de la Habana.

2.2)- Estimulación acústica.

El diagrama en bloques del equipamiento utilizado para la estimulación acústica y la obtención de la respuesta electrofisiológica es mostrado en la figura 4. Los estímulos fueron generados digitalmente y convertidos a la forma análoga, utilizando un equipo Audix 4-A (Neuronic S. A.).

Este equipamiento es controlado por un programa computacional específicamente diseñado para la adquisición y análisis de potenciales evocados auditivos.

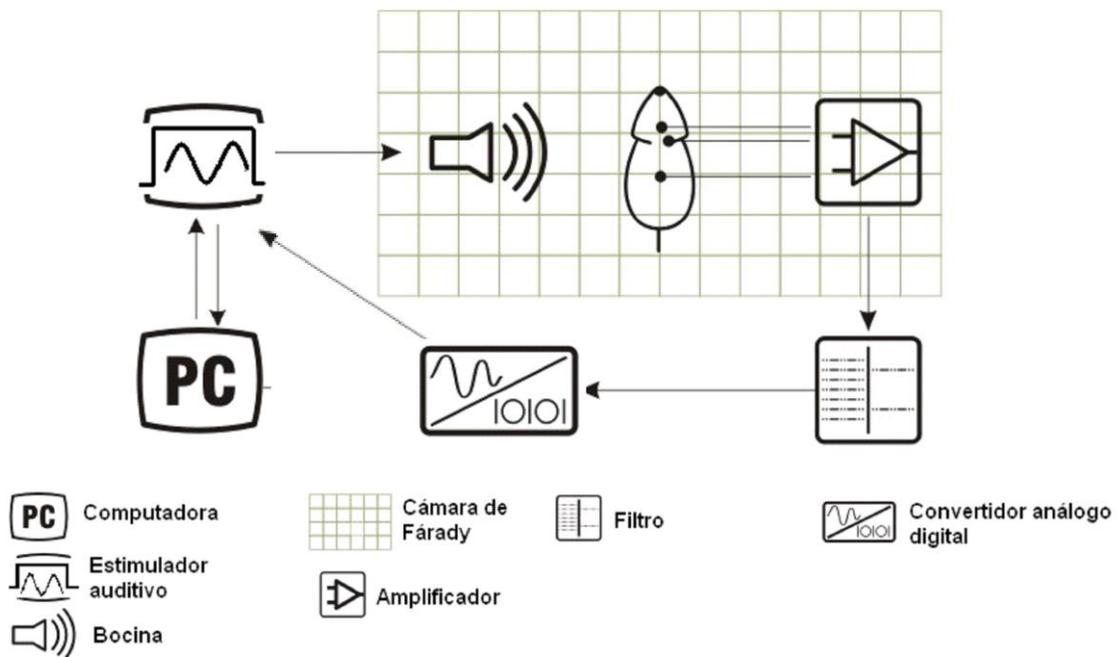


Figura 4: Diagrama en bloques de los equipos y procesos utilizados para la obtención de PEAAE. En el animal, se encuentran representadas las posiciones de diferentes electrodos de registro. La amplificación, filtraje y digitalización de la señal electrofisiológica no se representan como equipos independientes, sino como pasos necesarios para la obtención de la respuesta.

Todos los estímulos fueron presentados monoauralmente en el oído derecho del animal, a través de audífonos de inserción ER 3A Etymotic Research. Estos consistieron en tonos continuos modulados en amplitud, con frecuencias portadoras de 4, 6 u 8 kHz.

Para los estímulos de 8 kHz, fueron empleadas intensidades de estimulación de 30, 50 o 70 dB SPL. Para el resto de las frecuencias portadoras, se utilizaron solamente tonos de 70 dB SPL.

En todos los casos, la modulación de la amplitud se realizó a una frecuencia constante de 115 Hz, y a una profundidad de modulación que fue del 100 %.

2.3)- Registros de potenciales evocados auditivos de estado estable del nervio auditivo.

Como resultado, fueron obtenidos PEAAE, para lo cual se situaron electrodos de agujas en el vértice de la cabeza del animal (electrodo positivo), en el cuello (electrodo negativo) y en el tórax (electrodo de tierra).

La impedancia de los electrodos fue mantenida por debajo de 10 k Ω . La actividad bioeléctrica fue amplificada 1.2×10^4 , y filtrada entre 10 y 300 Hz. Posteriormente, esta se digitalizó con una resolución de 8 bits, utilizando una frecuencia de muestreo de 920 Hz.

A cada animal le fueron realizados 30 registros electrofisiológicos para cada una de las combinaciones frecuencia-intensidad antes mencionadas. Cada registro estuvo compuesto por 30 segmentos continuos de 8192 muestras.

A su vez, cada segmento estuvo dividido en 16 ventanas de 512 puntos. La amplitud de la actividad eléctrica de cada ventana fue específicamente analizada, de manera que pudieran ser excluidas del registro aquellas que presentasen variaciones de potencial superiores los 50 μ V.

Por lo general, menos de 5 ventanas fueron excluidas en todo el registro. Cada segmento se completó una vez muestreados los 8192 puntos.

2.4)- Obtención de datos primarios.

El procesamiento de los registros y la obtención de los datos primarios (amplitud del PEAE) fue realizado fuera de línea, mediante una aplicación del programa MatLab (versión 7.1), diseñado en el Departamento de Neurociencias Básicas del Centro de Neurociencias de Cuba. Como primer paso, se construyó una matriz de datos a la manera que muestra en la figura 5. El procesamiento fue realizado a dos niveles: dentro de cada registro, y entre registros.

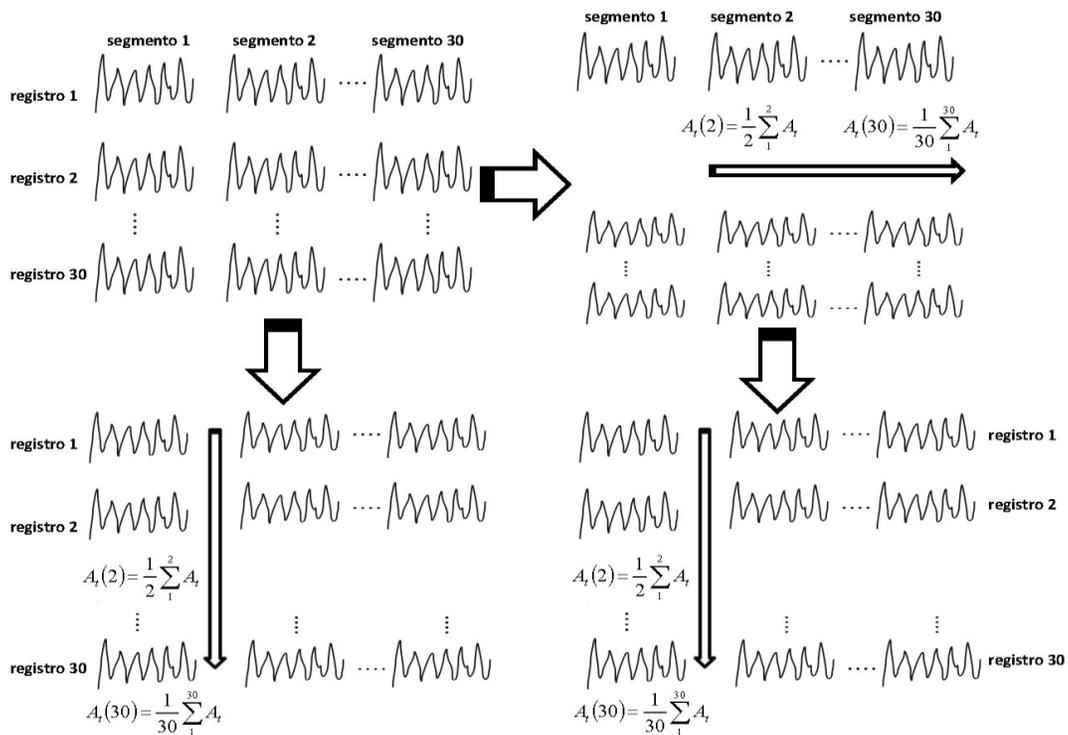


Figura 5: Diagrama representativo de las matrices de datos construidas a partir de los registros de PEAE. En el panel superior izquierdo, se muestra la matriz de datos originales, y en el panel superior derecho la promediación dentro de cada registro. Los paneles inferiores representan el procesamiento entre registros cuando estos fueron realizados a partir de los datos originales (izquierdo) y a partir de los segmentos promediados (derecho). Las flechas entre paneles señalan la continuidad de los pasos de procesamiento, y las incluidas en cada panel la dirección de la promediación.

Los 30 segmentos de potencial de cada registro fueron promediados linealmente en el dominio del tiempo. En este proceso fueron obtenidos 30 nuevos segmentos de potencial, donde cada uno fue el resultado de la promediación de todos los segmentos registrados hasta ese momento.

De modo más específico, el segmento 2 fue el resultado de promediar los valores de potencial de los segmentos originales 1 y 2, el segmento 3 fue el promedio de los tres primeros segmentos, y así sucesivamente. Nótese, entonces, que los valores de potencial de cada segmento, a partir del segundo, dependen, en cada caso, de los valores del potencial de los segmentos anteriores.

