

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias e Ingenierías



“Estudio de la función auditiva en un modelo animal de enfermedad
neurodegenerativa desmielinizante.”

Tesis para obtener el grado académico de:
Licenciada en Ingeniería Biomédica

Presenta:

Mariana Escobedo Torres

Asesor:

Dr. Víctor Hugo Hernández González

Co-asesor:

Dr. Carlos Villaseñor Mora

León, Guanajuato

Marzo del 2019

Contenido

Resumen.....	4
I. Introducción y Objetivos	5
I.1. Introducción.....	5
I.2. Objetivo General.....	6
I.3. Objetivos específicos.....	6
II. Marco Teórico.....	7
II.1. Anatomía del oído.....	7
II.1.1. Oído externo.....	7
II.1.2. Oído medio.....	8
II.1.3. Oído interno.....	9
II.2. Fisiología del oído.....	13
II.2.1. Membrana basilar.....	15
II.2.2. Transducción mecanoeléctrica de las células ciliadas.....	18
II.2.3. Vía auditiva.....	19
II.2.4. Medición de la energía del sonido en el oído.....	20
II.3. Pruebas auxiliares de diagnóstico en audiolología.....	21
II.3.1. ABR.....	21
II.3.2. DPOAE.....	24
II.4. Mielina.....	29
II.4.1. Enfermedades desmielinizantes.....	30
II.4.2. Rata TAIEP.....	31
III. Desarrollo.....	33
III.1. Calibración.....	33
III.1.1. Calibración ABR.....	33
III.1.2. Calibración DPOAE.....	37
III.2. Pruebas experimentales en los modelos animales.....	41
III.2.1. ABR.....	41
III.2.2. DPOAE.....	50
IV. Resultados.....	53
IV.1. ABR.....	53
IV.2. DPOAEs.....	59
V. Discusión de resultados.....	61
VI. Conclusiones.....	63

Bibliografía..... 64

Resumen

En la presente tesis se realizó un análisis comparativo de la función auditiva entre un grupo de animales con una enfermedad hipodesmielinizante y sus controles sanos. Se realizaron dos pruebas de función auditiva, ABR (Auditory Brainstem Response, por sus siglas en inglés) y DPOAE (Distortion Product Otoacoustic Emissions). Mediante estas técnicas se analizaron las latencias, amplitudes y umbrales para las ABRs y las amplitudes de los DPOAEs. Para cada una de estas variables se realizaron pruebas estadísticas para determinar si existían o no, diferencias significativas entre la audición de ratas sanas y ratas enfermas (taiep).

Para las pruebas ABR, se encontraron diferencias significativas en las latencias de las ondas III y IV, siendo estas mayores en las ratas taiep. La amplitud de la onda II y el umbral de audición a una frecuencia de 16 kHz en las ratas taiep era menor que el de las sanas. Las diferencias de umbrales y de latencias de las ratas taiep se debe a que estas presentan una enfermedad que afecta su sistema nervioso central (SNC).

No se encontraron diferencias significativas en la prueba DPOAE entre las ratas sanas y enfermas, lo cual se explica debido a que las emisiones otoacústicas se generan en la región coclear y una enfermedad desmielinizante del SNC no necesariamente afectaría a la cóclea.

I. Introducción y Objetivos

I.1. Introducción

La audición es la capacidad para percibir sonidos; tiene la capacidad de convertir vibraciones sonoras con amplitudes muy pequeñas en señales eléctricas hasta 1000 veces más rápidamente que la velocidad con la cual los fotorreceptores responden a la luz (1). Entre los problemas de audición se encuentra la neuropatía auditiva, un desorden en la audición en donde el oído interno detecta el sonido, pero éste tiene problemas para mandar el sonido hacia el cerebro. Para detectar si existe una neuropatía o no, los audiólogos usan diferentes métodos para realizar el diagnóstico, entre los más usados se encuentran las pruebas de ABR (Respuesta Auditiva del Tallo Cerebral) y DPOAE (Producto de Distorsión de Emisiones Otoacústicas).

La interpretación del ABR, considera la amplitud de la onda, que indica el número de neuronas activadas; y la latencia de la onda, que indica la velocidad de la transmisión de la señal ante un estímulo (2). En ocasiones las amplitudes de las DPOAEs presentan una relación con los umbrales auditivos. Por lo general, las amplitudes de las DPOAEs de oídos que presentan pérdida de audición son más pequeñas que las DPOAEs registradas de oídos con umbrales normales (3).

Dado que el proceso de hipo-desmielinización puede afectar la transmisión nerviosa hacia el cerebro, nuestra hipótesis es que este tipo de procesos neurodegenerativos modifican la función auditiva en las vías centrales. Con base en esto, en este trabajo se analizó la audición de ratas con una enfermedad neurodegenerativa de tipo hipo-desmielinizante a través de las pruebas audiológicas ABR y DPOAE. Esto se llevó a cabo a través de una interfaz del software Labview y el instrumental PXle 1073 de National Instruments (NI).

Los datos adquiridos en las diferentes pruebas se analizaron en Matlab, para facilitar el procesamiento de señales. Las señales adquiridas fueron filtradas, procesadas, analizadas en el dominio de frecuencias (para el caso de las DPOAEs) y graficadas para poder lograr una interpretación más fácil de los datos obtenidos. Posteriormente se analizaron latencias, amplitudes y umbrales de audición para

determinar si el proceso neurodegenerativo afecta la función auditiva. Nuestro análisis mostró que las ratas taiep presentan alteraciones en la vía auditiva que afecta en la recepción e interpretación de un estímulo. Las DPOAEs de las ratas taiep no se vieron afectadas.

I.2. Objetivo General

Evaluar la función auditiva en un modelo animal con una enfermedad neurodegenerativa desmielinizante.