Posteriormente, se realizó el procesamiento entre registros. Para ello, el segmento *i*-ésimo de cada uno fue promediado con el segmento correspondiente del resto. Es decir, el segmento 1 del primer registro fue promediado con el segmento 1 del resto de los registros, el segmento 2 con el segundo del resto de los registros, y así sucesivamente.

Cada uno de los segmentos resultantes finales fue transformado al dominio de la frecuencia aplicando la Transformada Rápida de Fourier (FFT). En cada caso, la amplitud de potencial a 115 Hz (frecuencia de modulación de la amplitud del estímulo) fue calculada a partir del espectro de potencia obtenido.

Como durante el proceso de obtención de esta respuesta los valores de potencial de cada segmento dependían de los valores de potencial de los segmentos anteriores, los valores de amplitud obtenidos a partir de la FFT fueron tratados como amplitudes promediadas en el resto del documento.

Este segundo paso de análisis (el procesamiento entre registros), fue realizado, además, utilizando los segmentos de potencial no promediados. Es decir, nuevamente el segmento 1 del primer registro fue promediado con el segmento 1 del resto de los registros, el segmento 2 con el segundo segmento de aquel, y así sucesivamente.

Sin embargo, en este caso, el segmento 2 de un registro determinado no era la promediación de los dos primeros segmentos de ese registro, sino el segmento original. Debido a que, en este caso, los valores de potencial de cada segmento no dependían de los valores de potencial en los segmentos anteriores, las

amplitudes obtenidas a partir de la FFT fueron tratados en el resto del documento como amplitudes independientes, o amplitudes no promediadas.

A partir de los valores de amplitud hasta aquí descritos, fueron construidas, para cada combinación frecuencia-intensidad, curvas de amplitud contra tiempo, con el objetivo de describir el curso temporal del PEAAE.

Finalmente, fue calculado el porcentaje de variación de la amplitud según la siguiente expresión:

$$\%Amp=100-100Amp20/Amp1$$

Donde %Amp representa la variación de amplitud entre el primero y el promedio de los últimos 20 segmentos, Amp20 el promedio de amplitud de los últimos 20 segmentos, y Amp1 el valor de amplitud del segmento 1.

Para ello, se consideró que, a partir del segmento 10, tanto las amplitudes promediadas como las independientes se mantuvieron oscilando alrededor de un valor estable de potencial, considerando la señal estacionaria en el tiempo.

2.5)- Procesamiento estadístico.

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa STATISTICA (versión 6.0). Como estadígrafos de posición y dispersión fueron utilizados la media y su desviación estándar.

Luego de determinar que los datos cumplían una distribución normal y que los valores obtenidos para las diferentes combinaciones frecuencia-intensidad presentaban homogeneidad de varianza, fueron realizados ANOVA de una vía ($p < 0.05$), para determinar el efecto de la frecuencia portadora y de la intensidad de estimulación sobre la amplitud promedio de la respuesta.

De igual manera, se analizó el efecto de la frecuencia portadora y la intensidad sobre el por ciento de variación de la amplitud, tanto para el caso de los valores promediados como para el de los independientes.

Finalmente, la relación entre los porcentos de variación de ambas amplitudes (promediadas e independientes) se analizó mediante la prueba de correlación de Pearson ($p < 0.05$).

RESULTADOS

3.1)- Efecto de la frecuencia portadora y la intensidad del estímulo sobre la amplitud promedio del PEAAE.

La figura 6 muestra el efecto de la intensidad y la frecuencia intrínseca de estímulos acústicos sobre la amplitud promedio de los PEAAE en ratas adultas. Como puede observarse, el aumento de la intensidad de estimulación entre 30 y 70 dB SPL provocó el aumento continuo de la amplitud de la respuesta (figura 6A).

Por otra parte, la amplitud del potencial evocado aumentó cuando la frecuencia portadora del estímulo ascendió de 4 a 6 kHz y mostró una ligera disminución a 8 kHz (figura 6B).

El análisis estadístico de los datos demostró que tanto la intensidad como la frecuencia portadora del estímulo tuvieron un efecto significativo sobre la amplitud del PEAAE ($F=67.47$, $p<0.001$ y $F=7.65$, $p<0.05$ para el efecto de la intensidad y la frecuencia intrínseca, respectivamente).

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey demostró que, efectivamente, la amplitud de la respuesta aumentó de manera significativa cuando la intensidad del estímulo se incrementó entre 30 y 70 dB SPL. Esta prueba también permitió observar que la amplitud del potencial evocado obtenido con estímulos de 6 kHz es estadísticamente superior a la de la respuesta generada por tonos de 4 kHz. A su vez, las medias de amplitud obtenidas a 6 y 8 kHz no presentaron diferencias significativas entre sí.

Dichos resultados muestran las amplitudes promedios de la respuesta auditiva analizada. Es decir, representan las amplitudes obtenidas después de promediar todos los segmentos correspondientes a un registro electrofisiológico. Sin embargo, enmascaran las posibles variaciones de la respuesta entre los diferentes segmentos.

Se hizo necesario, por tanto, analizar los cambios producidos en la amplitud del PEAAE durante la promediación de sus segmentos, así como el posible efecto

de la intensidad y la frecuencia de estimulación sobre la magnitud de estos cambios.

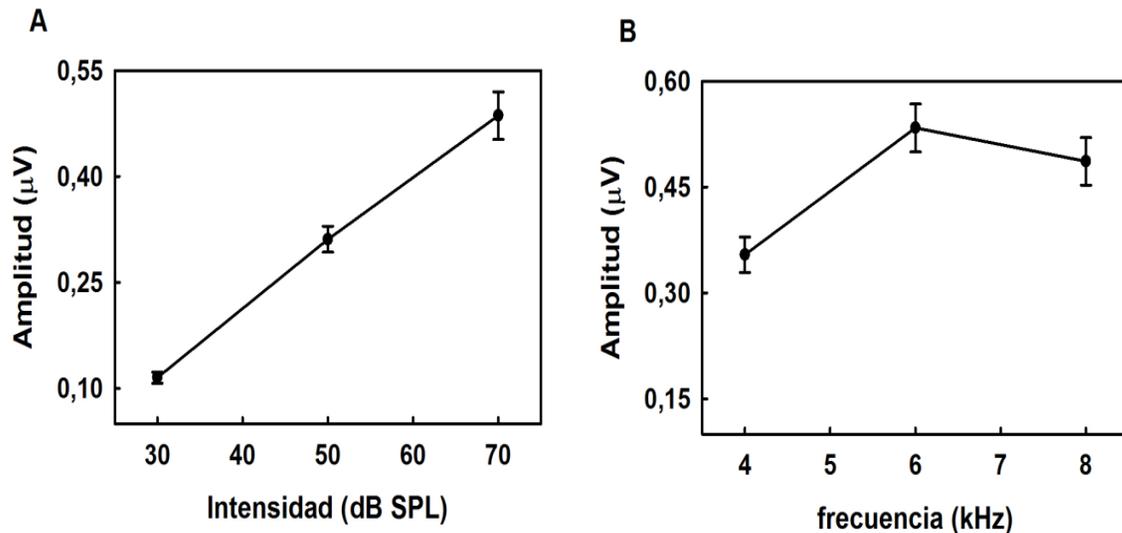


Figura 6: Amplitudes promedio del PEAE de ratas adultas. A)- Efecto de la intensidad del estímulo sobre la amplitud de la respuesta. B)- Efecto de la frecuencia portadora. Cada punto representa la media y el error estándar de la media obtenida a partir de 8 individuos. A su vez, la amplitud de la respuesta de cada uno fue calculada mediante los valores promedio obtenidos en cada uno de los registros realizados (n=30).

3.2)- Curso temporal de la amplitud del PEAE durante la obtención de un registro.

La figura 7 muestra oscilogramas representativos de diferentes segmentos de un mismo registro durante la obtención del PEAE. Como se mencionó anteriormente, la respuesta final de este potencial evocado se logra mediante un proceso de promediación. Por tanto, las variaciones obtenidas en un determinado segmento de registro son el resultado de la promediación de este y los segmentos anteriores.

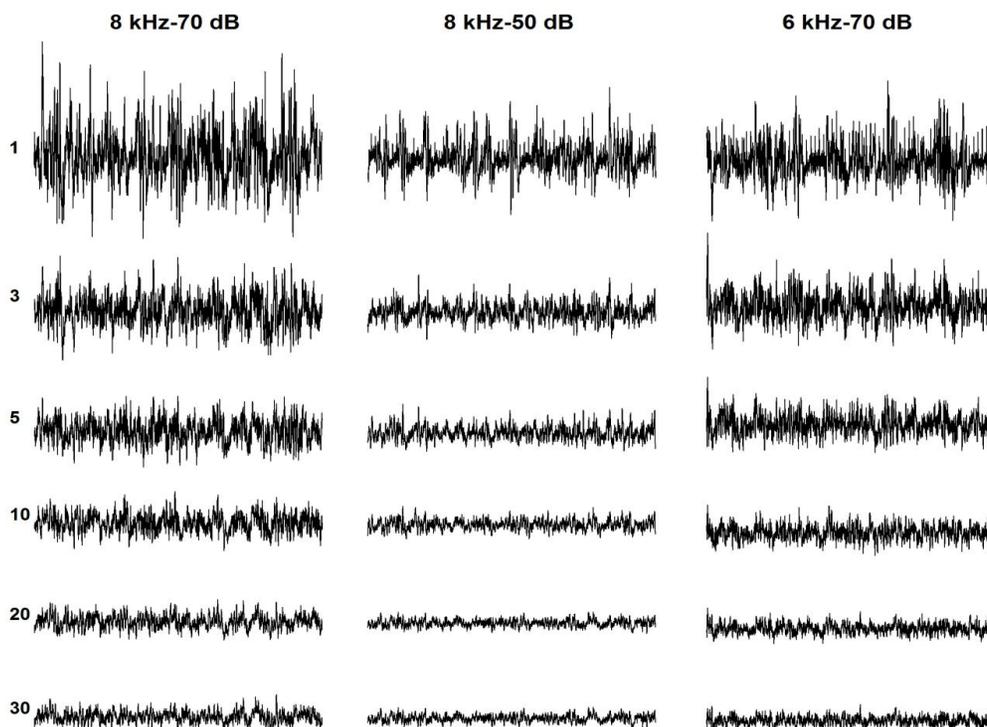


Figura 7: Oscilogramas de segmentos de potencial obtenidos durante el registro de Potenciales Evocados Auditivos de Estado Estable de ratas adultas. En la parte superior de cada panel se señalan la intensidad y frecuencia de los estímulos que generaron la respuesta. En el extremo izquierdo se señala el número del segmento representado.

Como puede observarse en la figura, la amplitud de las oscilaciones del potencial evocado disminuyó a lo largo del proceso de promediación. Para cada uno de los estímulos utilizados, las variaciones de potencial de mayor amplitud fueron obtenidas en el primer segmento del registro. La amplitud de estas oscilaciones disminuyó progresivamente en los siguientes segmentos, y posteriormente se estabilizó hasta el final del registro.

La disminución de la amplitud del potencial evocado, para cada una de las intensidades de estimulación, fue evidente durante los primeros 8-10 segmentos de registro, correspondientes con los primeros 75-100 s de estimulación (figura 8).

Además, la magnitud de esta caída pareció aumentar a medida que se incrementó la intensidad del tono. Dicha disminución pareció también depender de la frecuencia de estimulación, siendo menos evidente cuando los animales fueron estimulados con tonos de 4 kHz, e incrementándose progresivamente al estimularse con tonos de 6 y 8 kHz (figura 9).

Para estas últimas frecuencias, la amplitud de la respuesta pareció estabilizarse entre los segmentos 4 y 6 para los estímulos de 6 kHz (50s de estimulación), y entre los segmentos 10 y 12 para los tonos de 8 kHz (90-100s de estimulación).

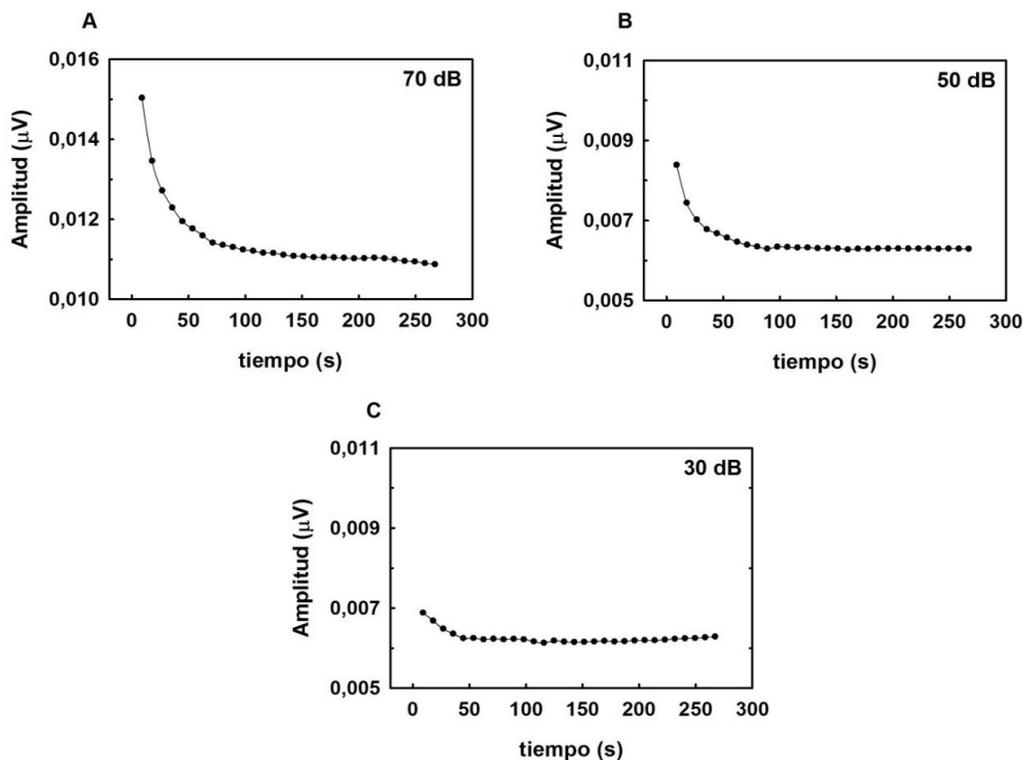


Figura 8: Curso temporal de la amplitud del PEAEE de ratas adultas obtenido durante el proceso de promediación al emplear estímulos de diferente intensidad. A)- Variaciones temporales de amplitud cuando la intensidad del estímulo fue 70 dB SPL. B)- Curso temporal cuando la intensidad del estímulo fue 50 dB SPL. C)- Curso temporal a 30 dB SPL. En todos los casos, la frecuencia portadora fue 8 kHz. Los valores mostrados representan la media de uno de los animales estudiados, calculada a partir de la promediación de los 30 registros obtenidos.

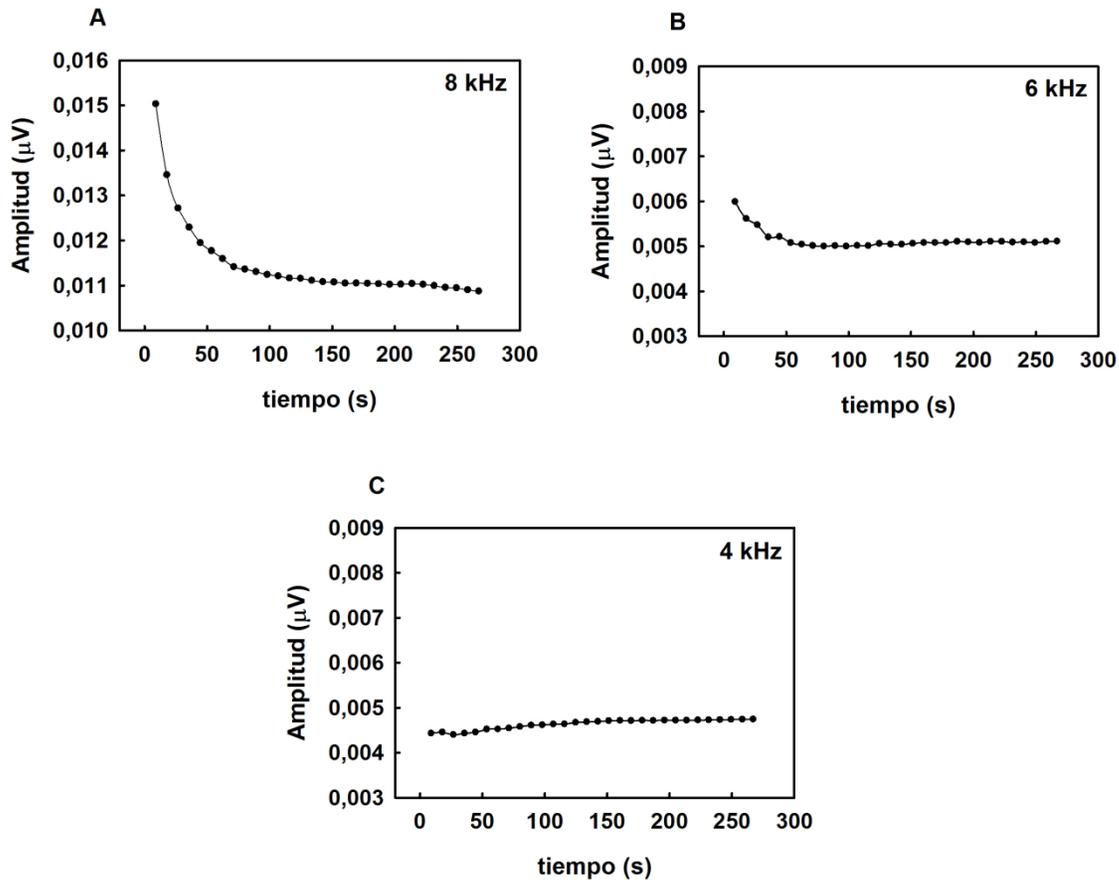


Figura 9: Curso temporal de la amplitud del Potencial Evocado Auditivo de Estado Estable de ratas adultas obtenido durante el proceso de promediación al utilizar tonos de diferentes frecuencias portadoras. A) Variaciones temporales de amplitud cuando la frecuencia portadora fue de 8 kHz B) Curso temporal cuando frecuencia intrínseca fue de 6 kHz. C) Curso temporal para tonos de 4 kHz. En todos los casos, la intensidad de estimulación fue 70 dB SPL. Los valores mostrados representan la media de uno de los animales estudiados, calculada a partir de la promediación de los 30 registros obtenidos.