I.3. Objetivos específicos

- Analizar los datos obtenidos de las audiometrías a través de programa de Matlab.
- Identificar las latencias, amplitudes y umbrales de las señales obtenidas de pruebas ABR-click; los umbrales de señales de las pruebas ABR-Tonos puros; y las amplitudes de las DPOAEs de cada uno de los 13 sujetos.
- Realizar pruebas estadísticas y determinar si existen o no diferencias significativas entre las ratas sanas y las enfermas; para cada una de las variables.

II. Marco Teórico

II.1. Anatomía del oído

El oído está conformado por el oído externo que es la primera entrada del sonido; el oído medio que contiene una serie de huesecillos que funcionan en conjunto para transmitir el sonido hacia el oído interno que es la parte fundamental para llevar a cabo la transducción del sonido. (Figura 1)

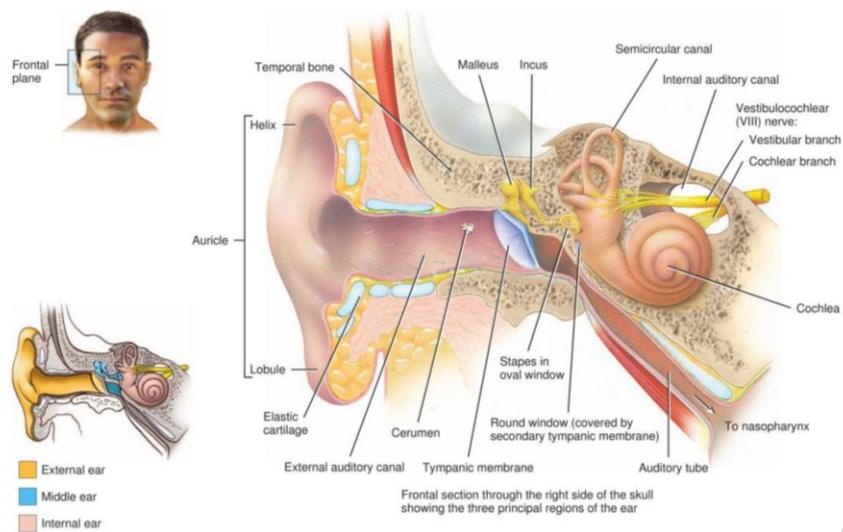


Figura 1 Partes estructurales del oído: oído externo, medio e interno (1).

II.1.1. Oído externo

El oído externo está conformado por el pabellón auricular, un conducto auditivo externo y el tímpano. El pabellón auricular está formado por cartílago flexible y cubierto por la piel. La parte superior del pabellón auricular se le llama hélix y la parte inferior se le llama lóbulo. El conducto auditivo externo es un conducto de aproximadamente 2.5 cm de largo que se encuentra en el hueso temporal y conecta del pabellón auricular hasta el tímpano. Cerca del orificio externo existen pelos y glándulas ceruminosas que secretan cerumen para evitar que entre polvo o agentes extraños (1).

El oído externo termina en la membrana timpánica, un diafragma delgado que mide aproximadamente 9 mm de diámetro (4). El tímpano es una membrana que separa al oído externo del medio. Está cubierto por epidermis y por epitelio plano simple.

Entre las capas anteriores hay tejido conectivo (colágeno, fibras elásticas y fibroblastos) (1).

II.1.2. Oído medio

Es una cavidad aérea, ubicada en el hueso temporal y cubierta por epitelio cúbico bajo. Se encuentra entre el oído externo y el interno. Aquí es donde se encuentran los huesecillos del oído (*Figura2*). Dichos huesos son:

- Martillo: El mango del martillo está unido a la parte interna de la membrana timpánica y la cabeza se articula con el yunque.
- Yunque: Se encuentra entre el martillo y el estribo.
- Estribo: La base del estribo encaja en la ventana oval. La ventana oval es un orificio en el tabique óseo que separa a el oído medio del interno y debajo de esta ventana también se encuentra la ventana redonda.

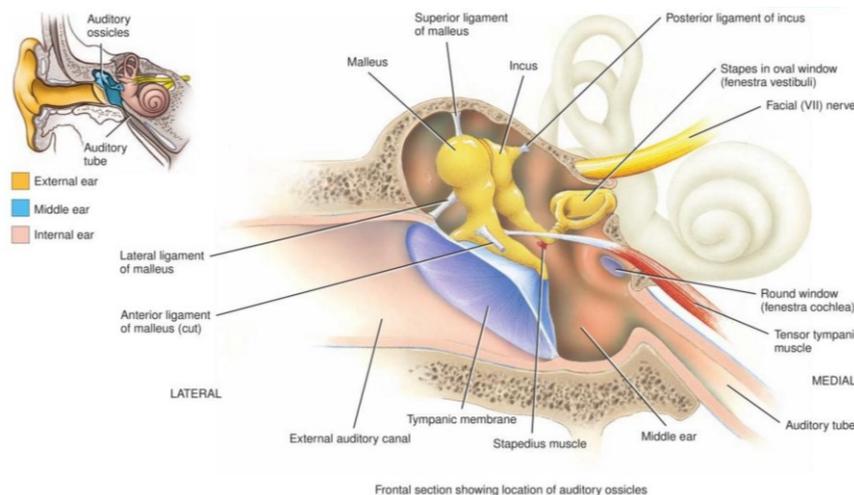


Figura 2. Huesecillos que conforman el oído medio junto con el músculo tensor timpánico y el estapedio (1).

Para el movimiento del oído medio también están involucrados el músculo tensor del tímpano que se encarga de limitar los movimientos y aumentar la tensión de la membrana timpánica para evitar daños en el oído interno ocasionados por ruidos muy fuertes y el músculo del estapedio, el más pequeño del cuerpo, se encarga de atenuar las fuertes vibraciones en el estribo ocasionada por ruidos intensos, para poder proteger la ventana oval y por consecuente el oído interno. Al mismo tiempo, disminuye la sensibilidad auditiva.

II.1.3. Oído interno

El oído interno se divide estructuralmente en dos partes:

- Laberinto externo óseo: Formado por cavidades del hueso temporal, revestido de periostio, recubre al laberinto membranoso y está dividido en tres áreas: conductos semicirculares, vestíbulo y la cóclea (*Figura 3*).
- Laberinto membranoso: Se encuentra cubierto por el laberinto externo óseo, inmerso en un líquido llamado perilinfa. Está compuesto por sacos y conductos que tienen la misma forma del laberinto óseo. Está revestido por epitelio derivado del ectodermo embrionario que invade al hueso temporal en desarrollo y por dentro tiene endolinfa.

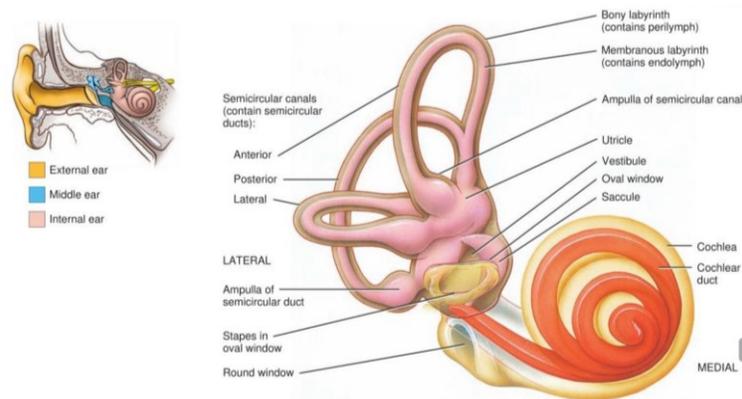


Figura 3. Las estructuras del oído interno (1).

Como ya se mencionó el oído interno tiene tres estructuras que resultan ser muy importantes para la audición: el vestíbulo, los conductos semicirculares y la cóclea.

II.1.3.1. Vestíbulo

El vestíbulo se encuentra en el centro del laberinto óseo y se proyectan tres conductos semicirculares. El laberinto membranoso en esta parte se divide en dos sacos: utrículo y el sáculo. Éstos dos últimos son los receptores del equilibrio y se encuentran conectados por un conducto. La pared del sáculo y el utrículo tienen una región engrosada llamada mácula. Las dos máculas que son perpendiculares entre sí (una del sáculo y otra del utrículo correspondientemente) sirven como receptores del equilibrio estático, nos dice la información de la posición de la cabeza en el espacio y son esenciales para mantener la postura y el equilibrio. También ayudan

a detectar la aceleración lineal y la desaceleración. Las máculas tienen dos tipos de células: las ciliadas que tienen esterocilios en la parte superior y las de sostén que se encuentran rodeando a las ciliadas. Sobre las células ciliadas descansa una membrana otolítica, una capa glucoproteica conformada por densos cristales de carbonato de calcio, llamados otolitos. Así que cada vez que se produce una inclinación la membrana otolítica es atraída por la gravedad e inclina a su vez los haces de cilias. Cuando los esterocilios se mueven hacia un lado éstas provocan que los canales de transducción se abran y ocurren potenciales despolarizantes; en cambio si se mueven para el otro lado, los canales se cierran y se hiperpolariza la membrana. Cuando esto ocurre se liberan neurotransmisores, provocando la sinapsis entre la célula ciliada con las neuronas sensitivas de primer orden en el ramo vestibular. Los cuerpos neuronales de tales neuronas sensitivas se encuentran en los ganglios vestibulares, para después formar parte del nervio vestibulococlear (VIII) (1).

II.1.3.2. Conductos semicirculares

Los conductos semicirculares son tres: el anterior o superior, el externo o posterior y el lateral; cada uno forma un ángulo recto con los otros dos. Cada conducto tiene una ampolla que es un ensanchamiento de los conductos semicirculares y también se conectan con el utrículo del vestíbulo. Ayudan a detectar la aceleración y la desaceleración. La parte más ancha de cada conducto se llama ampolla, que tiene una parte elevada que se llama cresta. Cada cresta tiene células ciliadas y de sostén; y encima de cada cresta se encuentra una masa de material gelatinoso llamada cúpula. Cuando una persona mueve la cabeza, las células ciliadas se mueven con ésta, provocando potenciales receptores, para formar impulsos nerviosos, que se transmiten al ramo vestibular y posteriormente al nervio VIII (1).

II.1.3.3. La cóclea

La cóclea es el conducto óseo en forma de espiral, que da aproximadamente tres vueltas alrededor de un núcleo óseo llamado columnela. Se divide en tres partes: el conducto coclear, la rampa vestibular y la rampa timpánica. El conducto coclear o escala media es una continuación del laberinto membranoso, está lleno de endolinfa y dentro se encuentra conformado por el órgano de Corti. La rampa vestibular

termina en la ventana oval y el conducto que está debajo es la rampa timpánica que termina en la ventana redonda. La rampa timpánica y la vestibular están llenas de perilinfa porque son la continuación del laberinto óseo y éstas están comunicadas en el helicotrema, donde la partición de la cóclea termina ligeramente debajo del ápex coclear (1,4). La parte ósea de la cóclea está conformada por capas alineadas de tejido conectivo, endostio y periostio (4) (*Figura 4*).