Igualmente, para cada individuo se cuantificó el porcentaje de disminución de la amplitud de la respuesta. Los valores medios obtenidos para cada intensidad y frecuencia se muestran en la figura 10.

El análisis estadístico de los datos demostró que los valores promedio obtenidos para las diferentes intensidades y frecuencias portadoras difirieron entre

sí ($F=13.63$, $p<0.0001$ y $F=7.5$, $p<0.05$ para el efecto de la intensidad y la frecuencia, respectivamente).

Este análisis demostró, además, que el porcentaje de disminución de la respuesta fue mayor al incrementarse la intensidad de estimulación entre 30 y 50 dB, manteniendo un valor estable entre esta última intensidad y 70 dB.

Similar comportamiento se observó al analizar el efecto de la frecuencia portadora. Para esta variable de estimulación, la caída de la respuesta inducida por tonos de 6 kHz fue mayor en comparación con la provocada por estímulos de 4 kHz, y similar a la obtenida con tonos de 8 kHz.

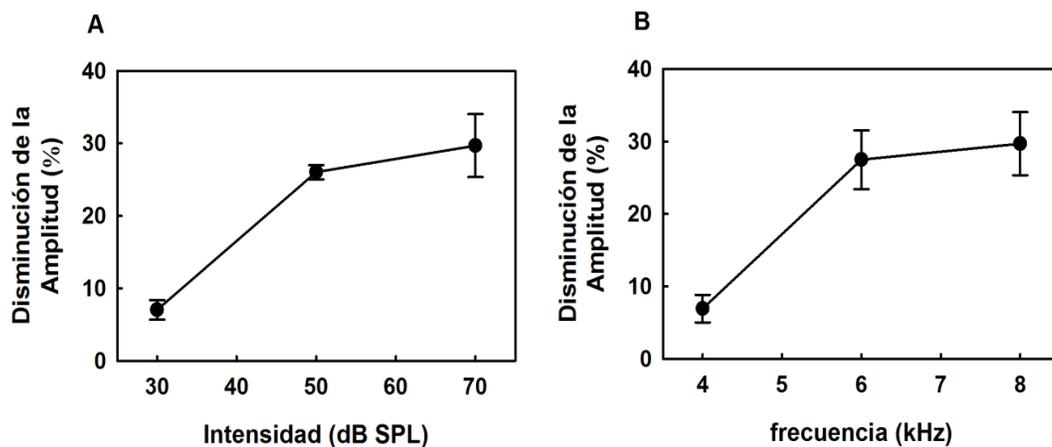


Figura 10: Porcentaje de disminución de la amplitud del PEAEE producido como efecto de la promediación en ratas adultas. A)- Efecto de la intensidad del estímulo sobre la disminución de la respuesta. B)- Efecto de la frecuencia portadora. Cada punto representa la media y el error estándar de la media obtenida a partir de 8 individuos. A su vez, la amplitud de la respuesta de cada individuo fue calculada a partir de los valores promedio obtenidos en cada uno de los registros realizados ($n=30$).

3.3)- Amplitud de la respuesta del PEAEE en segmentos no promediados.

Como se mencionó en el transcurso de los capítulos anteriores, una de las premisas para la obtención de potenciales evocados se refiere a las características estacionarias de la señal registrada. Este postulado asume que el

PEAEE puede obtenerse mediante el proceso de promediación, debido a que la respuesta electrofisiológica se mantiene constante a lo largo del registro. Por tanto, la promediación de la señal sólo contribuye a disminuir el ruido asociado al registro, pero no afecta la amplitud de la respuesta neuronal.

La hipótesis del presente trabajo plantea que la disminución de la amplitud del PEAEE durante la promediación pudiese estar dada no solo por la eliminación de ruido en el registro, sino también por la disminución de la respuesta neuronal.

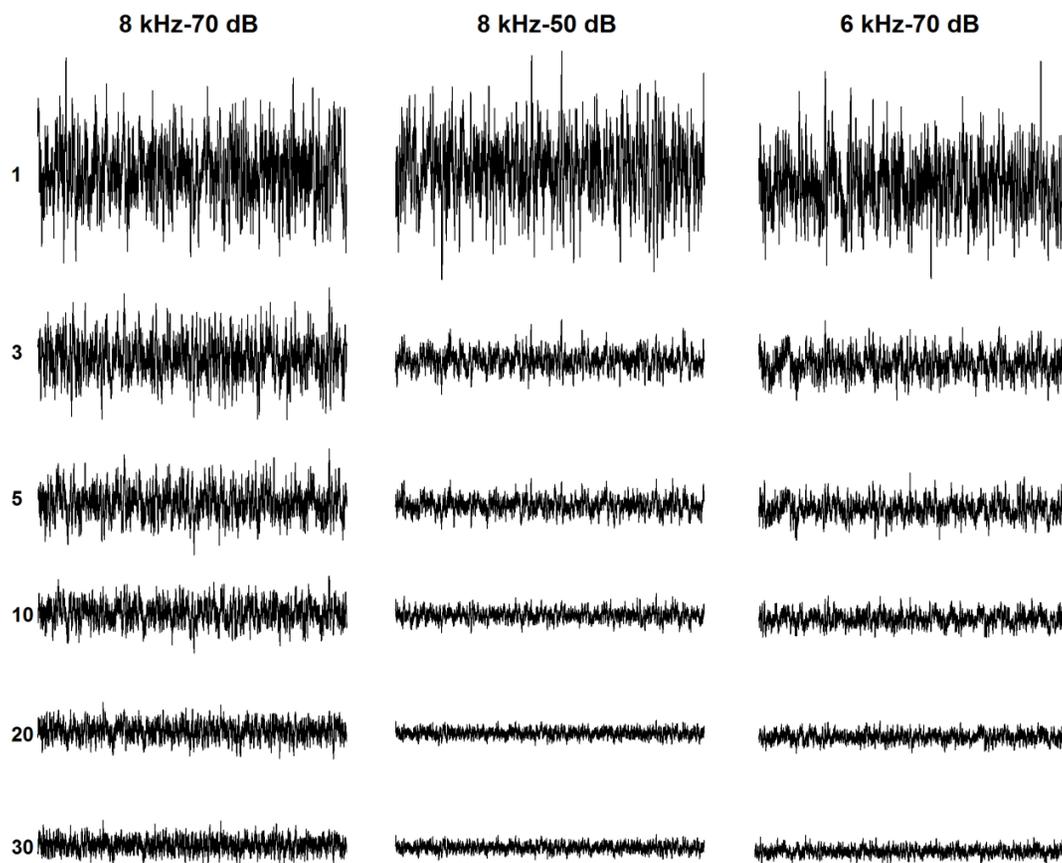


Figura 11: Oscilogramas de segmentos independientes de potencial obtenidos durante el registro de PEAEE de ratas adultas. En la parte superior de cada panel, se señalan la intensidad y frecuencia de los estímulos que generaron la respuesta. En el extremo izquierdo, se señala el número del segmento representado.

La figura 11 muestra oscilogramas representativos de las variaciones de potencial correspondientes a diferentes segmentos independientes de registro, a partir de los cuales se obtiene el PEAE. A diferencia de los oscilogramas representados en la figura análoga, en este caso las variaciones de potencial de un determinado segmento son independientes del comportamiento de la señal en el resto de los segmentos.

Como puede apreciarse, las amplitudes de las variaciones de potencial dependieron del número del segmento. En todos los casos, la máxima variación de potencial fue obtenida en el primer segmento de registro, disminuyendo posteriormente hasta alcanzar valores relativamente estables.

Para estímulos con diferente intensidad, la caída de la respuesta fue evidente desde el primer hasta el tercer o cuarto segmento, lo que se corresponde con los primeros 25-40 s de registro (figura 12). A partir de este momento, la amplitud de la respuesta se mantuvo oscilando alrededor de un valor estable. Similar comportamiento se presentó al analizar la frecuencia portadora (figura 13).