La membrana delgada de Reissner o membrana vestibular divide la escala media de la vestibular. La membrana basilar separa la escala media de la escala timpánica. Encima de la membrana basilar está el órgano de Corti u órgano espiral (1,4)

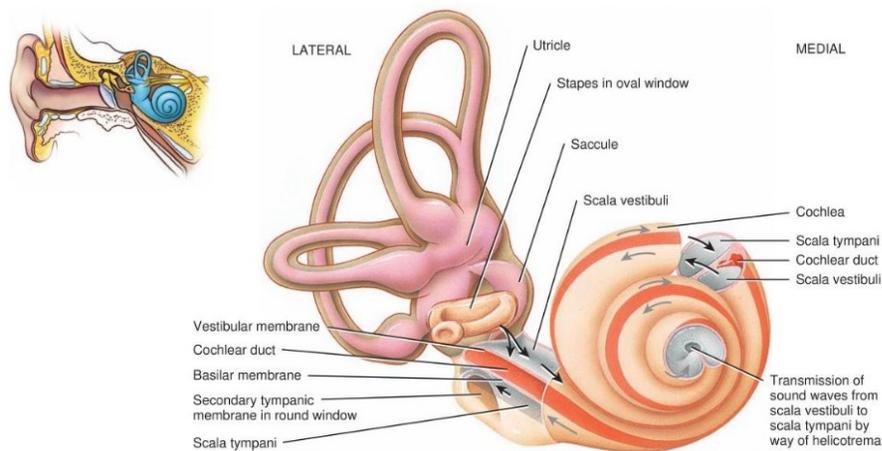


Figura 4. Estructuras de la cóclea, el conducto coclear, la escala timpánica y la escala vesrtibular (1).

El órgano espiral de Corti es una lámina enrollada con células epiteliales de sostén, extendida a lo largo de la membrana basilar y con alrededor de 16,000 células ciliadas inervadas por aproximadamente 30,000 fibras de nervios aferentes, que llevan la información hacia el cerebro a través del nervio craneal VIII. Al igual que la membrana basilar, las células ciliadas y las fibras del nervio auditorio están organizadas tonotópicamente. Existen varios tipos de células dentro del órgano de Corti pero cuatro son las más importantes:

- a) *Células ciliadas internas:* Están distribuidas en una sola fila de aproximadamente 3,500 células y hacen sinapsis con alrededor del 90-95% de las neuronas sensitivas.

- b) *Células ciliadas externas*: Distribuidas en tres hileras de aproximadamente 12,000 células ciliadas externas y el 90% de las neuronas motoras del nervio coclear hacen sinapsis con estas células.
- c) *Células de Deiters*: Son las células de soporte que se encuentran en la base de las células ciliadas externas.
- d) *Células de pilar*: Son las células de soporte que delimitan y separan a las células ciliadas externas de las internas.

Las células ciliadas están unidas a células de soporte por una unión compleja alrededor del su ápex. Cada célula tiene un manajo de microvellosidades denominadas esterocilios en la superficie apical, sirve como un organelo receptor mecánico. Los esterocilios, son un cilindro rígido cuyo citoesqueleto consiste en un fascículo de filamentos de actina reticulado por fibrina, fascina y espina (4). Cada célula ciliada está formada por entre 40-80 esterocilios de diferentes tamaños. Cada manajo de microvellosidad incluye en el borde un cilio más alto llamado kinocilio; éste tiene en la punta una parte abultada pero dicha estructura se va degenerando desde el nacimiento. La parte basal de las células ciliadas hace sinapsis con las neuronas sensitivas de primer orden y con neuronas eferentes del ramo coclear de nervio VIII. Los cuerpos celulares de las neuronas sensitivas están en el ganglio espiral (1,4).

La membrana tectorial es una membrana gelatinosa y flexible que cubre las células ciliadas del órgano espiral (Figura5).

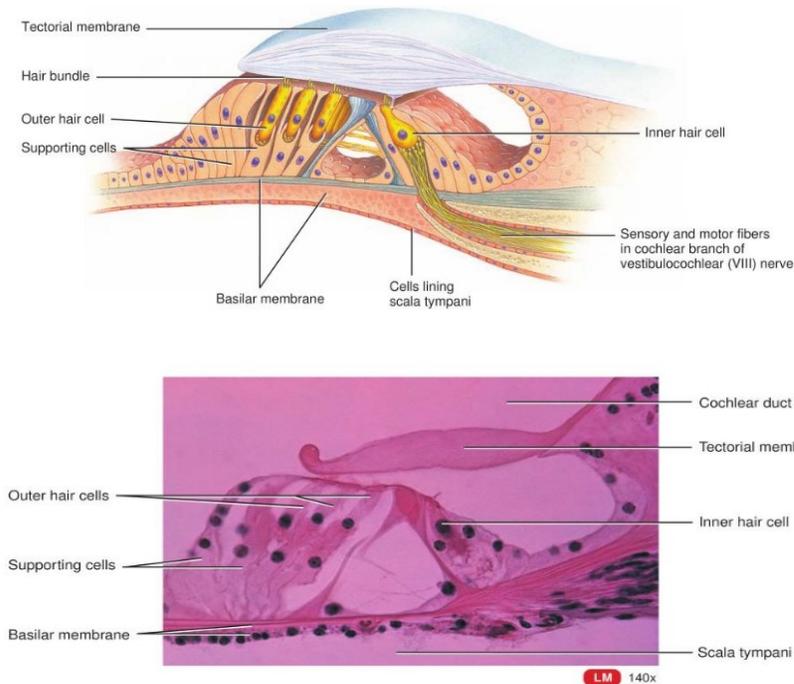


Figura 1. La primera imagen muestra la estructura del órgano de Corti, compuesto por células de soporte y sus células ciliadas externas e internas. La segunda imagen muestra la histología del órgano de Corti (1).

El nervio vestibulococlear (nervio craneal VIII) es el encargado de enviar las señales al cerebro provenientes de las estructuras del oído interno, éste se divide en dos ramas: el ramo vestibular, conformado por los nervios ampollares, los utriculares y los saculares. Y el ramo coclear, el cual se une a células ciliadas del órgano espiral de la cóclea. Los cuerpos neuronales de las neuronas sensitivas se encuentran en el ganglio vestibular (1).

II.2. Fisiología del oído

El sonido consiste en la compresión y la propagación vibraciones en un medio elástico. En el aire el sonido se transmite a una velocidad de aproximadamente 340 m/s.(4) Esta energía mecánica es captada por nuestros oídos de la siguiente manera:

El pabellón auricular (aurícula) dirige las ondas del sonido al meato auditivo externo y después al conducto auditivo. La superficie corrugada auricular ayuda a coleccionar el sonido originado de diferentes posiciones con respecto a la cabeza (4).