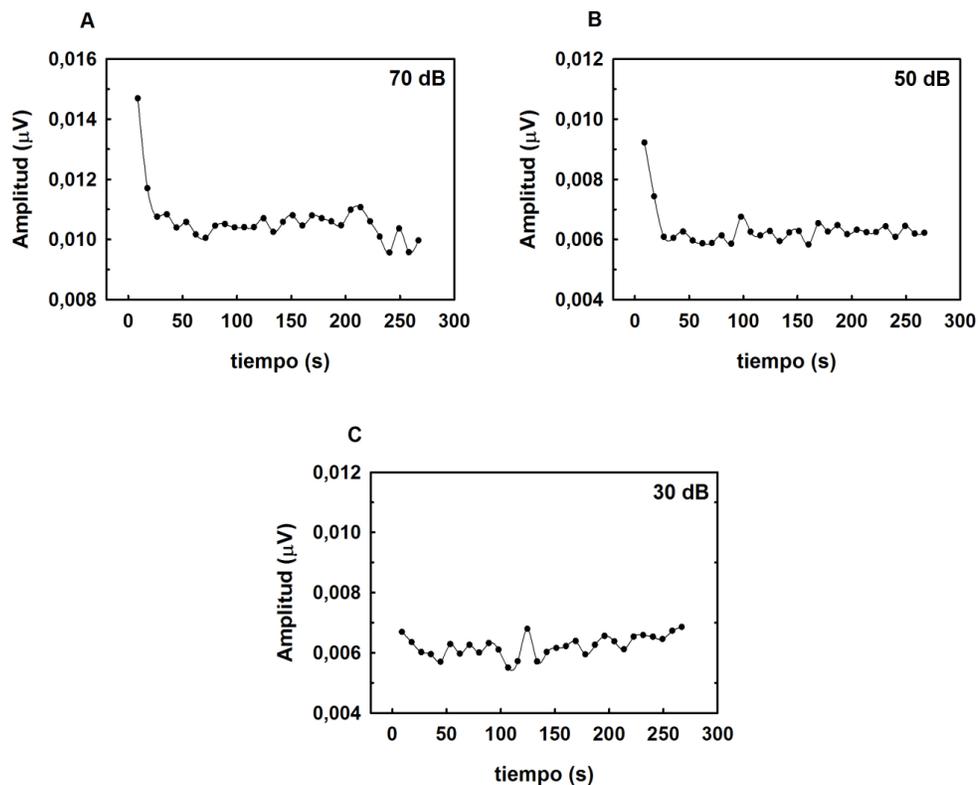


Figura 12: Curso temporal de la amplitud de segmentos individuales del PEAE de ratas adultas generados por tonos de diferentes intensidades. A)- Variaciones temporales de amplitud cuando la intensidad del estímulo fue 70 dB SPL. B)- Curso temporal cuando la intensidad del estímulo fue 50 dB SPL. C)- Curso temporal a 30 dB SPL. En todos los casos, la frecuencia portadora fue de 8 kHz. Los valores mostrados representan la media de uno de los animales estudiados, calculada a partir de la promediación de los 30 registros obtenidos.

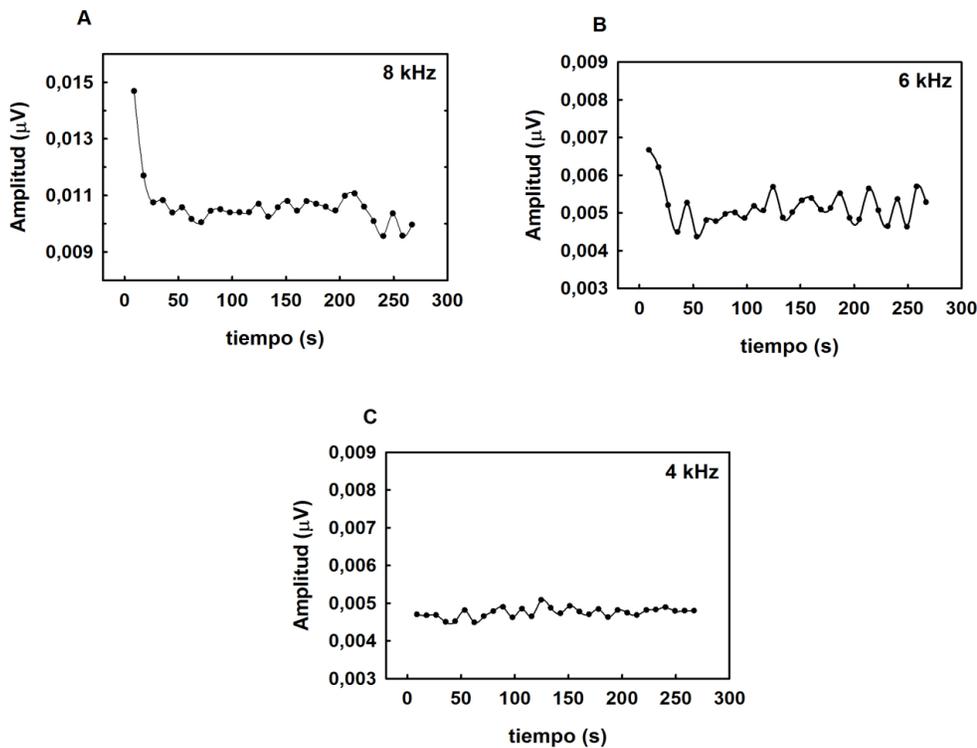


Figura 13: Curso temporal de la amplitud de segmentos individuales del PEAE de ratas adultas generados por estímulos de diferentes frecuencias portadoras. A)- Variaciones temporales de amplitud cuando la frecuencia portadora fue de 8 kHz. B)- Curso temporal cuando frecuencia intrínseca fue de 6 kHz. C)- Curso temporal para tonos de 4 kHz. En todos los casos, la intensidad de estimulación fue 70 dB SPL. Los valores mostrados representan la media de uno de los animales estudiados, calculada a partir de la promediación de los 30 registros obtenidos.

Al igual que las respuestas promediadas, la caída de amplitud del potencial evocado dependió de la intensidad y la frecuencia de estimulación al analizar los segmentos independientes (figura 14) ($F=46.4$, $p<0.0001$ para el efecto de la intensidad del estímulo y $F=9.5$, $p<0.05$ para el efecto de la frecuencia portadora).

La magnitud de la disminución de la amplitud fue mayor cuando la intensidad de estimulación aumentó de 30 a 70 dB SPL, manteniéndose constante entre 50 y 70 dB. De igual manera, la caída de la respuesta provocada por estímulos de 6 kHz fue mayor que la generada por tonos de 4 kHz, y estadísticamente similar a la inducida por tonos de 8 kHz.

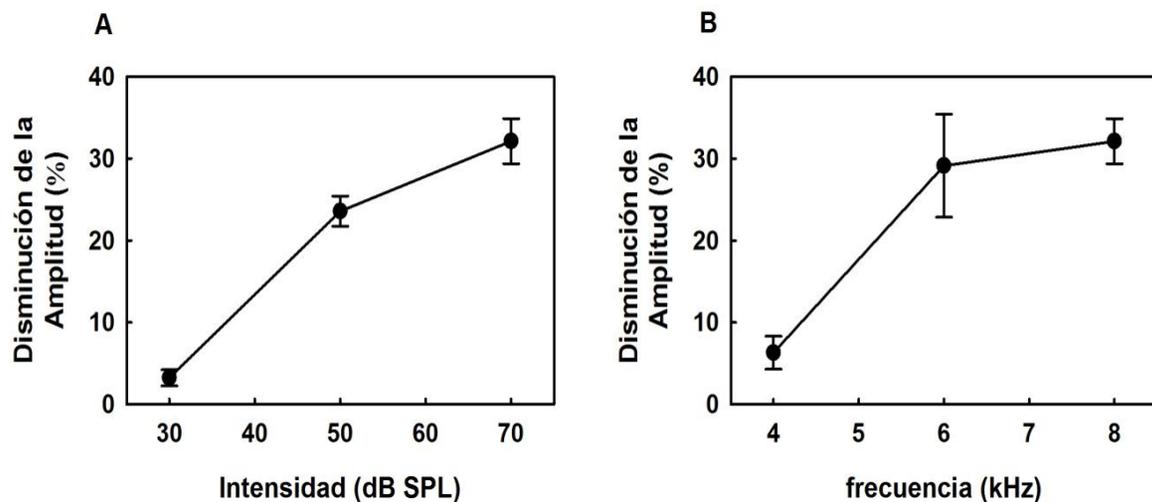


Figura 14: Porcentaje de disminución de la amplitud del PEAEE producido entre segmentos independientes del registro. A)- Efecto de la intensidad del estímulo sobre la disminución de la respuesta. B)- Efecto de la frecuencia portadora. Cada punto representa la media y el error estándar de la media obtenida a partir de 8 individuos. A su vez, la amplitud de la respuesta de cada individuo fue calculada a partir de los valores promedio obtenidos en cada uno de los registros realizados ($n=30$).

Finalmente, se analizó la relación entre la magnitud de la disminución de la respuesta obtenida durante el proceso de promediación y la magnitud de esta disminución al comparar los segmentos de potencial obtenidos de manera independiente (sin promediación).

Para ello, se realizó una correlación de Pearson, utilizando los valores obtenidos en cada individuo para cada intensidad y frecuencia de estimulación. Esta dio como resultado una correlación estadísticamente significativa entre ambos parámetros ($F=230.11$, $p<0.0001$) con un coeficiente de correlación (R) de 0.92 (figura 15).

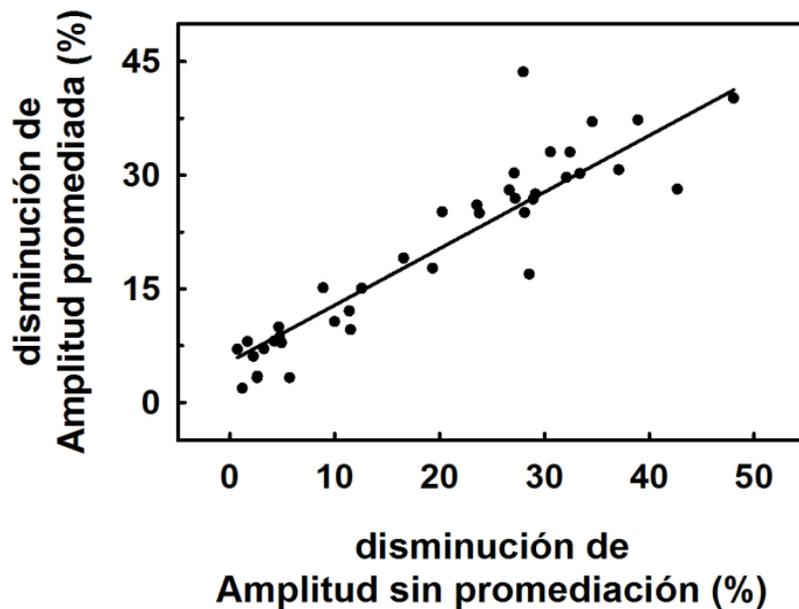


Figura 15: Relación entre la magnitud de la caída en el curso temporal del PEAE obtenida durante el proceso de promediación y la presentada al analizar los segmentos individuales. Se muestra, además, la recta teórica de regresión ($R^2=0.86$).