Las ondas de sonido que viajan por el conducto auditivo y chocan contra la membrana timpánica y ésta vibra hacia adelante y hacia atrás dependiendo de la frecuencia y de la intensidad del sonido. Esta membrana se conecta con la base del martillo haciéndolo vibrar. El martillo como está conectado del otro extremo al yunque lo hace vibrar también y lo mismo ocurre con el estribo que está conectado al yunque (Figura 6).

La base del estribo se inserta en la cubierta ósea de la cóclea a través de la ventana oval, ésta se moverá hacia adentro y hacia afuera; debido a las vibraciones procedentes de los huesecillos; primero el martillo y el yunque que actúan como palancas y después el estribo como pistón, provocando ondas de presión que moverán la perilinfa de la rampa vestibular hasta la ventana redonda. La ventana oval vibra 20 veces más fuerte que la membrana timpánica debido a los huesecillos.

A su vez las ondas de presión deforman las paredes de la rampa vestibular y timpánica, empujan la membrana vestibular hacia adelante y hacia atrás, y crean también ondas de presión en la endolinfa dentro del conducto coclear. Las ondas de presión de la endolinfa generan vibraciones en la membrana basilar, que llevan a las células ciliadas del órgano espiral contra la membrana tectorial (1).

Cada célula ciliada de la cóclea es más sensitiva a la estimulación de una frecuencia en específico. Las frecuencias características de las células ciliadas internas difieren aproximadamente un 0.2% (4) .

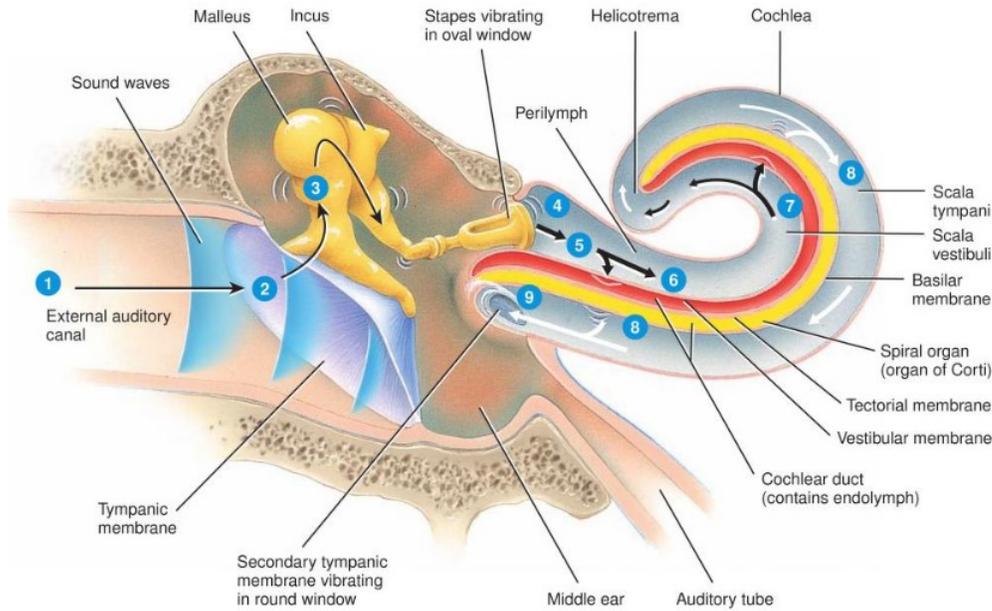


Figura 6. 1) Las ondas de sonido viajan por el conducto auditivo. 2) Las ondas del sonido golpean la membrana timpánica y se convierten en vibraciones. 3) La energía de la onda de sonido es transferida a los tres huesecillos del oído medio, haciéndolos vibrar. 4) La base del estribo se inserta en la ventana oval y al vibrar crea ondas en el fluido a lo largo de la cóclea. 5) El movimiento de la membrana oval genera ondas en la perilinfa de la rampa vestibular. 6) Las ondas de presión viajan de la rampa vestibular a la timpánica hasta la ventana redonda. 7) Al moverse la membrana vestibular hacia adelante y hacia atrás, genera ondas de presión en la endolinfa dentro del conducto coclear. 8) El movimiento de la endolinfa genera vibraciones en la membrana basilar (1).

II.2.1. Membrana basilar

El movimiento de la membrana basilar es una función primordial para la transducción del sonido. Como ya se mencionó, el sonido hace vibrar al tímpano, por lo tanto, se mueven los huesecillos del oído interno. La base del estribo se inserta en la ventana oval, actuando como pistón, provocando diferencias de presión oscilatorias que se propagan rápidamente a lo largo de la escala vestibular y la escala timpánica. Ni la ventana oval ni la redonda se encuentran en el extremo de la base de la cóclea, pero si se encuentran en un ángulo oblicuo con el ápex.

La membrana basilar no tiene propiedades uniformes, si ésta las tuviera a lo largo de su extensión, una compresión movería hacia adentro la membrana timpánica y por consiguiente los huesecillos, incrementando la presión en la escala vestibular y moverían la membrana basilar hacia abajo. Lo mismo ocurriría en una rarefacción, pero ésta se movería hacia arriba (Figura 7).

Lo que ocurre realmente es que la membrana basilar varía continuamente a lo largo de su extensión. El arreglo de frecuencias en la membrana basilar es tonotópico. La relación entre frecuencia y posición en la membrana basilar varía suavemente y monotónicamente pero no es lineal. En cambio, el logaritmo de la mayor frecuencia es aproximadamente proporcional a la distancia desde del ápex de la cóclea (4). La parte más cercana a la ventana oval corresponde a los sonidos de alta frecuencia (20000 Hz). En el vértice de la cóclea, cerca del helicotrema, los sonidos son de baja frecuencia (20 Hz). El volumen del sonido se debe a la intensidad de las ondas sonoras (1).