DISCUSIÓN

Los PEAAE constituyen en la actualidad una herramienta clínica importante para el diagnóstico de enfermedades del sistema auditivo. De ahí el gran número de trabajos científicos enfocados hacia la obtención de estímulos más eficaces para la generación de la respuesta, así como de las bases fisiológicas que la sustentan. Este tipo de respuesta, además, ha sido caracterizada en diferentes especies de animales (Rance *et al.*, 2006).

El presente trabajo, utilizando ratas como modelo experimental, analiza el curso temporal del PEAAE. Específicamente, muestra resultados que denotan cómo la disminución de la amplitud producida durante la obtención de este tipo de respuesta tiene un sustrato neuronal, a la vez que no es solo consecuencia del proceso de eliminación de ruido durante la promediación.

Igualmente, demuestra el efecto de la intensidad y de la frecuencia portadora de estímulos acústicos sobre la amplitud del potencial evocado y sobre la magnitud de la caída de su respuesta en el tiempo.

El principal objetivo de este capítulo es discutir los principales hallazgos reportados en el documento. Para ello, sin embargo, es necesario analizar previamente algunos de los aspectos metodológicos del estudio, relacionados principalmente con los estímulos acústicos empleados.

4.1)- Consideraciones metodológicas.

Como fue planteado en los acápites antes dedicados a los materiales y métodos, en el presente trabajo se utilizaron estímulos de amplitud modulada, donde la profundidad de modulación fue del 100 %. Esto significa que, en cada modulación de amplitud, la intensidad del estímulo variaba desde su valor máximo a 0 dB.

Esta magnitud de profundidad de modulación ha sido la utilizada por otros autores al investigar el efecto de la frecuencia portadora sobre la amplitud del PEAAE en humanos (Artieda *et al.*, 2004; Purcell *et al.*, 2004), así como en

estudios sobre otros parámetros de estimulación realizados en especies animales (Perez-Alcazar *et al.*, 2008).

Otras profundidades cercanas (95 %) se han empleado, igualmente, para analizar la maduración de este tipo de respuesta en humanos (Savio *et al.*, 2001), y también en el estudio de diferentes tipos de sordera en ratones (Pauli-Magnus *et al.*, 2007).

Por otra parte, intensidades supra-umbrales comparables a las empleadas en el presente trabajo (76.50 dB SPL) han sido utilizadas para caracterizar el PEAE en humanos (Picton *et al.*, 1987) y para evaluar la maduración de este tipo de respuesta; por ejemplo, a 70 dB nHL (Savio *et al.*, 2001), o a 75 dB SPL (Sussman *et al.*, 2008).

Adicionalmente, estímulos de 80 y 90 dB SPL han sido empleados para describir las diferentes propiedades de este potencial evocado en diferentes especies de roedores (Pauli-Magnus *et al.*, 2007; Perez-Alcazar *et al.*, 2008).

Ha sido ampliamente demostrado que incrementar la profundidad de modulación y la intensidad del estímulo en la generación de un potencial evocado da un resultado más robusto.

Por lo tanto, la utilización de este tipo de estímulo es de gran utilidad cuando el objetivo del estudio es la caracterización de la respuesta auditiva basándose en la investigación acerca de la influencia que sobre ella tienen diferentes parámetros de estimulación.

Sin embargo, es necesario destacar que la magnitud de los fenómenos descritos en este documento pudiese variar para diferentes combinaciones de profundidad de modulación-intensidad, lo cual sugiere la necesidad de continuar con investigaciones exhaustivas al respecto.

Finalmente, las frecuencias intrínsecas de estimulación utilizadas para generar los PEAE (4, 6 y 8 kHz) pueden considerarse de baja frecuencia en el espectro de audición de la especie, por lo cual estudiar el curso temporal de este potencial evocado a frecuencias portadoras mayores es un paso ineludible con vistas a generalizar los resultados que aquí se muestran.

Aún así, puede considerarse como notablemente válido el empleo de las frecuencias portadoras antes mencionadas, lo cual puede asumirse a través de varios estudios previos realizados en esta especie (Perez-Alcazar *et al.*, 2008), así como también en otros roedores (Kuwada *et al.*, 2002).

4.2)- Efecto de la frecuencia portadora y la intensidad del estímulo sobre la amplitud de la respuesta auditiva.

El presente trabajo demuestra que la amplitud de los PEAE en ratas adultas depende de la frecuencia portadora y la intensidad del estímulo. Es decir, que el incremento de dichos parámetros de estimulación provoca un aumento en la amplitud de la respuesta auditiva.

Resultados similares han sido descritos en humanos por varios grupos de investigación (Lins *et al.*, 1995; Picton *et al.*, 2003). Además, han sido también encontrados en otras especies de animales (Dolphin *et al.*, 1994; Makela *et al.*, 1990; Ottaviani *et al.*, 1990; Snyder y Schreiner, 1987) y primates no humanos (Burton *et al.*, 1992).

Tales estudios demuestran que, a medida que se aumenta la intensidad de estimulación, se produce un aumento de la amplitud de la respuesta hasta llegar a la saturación; en esencia, hasta intensidades en las cuales la amplitud del PEAE se mantiene constante, aún cuando se aumente la magnitud del estímulo.

Por otra parte, queda demostrado que la amplitud del potencial evocado varía en dependencia de la sensibilidad espectral, de manera que estímulos de una misma intensidad generan respuestas de mayor amplitud en las frecuencias portadoras a las que el individuo es más sensible.

Estos fenómenos tienen su base en las características fisiológicas del sistema auditivo. Los PEA están mucho más relacionados con el curso temporal de los potenciales post-sinápticos generados en las neuronas involucradas en la respuesta que con el número de potenciales de acción que igualmente tienen lugar en ellas.

Por lo tanto, las variaciones de amplitud en el potencial evocado no dependen de la actividad de potenciales de acción intrínseca a las neuronas que responden a la estimulación, sino que reflejan el número de las mismas, además de la sincronía de su respuesta. En consecuencia, el aumento de la amplitud supone el incremento del número de neuronas que responden de forma sincrónica al estímulo.

Específicamente para la intensidad de estimulación, este incremento pudiese estar dado por el proceso de reclutamiento neuronal, el cual puede definirse como aquel fenómeno electrofisiológico a través del cual se van incorporando continuamente neuronas menos sensibles a la estimulación presentada.

Estas se hallaban hasta el momento inactivas, pudiendo activarse mediante una estímulo repetitivo, pasando a formar parte de la respuesta ante este último (Kandel *et al.*, 2000; Cardinali, 2007).

4.3)- Curso temporal de la amplitud del PEAE durante la obtención de un registro.

Como resultado del estudio llevado a cabo, se pudo observar que la amplitud del PEAE disminuyó de manera continua durante las primeras promediaciones del registro, hasta alcanzar valores estables en un tiempo determinado. Esta disminución dependió de la intensidad y la frecuencia portadora del estímulo acústico.

Según la experiencia desarrollada en el proceso integral de la investigación, pudo constatar que no existen trabajos realizados en animales de experimentación con los cuales comparar los resultados que aquí se presentan.

Pese a que los supuestos para la obtención de potenciales evocados fueron enunciados desde mediados en la década del 70 (Glaser y Ruchkin, 1976), sólo existe, en toda la literatura relacionada, un reporte que describe cuantitativamente las variaciones temporales del PEAE durante su proceso de obtención, incluyendo las posibles causas de estas variaciones (Torres-Fortuny *et al.*, 2010).

Sus autores, estudiando los PEAAE de humanos ante estímulos de diferentes frecuencias, concluyeron que la amplitud de la respuesta varió significativamente durante las primeras promediaciones, hasta alcanzar una meseta relativamente estable a partir del segmento 25 de registro.

Observaron, además, que el ruido asociado al registro decreció, siguiendo una relación cuadrática inversa al número de promediaciones ($1/\sqrt{N}$), y alcanzando valores estables muy cercanos a cero después de promediar 30 segmentos.

Sin embargo, la diferencia existente entre los resultados presentados por Torres-Fortuny y colaboradores (2010) y los reportados aquí acerca del número de promediación al cual la amplitud del PEAAE se estabiliza, pudieran originarse en las diferencias entre especies estudiadas. De esta manera, en humanos se necesitaría una mayor cantidad de promediaciones para que la respuesta de estado estable alcance la meseta en su curso temporal.

Según lo planteado por estos autores, la disminución de la amplitud durante la promediación de un registro se debe a la disminución del ruido, ya sea artefactual o fisiológico. O sea, que, durante la promediación, la amplitud de las oscilaciones de la actividad neuronal producidas por el estímulo se mantiene constante en el tiempo.

En las primeras promediaciones, los valores de amplitud registrados se deben a esta actividad neuronal, y también al ruido asociado al registro. Considerando el ruido como aleatorio, la promediación cancela la gran mayoría de las variaciones de potencial asociadas a él, quedando finalmente la respuesta electrofisiológica como otro componente de la señal registrada.