Conforme la onda se acerca al lugar característico de la frecuencia del estímulo, ésta se hace más lenta y crece su amplitud. La energía del estímulo es transferida después a las células ciliadas en la posición del pico de la onda.

Cada frecuencia de estimulación se excita en su movimiento máximo en una posición en particular de la membrana basilar. El movimiento de la membrana basilar para bajas frecuencias ocurre cerca del ápex, donde la membrana es relativamente más ancha y flácida. Para una frecuencia de media intensidad se excita la membrana en la parte media. Las altas frecuencias ocurren en la parte estrecha de la membrana, en la base tensa. El mapeo de la frecuencia del sonido en la membrana basilar es logarítmico.

La membrana basilar tiene un análisis espectral complejo de sonidos, si por ejemplo el sonido tiene tres frecuencias prominentes, la membrana basilar se excitará en tres regiones diferentes.

Cuando la membrana basilar vibra en respuesta a un sonido, el órgano de Corti y la membrana tectorial también lo hacen, dicho movimiento es detectado por las células ciliadas. Las células ciliadas de cada una de las regiones transducen las oscilaciones de la membrana basilar en potenciales receptores, que excitan las fibras nerviosas (4).

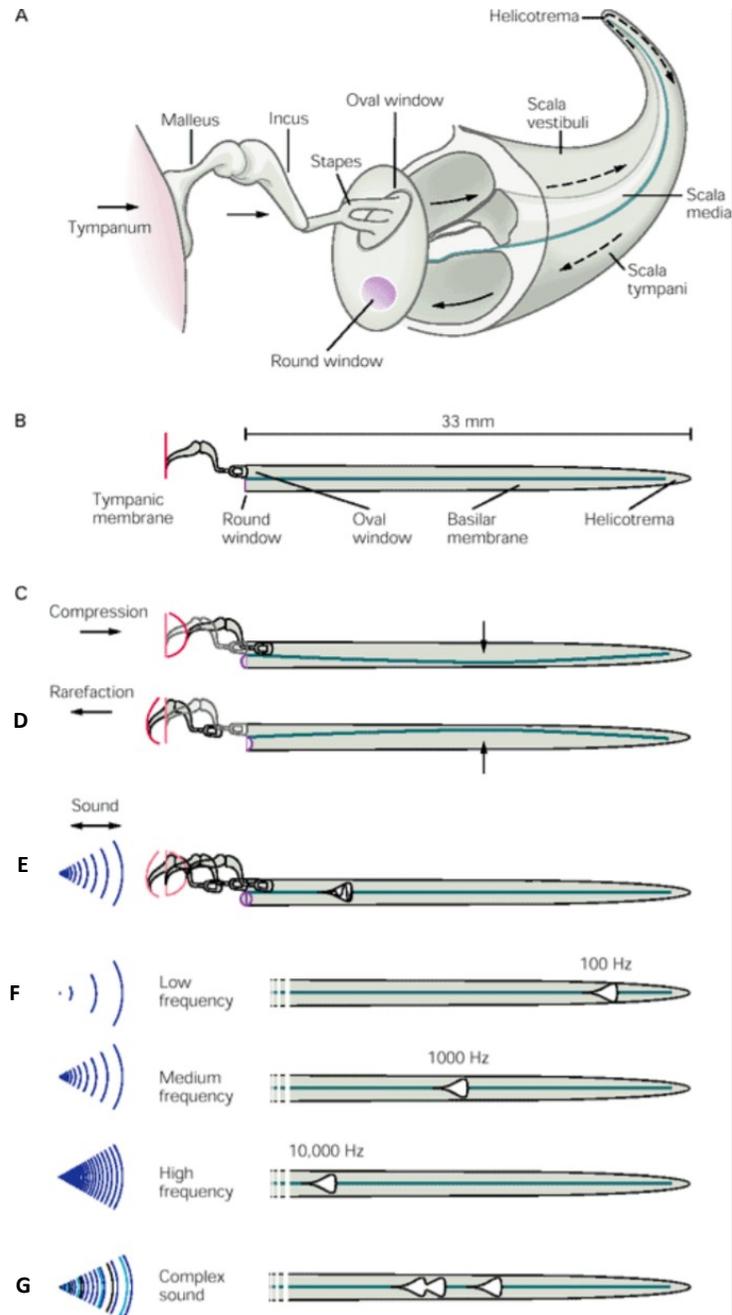


Figura 7. A) C6clea desenrollada donde se muestran las escalas y flujo de energa del estmulo. B) La longitud de la membrana basilar es de aproximadamente 33 mm. C) Movimiento de la membrana basilar ante una compresi6n y una rarefacci6n si tuviera propiedades uniformes. D) Variaci6n de la membrana basilar a lo largo de su extensi6n, en la imagen se ve exageradamente, ya que los sonidos m1s ruidosos tolerables se mueven en la membrana basilar solo ± 150 nm. E) Un zoom de la regi6n activa del inciso D muestra el movimiento de la membrana basilar (exagerado 1 mill6n de veces) en respuesta a un estmulo con una sola frecuencia. F) Zonas activas de la membrana basilar ante una baja, media y alta frecuencia. G) La membrana basilar se excita en tres regiones diferentes ya que el sonido con el que se estimul6 es complejo y tiene tres frecuencias prominentes (4).

II.2.2. Transducción mecanoeléctrica de las células ciliadas

Las células ciliadas son las encargadas de transducir las vibraciones mecánicas en señales eléctricas. El movimiento de la membrana basilar ocasiona un estímulo mecánico que actúa en los esterocilios de las células ciliadas y provoca una respuesta eléctrica, abriendo mecánicamente un canal iónico sensible.