Esta tesis concuerda con los supuestos planteados por Glaser y Ruchkin (1976) para el registro de potenciales evocados, al suponer que la señal electrofisiológica es estacionaria.

El presente trabajo no tuvo como finalidad analizar la estacionalidad del PEAAE desde el punto de vista matemático, pues, dada la especificidad del tema y su complejidad, este punto no fue incluido en toda su magnitud; si bien a partir de los resultados obtenidos su análisis se muestra necesario.

Los experimentos expuestos fueron diseñados bajo la idea intuitiva de que, bajo el supuesto de estacionalidad del PEAE, la amplitud de la respuesta no debía variar considerablemente en el tiempo. Por esta razón, precisamente, se decidió estudiar las variaciones de potencial de los segmentos independientes de registro.

4.4)- Amplitud de la respuesta del PEAE en segmentos no promediados.

El presente trabajo demuestra que la caída en la amplitud de la respuesta observada para los segmentos no promediados de los registros es producida, además de los procesos de ruido, por la existencia de procesos fisiológicos que tienen lugar a nivel neuronal durante la obtención de los PEAE en ratas adultas.

Lo anterior se expresa en el hecho de que, al aumentar los parámetros de estimulación (intensidad y frecuencia portadora), se obtiene una mayor caída de la amplitud de la respuesta hasta alcanzar un valor constante, que en cada caso es mayor tanto como lo sean, igualmente, los parámetros de estimulación.

Estos resultados no concuerdan con ningún otro reportado en la bibliografía especializada, sino que más bien entran en contradicción con lo que tradicionalmente ha sido descrito en esta.

Dichos trabajos plantean que los PEAE tienen como característica fundamental su estabilidad en la respuesta a través del tiempo, sin que varíe la amplitud, por lo que la disminución de esta última, en todos los casos, es resultado del ruido.

En el presente estudio se han obtenido resultados muy interesantes al respecto, ya que, cuando se promedian los segmentos individuales (cancelándose así los procesos provocados por ruido) la caída de la amplitud se mantiene, de manera que se confirma la hipótesis inicial.

Tal comportamiento neuronal pudiera explicarse por el fenómeno descrito como *habitación o adaptación neuronal*, tratándose de un mecanismo que se activa para evitar el “despilfarro” energético.

En efecto, cuando los receptores del sistema auditivo se enfrentan a estímulos repetitivos, invariablemente dejan de responder; de modo que, con el aumento de la intensidad y la frecuencia portadora en un estímulo repetitivo, se puede encontrar una respuesta donde, al inicio, habrá un mayor número de neuronas respondiendo, que sin embargo disminuirá en la medida que avance el tiempo (Cardinali, 2007).

Puede afirmarse, de manera general, que dicho fenómeno aparece provocado por las características del estímulo que aquí se presenta. Indudablemente, la adaptación neuronal, junto al estímulo continuo, provoca efectos que tienen consecuencias a nivel fisiológico a la hora de obtener el PEAE.

No en vano, cuando se presenta un estímulo repetitivo, se produce una pérdida en la eficacia sináptica, lo cual es provocado por una disminución paulatina de la cantidad de neurotransmisor en la neurona presináptica, con la consiguiente disminución de la respuesta postsináptica.

Ello, a su vez, es causado por el decrecimiento notable del número de canales de calcio, que, sin dudas, resultan fundamentales para su liberación (s./a., 2011).

CONCLUSIONES

1. El aumento en la intensidad de estímulos acústicos modulados en amplitud y la frecuencia portadora del estímulo sobre el PEAAE en ratas adultas, produce un aumento en la amplitud de la respuesta cuando se estimula con una intensidad entre 30 y 70 dB SPL y una frecuencia portadora de 4 y 6 kHz.
2. La disminución de la amplitud que se produce durante el proceso de obtención de los PEAAE en ratas adultas, depende de la intensidad y la frecuencia portadora del estímulo, ya que esta caída es mayor en la medida que se incrementaron los valores en los parámetros de estimulación.
3. La disminución de la amplitud de la respuesta que se observa durante la obtención de los PEAAE en ratas adultas, es provocado, además de los mecanismos de cancelación del ruido, por procesos fisiológicos que ocurren a nivel neuronal.

RECOMENDACIONES

1. Estudiar el efecto de la intensidad y de la frecuencia portadora del estímulo sobre la amplitud de la respuesta en los Potenciales Evocados Auditivos de Tallo Cerebral (PEATC) en ratas adultas.
2. Estudiar el curso temporal del PEAE E en ratas adultas bajo estímulos con mayores frecuencias portadoras.
3. Estudiar el curso temporal del PEAE E en ratas adultas a diferentes profundidades de modulación.
4. Estudiar el curso temporal de los PEAE E en ratas con diferentes edades durante el proceso de maduración del sistema auditivo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARTIEDA, J., M. VALENCIA, M. ALEGRE, O. OLAZIREGI, E. URRESTARAZU Y J. IRIARTE (2004): Potentials evoked by chirp-modulated tones: a new technique to evaluate oscillatory activity in the auditory pathway. **Clinical Neurophysiology**. (115): 699–709.
- BERNARD, P. A. Y H. SPOENDLIN (1973): Unmyelinated fibers in the cochlea. **JFORL J Fr Otorhinolaryngol Audiophonol Chir Maxillofac**. 22 (1): 39-42.
- BURTON, M. J., L. T. COHEN, F. W. RICKARDS, K. I. McNALLY Y G. M. CLARK (1992): Steady-state evoked potentials to amplitude modulated tones in the monkey. **Acta Oto-laryngol**. (112): 745–751.
- CAÑETE, OSCAR (2006): Desorden del procesamiento auditivo central (DPAC). **Rev Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello**. 2006 (66): 263-273.
- CAMPBELL, F. W., J. ATKINSON, M. R. FRNACIS Y D. M. GREEN (1977): Estimation of auditory threshold using evoked potentials. **A clinical screening test. Prog Clin Neurophysiol**. (2): 68-78.
- CARDINALI, DANIEL P. (2007): **Neurociencia aplicada: sus fundamentos**. Edición Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 80-84.
- COUTIN CHURCHMAN, PEDRO (2002): **Potenciales evocados: fundamentos y aplicaciones clínicas**. Tesis Doctoral. Instituto de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de La Habana, Cuba, pp. 21-67.
- COUTIN CHURCHMAN, PEDRO (1989): **Sensibilidad y especificidad de los potenciales evocados auditivos de tallo cerebral en el diagnóstico de las enfermedades neurológicas**. Tesis de Candidatura. Instituto de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de La Habana, Cuba, pp. 22-40.
- DIMITRIJEVIC, A., M. S. JOHN Y T. W. PICTON (2004): Auditory steady-state response and word recognition scores in normal-hearing and impairment adults. **Ear Hear**. (25): 68-84.
- DOLPHIN, W. F., M. E. CHERTOFF Y R. BURKARD (1994): Comparison of the envelope following response in the Mongolian gerbil using two-tone and sinusoidally amplitude-modulated tones. **J Acoust Soc Am**. (96): 2225–2234.

- DOLPHIN, W. F. (1997): The envelope following response to multiple tone pair stimuli. **Hearing Research**. (110): 1-14.
- ENGSTROM K. H. Y H. W. ADES (1967): Die Morphologie des ganglion spirale Cochleae. **Acta Otolaryngol (Stockh)**. 1967 (226): 1-78.
- GENIEC P., D. K. MOREST (1971): The neuronal architecture of the human posterior colliculus: A study with the Golgi method. **Acta Otolaryngol**. [Suppl]: 112-121.
- GEISLER, C. D. (1960): **Averages responses to clicks in man records by scalp electrodes**. Technical Reports. MIT Research Laboratories of Electronics, Cambridge, Estados Unidos, pp. 211-380.
- GLASER, E. M. Y D. S. RUCHKIN (1976): **Principles of Neurobiological Signal Analysis**. Academic Press, New York, pp. 22-44.
- GUYTON, ARTHUR C. Y JOHN E. HALL (2001): **Tratado de Fisiología Médica**. McGraw-Hill Interamericana Editores S. A., México D. F., México (décima edición), pp. 729-740.
- HEIMER L. (1995): **The human Brain and Spinal Cord**. Springer- Verlag, Nueva York, Estados Unidos (segunda edición), pp. 301-312.
- HERDMAN, A. T. Y D. R. STAPPELLS (2003): Auditory steady-state response thresholds of adults with sensorineural hearing impairments. **International Journal of Audiology**. (42): 237-248.
- JOHN, S., J. DIMITRIJEVIC Y T. W. PICTON (2002): Auditory Steady-State Responses to exponential modulation envelopes. **Ear Hear**. (23): 106-117.
- JOHN, S., J. DIMITRIJEVIC, P. VAN ROON Y T. W. PICTON (2001): Multiple auditory steady-state response to AM and FM stimuli. **Audiol Neurootol**. (6): 12-27.
- KANDELL, E. R., J. H. SCHWARTZ Y T. M. JESSELL (2000): **Principles of Neural Science**. McGraw-Hill Press, Princenton, Estados Unidos, pp. 590-614.
- KIANG, N. Y. S., J. M. RHO Y C. C. NORTHROP (1982): Hair cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. **Science**. (271): 175-177.
- KUWADA, S., J. S. ANDERSON, R. BATRA, D. C. FITZPATRICK, N. TEISSIER Y W. R. D'ANGELO (2002): Sources of the scalp-recorded amplitude-modulation following response. **J Am Acad Audiol**. (13): 188-204.

- LINS, O. G., T. W. PICTON, B. L. BOUCHER, A. DURIEUX-SMITH, S. C. CHAMPAGNE, L. M. MORAN, M. C. PÉREZ-ABALO, V. MARTIN Y G. SAVIO (1996): Frequency-specific audiometry using steady-state response. **Ear Hear.** (17): 81-96.
- LINS, O. G., P. E. PICTON, T. W. PICTON, S. C. CHAMPAGNE Y A. DURIEUX-SMITH (1995): Auditory steady-state responses to tones amplitude-modulated at 80 to 110 Hz. **J. Acoust. Soc. Am.** (97): 3051-3063.
- LORENTE DE NÓ, R. (1981): **The Primary Acoustic Nuclei.** Raven Press Kellerhals, Nueva York, Estados Unidos, 440 pp.
- MAISTE, A. Y T. W. PICTON (1989): Human auditory evoked potentials to frequency modulated tones. **Ear Hear.** (10): 153-160.
- MAKELA, J. P., G. KARMOS, M. MOLNAR, V. CSEPE E I. INKLER (1990): Steady-state responses from the cat auditory cortex. **Hear Res.** (45): 41–50.
- NADOL, J. B. (1997): Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: Implications for cochlear implantation. **Otolaryngol Head Neck Surg.** (117): 220-228.
- NOBILI, R., F. MAMMANO Y J. ASHMORE (1998): How well do we understand the cochlea? **Trends Neurosci.** 21 (4): 159-67.
- OTTAVIANI, F., G. PALUDETTI, S. GRASSI, F. DRAICCHIO, R. M. SANTARELLI, G. SERAFINI Y V. I. PETTOROSSO (1990): Auditory steady-state responses in the rabbit. **Audiology.** (29): 212–218.
- PAULI-MAGNUS, D., G. HOCH, N. STRENZKE, S. ANDERSON, T. J. JENTSCH Y T. MOSER (2007): Detection and differentiation of sensorineural hearing loss in mice using auditory steady-state responses and transient auditory brainstem responses. **Neuroscience.** (149): 673–684.
- PÉREZ-ABALO, M. C., A. FORTUNY TORRES, G. SAVIO LÓPEZ Y E. SUAREZ EIMIL (2003) (active February 2011). Los potenciales auditivos de estado estable a múltiples frecuencias y su valor en la evaluación objetiva de la audición. Revista Electrónica de Audiología, Vol. II. Centro de Neurociencias de Cuba, Ciudad de la Habana. Cuba. <http://www.auditio.com>.
- PÉREZ-ABALO, M. C., G. SAVIO, A. TORRES, V. MARTÍN, E. RODRÍGUEZ Y L. GALÁN (2001): Steady state responses to multiple amplitude-modulated tones: an

- optimized method to test frequency-specific thresholds in hearing-impaired children and normal-hearing subjects. **Ear Hear.** 22 (3): 200-211.
- PÉREZ-ALCAZAR, M., M. J. NICOLAS, M. VALENCIA, M. ALEGRE, J. Y J. IRIARTE (2008): Chirp-evoked potentials in the awake and anesthetized rat. A procedure to assess changes in cortical oscillatory activity. **Exp Neurol.** (210): 144-153.
- PICTON, T. W., A. DIMITRIJEVIC, M. C. PÉREZ-ABALO, Y P. VON ROON (2004): Estimating audiometric thresholds using auditory steady-state response. **J. Amer. Acad. Audiol.** (130): 44-53.
- PICTON, T. W., M. S. JOHN, A. DIMITRIJEVIC Y D. PURCELL (2003): Human auditory steady-state responses. **Int. J. Audiol.** (42): 177-219.
- PICTON, T. W., C. R. SKINNER, S. C. CHAMPAGNE, A. J. C. KELLETT Y A. C. MAISTE (1987): Potentials evoked by the sinusoidal modulation of the amplitude or frequency of a tone. **J Acoust Soc Am.** 82 (1): 165-178.
- PICTON T. W., S. A. HILLYARD, H. I. KRAUSZ Y R. GALAMBOS (1974): Human Auditory evoked potentials I. Evaluation of components. **Electroenceph. clin. Neurophysiol.** (36): 179-190.
- PRADO GUTIÉRREZ, PAVEL (2005): **Efecto de la duración de las fases y del tiempo entre fases de estímulos eléctricos intracocleares sobre la respuesta auditiva de curieles sordos (PEATC-e y PAC-e).** Tesis de Maestría. Centro de Neurociencias de Cuba, Ciudad de la Habana, Cuba, pp. 4-40.
- PURCELL, D. W., S. M. JOHN, B. A. SCHNEIDER Y T. W. PICTON (2004): Human temporal auditory acuity as assessed by envelope following responses. **J Acoust Soc Am.** 116 (6): 3581-3593.
- Rance, G. y D. Tomlin (2006): Maturation of auditory steady-state responses in normal babies. **Ear & Hearing.** (2): 20-29.
- REGAN, D. (1989): Human brain electrophysiology: Evoked potentials and evoked magnetic fields. **Science and medicine.** (22): 44-74.
- RICKARDS, F. W., L. E. TAN, O. J. WILSON, J. H. DREW Y G. M. CLARK (1994): Auditory steady-state evoked potential in newborns. **British Journal of Audiology.** (28): 327-337.

- ROSOWSKI, J. J., L. H. CARNEY, T. J. LYNCH Y W. T. PEAKE (1986): The effectiveness of external and middle ears in coupling acoustic power into the cochlea. En: J. B. Allen, J. L. Hall, A. Hubbard, S. T. Neely, y A. Tubis (eds.), **Peripheral Auditory Mechanisms**. pp. 3-12. Springer, Berlin, Alemania.
- (S./a.) (2011) (Active April 2011). Mecanismos neuronales en los niveles molecular y celular. <http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/.../CapituloMuestra.pdf>.
- SAVIO, G., J. CARDENAS, M. PEREZ-ABALO, A. GONZALEZ Y J. VALDES (2001): The low and high frequency auditory steady-state responses mature at different rates. **Audiol Neuro-otol**. (6): 279-287.
- SAVIO LÓPEZ, GUILLERMO (1997): Potenciales evocados auditivos de estado estable a múltiples frecuencias: Una nueva alternativa para evaluar la respuesta auditiva en forma objetiva. **Acta Otolaryngol**. 5 (2): 121-130.
- SMITH, C. A., O. H. LOWRY Y M. L. WI (1954): The electrolytes of the labyrinthine fluids. **Laryngoscope**. (64): 141-153.
- SNYDER, R. L. Y C. E. SCHREINER (1987): Auditory neurophonic responses to amplitude-modulated tones: Transfer functions and forward masking. **Hear Res**. (31): 79-91.
- SPOENDLIN, H. (1984): Primary neurons and synapses. En: I. Friedmann y J. Ballantyne (eds.), **Ultrastructural Atlas of the Inner Ear**. pp. 133-164. Butterworths, London, Gran Bretaña.
- SPOENDLIN, H. (1981): Differentiation of cochlear afferent neurons. **Acta Otolaryngol**. (91): 451-456.
- STAPPELLS, D. R., T. W. PICTON, M. C. PÉREZ ABALO, D. REED Y A. SMITH (1985): Frequency specificity in evoked potential audiometry. En: Jacobson, J.J. (ed.) **Auditory brainstem response audiometry**. pp. 44-62. College-Hill Press, San Diego, Estados Unidos.
- STÜRZEBECKER, E., M. CEBULLA Y U. PSCHIRRE (2001): Efficient stimuli for recording of the amplitude-modulation following response (AMFR). **Audiology**. (40): 63-68.

- SUSSMAN, E., M. STEINSCHNEIDER, V. GUMENYUK, J. GRUSHKO Y K. LAWSON (2008): The maturation of human evoked brain potentials to sounds presented at different stimulus rates. **Hearing Research**. (236): 61-79.
- TORRES-FORTUNY, A., M. C. PÉREZ-ABALO, R. C. SOTERO-DÍAZ, L. RIOJA-RODRÍGUEZ, E. RODRÍGUEZ-DÁVILA, L. GALÁN-GARCÍA Y E. EIMIL-SUAREZ (2011a): Criterio de parada de la promediación de la respuesta auditiva de estado estable. **Acta Otorrinolaringol Esp**. (183): 121-130.
- TORRES FORTUNY, A., M. PÉREZ-ABALO, R. SOTERO, L. RIOJA, E. RODRIGUEZ, L. GALAN Y E. EIMIL (2011b): Efficiency of averaging for estimating multiple auditory steady state responses. **International Journal of Audiology**. (220): 242-310.
- TORRES FORTUNY, A., M. PÉREZ-ABALO, R. SOTERO, L. RIOJA, E. RODRIGUEZ, L. GALAN Y E. EIMIL (2010): Statistical properties of the signal and the background noise in the multiple auditory steady state responses. **Ear and Hearing**. (182): 400-453.
- TORRES FORTUNY, ALEJANDRO (2004): **Desarrollo de los Potenciales Evocados Auditivos de estado estable como método objetivo para evaluar la audición residual**. Tesis Doctoral. Centro de Neurociencias de Cuba, Ciudad de La Habana, Cuba, pp. 21-67.