Los esterocilios de las células ciliadas se encuentran unidas entre sí, en la parte final de un esterocilio con la parte lateral del estereocilio adyacente más largo, a través de una trenza molecular llamada *tip link*. Los primeros dos tercios del tip link consisten en moléculas de cadherina-23 y la otra tercera parte de cadenas de protocadherina-15. Las dos componentes están unidas en sus extremos a canales de mecanotransducción.(4)

Cuando los esterocilios se inclinan unos con otros, provoca que se tensen los tip links y se abran los canales de mecanotransducción. Cuando se abre el canal entran iones de K^+ al citosol, a medida que se va despolarizando la membrana plasmática, se abren los canales de Ca^{2+} , permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citoplasma y cuando éste se empieza a acumular se abren los canales de K^+ y los canales de Ca^{2+} sensibles al K^+ que permiten la salida del K^+ para repolarizar la célula. Para tener una apropiada concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, éste sale posteriormente de la célula gracias a una bomba de Ca^{2+} (Figura 8) (4).

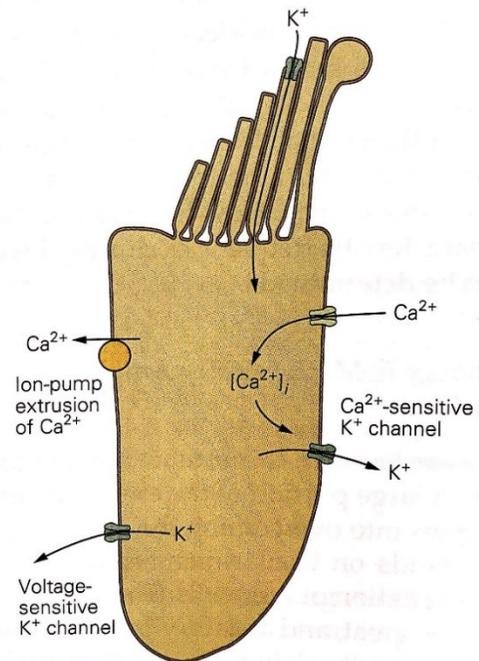


Figura 8. Modelo de una resonancia eléctrica de una célula ciliada por una deflexión positiva (4).

La inclinación de los esterocilios en la dirección contraria provoca que los canales de transducción se cierren y ocurra una repolarización o hasta hiperpolarización de las células ciliadas, reduciendo la liberación de neurotransmisores, lo que ocasiona una disminución de impulsos nerviosos originarios de las neuronas sensitivas (1).

II.2.3. Vía auditiva

Cada célula ciliada tiene en su base varias zonas presinápticas activas en donde se libera el neurotransmisor químico. Cada zona activa tiene cuatro componentes: El cuerpo presináptico denso o listón sináptico, las vesículas sinápticas, la densidad presináptica y la densidad postsináptica.

El cuerpo presináptico denso se encuentra en el citoplasma, de forma esférica u ovoidal, se encuentra rodeado de vesículas de aproximadamente 35 nm a 40 nm de diámetro que contienen neurotransmisores, principalmente glutamato. Debajo del listón sináptico se encuentra la densidad presináptica en donde se lleva a cabo la exocitosis de las vesículas. La densidad postsináptica se encuentra en el plasmalema de la terminal aferente y recibe el neurotransmisor. A mayor cantidad de neurotransmisores, mayor número de impulsos nerviosos en las neuronas sensitivas de primer orden con la célula ciliada.

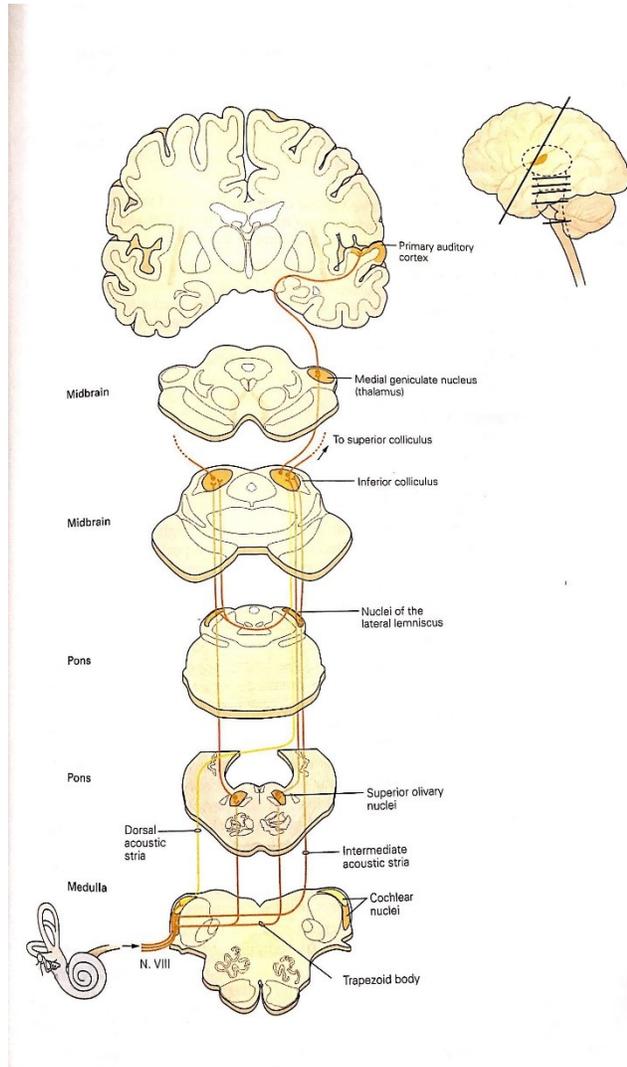


Figura 9. La vía auditiva central del tallo cerebral a través del mesencéfalo y el tálamo a la corteza auditiva (4).

A su vez las terminaciones nerviosas que están en contacto con las células ciliadas y se encuentran organizadas tonotópicamente, llevan los impulsos hacia los cuerpos neuronales de la neurona sensitiva que están en los ganglios espirales de Corti. El ganglio espiral envía sus axones hacia el nervio coclear (N. VIII) y éste llega

a los núcleos cocleares dorsales y ventrales. Las neuronas de los núcleos cocleares se proyectan por diferentes vías paralelas al colículo inferior. Sus axones pasan a través del cuerpo trapezoide, la estría acústica intermedia o la estría acústica dorsal. Algunas estrías terminan directamente en el colículo inferior, otras hacen contacto en el núcleo de la oliva superior compleja o en el núcleo del lemnisco lateral; que a su vez llegan al colículo inferior. Las neuronas del colículo inferior se proyectan al núcleo geniculado medial del tálamo. Por último, las neuronas del tálamo viajan a la corteza auditiva (*Figura 9*) (4).

El complejo olivar superior participa en la detección de diferencias de intensidad del sonido en ambos oídos obteniendo una localización espacial del origen del sonido (5).

La corteza auditiva primaria se encuentra en la parte media de la circunvolución superior del lóbulo temporal. Aquí se reciben los impulsos sonoros y los interpreta como sonidos diferentes. Los impulsos también se transmiten a las áreas de asociación auditiva circundantes para que se interprete el sentido del sonido. Por último, se transmiten hacia el centro común de integración o área de Wernicke en donde se establece el significado global de todas las sensaciones auditivas, visuales y de otros tipos (5).

II.2.4. Medición de la energía del sonido en el oído

El umbral de audición humano es de 20µPa en un rango de frecuencia entre 1 a 4 kHz; mientras que el umbral de dolor se encuentra aproximadamente a los 20 Pa, en una escala de 1:10,000,000. Como no es práctico usar una escala tan grande, usamos la escala logarítmica de decibeles (dB).

El nivel de presión del sonido o Sound Pressure Level (NPS o SPL) es la proporción absoluta entre la presión del sonido y el nivel de referencia (el umbral de audición o la intensidad de sonido más baja que puede ser escuchada) (6). El nivel de presión del sonido, SPL, se puede expresar en decibeles cómo:

$$SPL = 20 \times \log_{10} \left(\frac{P}{P_{REF}} \right)$$

$$SPL = 10 \times \log \left(\frac{P}{P_{REF}} \right)^2$$

Donde P es la magnitud de la presión del sonido en unidades de Pascales (Pa) y la P_{REF} es la presión de referencia que es 2×10^{-5} Pa (N/m^2) (es decir, 0 dB SPL) (7).

II.3. Pruebas auxiliares de diagnóstico en audiología

Existen diversas pruebas para el diagnóstico auditivo; éstas pruebas nos ayudan a saber el nivel de audición o si existe algún déficit en este. Las pruebas que se analizarán en este trabajo son: la prueba ABR y DPOAE.

II.3.1. ABR

El trazo del ABR está compuesto por un conjunto de deflexiones de voltaje que ocurren en los primeros 15 ms después de un estímulo aplicado. Dichas deflexiones son un conjunto de ondas y depresiones que representan la actividad de respuesta de elementos neuronales del nervio craneal VIII y del tallo cerebral. Es decir, la prueba de ABR consiste en un registro de las variaciones de potenciales eléctricos que se generan debido a la actividad que producen las neuronas de la vía auditiva, cuando éstas son provocadas por medio de estímulos auditivos (8). Las latencias y las amplitudes de los picos del ABR son los elementos principales de medición.

En el año de 1967, Sohmer y Feinmesser identificaron respuestas con latencias cortas de 6 ms, lo que ellos identificaron como disparos del nervio VIII o del tallo cerebral y fue así que descubrieron los potenciales provocados auditivos del tallo cerebral (PPATC). Después en 1970 Jewett registró independientemente los potenciales de la piel del cráneo del gato. Éstos tres personajes observaron una serie de ondas que tenían de 5 a 7 picos con latencias menores a 7 ms (8).

La latencia de un pico es simplemente el tiempo después de que el estímulo es aplicado. Las latencias de los ABR son usadas para aplicaciones clínicas ya que son mediciones muy robustas (grandes). Además, la medición de las latencias no se ve afectada por la variación de la posición de los electrodos. Los picos de latencias están determinados por una gran cantidad de procesos tanto fisiológicos como mecánicos en la cóclea, en el tallo cerebral, en el nervio auditivo, además de:

1) el retraso de la cóclea al sitio de activación (tiempo de transporte coclear); 2) El tiempo de respuesta del impulso del filtro (tiempo de acumulación del filtro coclear); 3) el retraso sináptico entre las células ciliadas internas y las fibras del nervio auditivo, y por último 4) el tiempo de conducción neuronal y cualquier intervención de retraso sináptico al tallo cerebral responsable de la actividad de los picos. Los picos de latencia pueden reflejar la activación tardía de la cóclea, cómo cuando hay pérdida de audición las latencias se verán afectadas.

Otro factor importante que determina la latencia de los picos es el nivel de estimulación, las latencias de los picos disminuirán conforme el nivel de estimulación aumente. Otros factores que pueden afectar las latencias son la edad, el sexo y la temperatura corporal.

La amplitud del ABR es medida desde el pico de una onda hasta el pico negativo consecuente. La amplitud depende de la actividad neuronal sincronizada y varía conforme al nivel de estimulación, de la pérdida de audición, de una patología neurológica, y de la edad. Al igual que en la latencia, si existe un ruido residual muy alto, difícilmente se podrá detectar la amplitud del ABR.

Para realizar la prueba ABR se necesitan electrodos para captar las señales, usualmente los electrodos se colocan en la piel del cráneo, en el canal auditivo externo o en el oído medio; dependerá de qué parte del sistema auditivo se desea evaluar. Las señales generadas después de cada estímulo se amplifican, se separan del ruido generado por la actividad eléctrica del cerebro gracias a filtros y procesos de promediación realizados con la computadora. Para definir los diferentes tipos de respuestas eléctricas, se basan en el tiempo en que ocurre la respuesta, en relación con el momento en el que se presentó el estímulo. Así que los diferentes tipos son: potenciales de latencia temprana o corta (0 a 10 ms); de latencia media (10 a 50 ms) y de respuesta tardía o larga (50 a 500 ms). Los potenciales de latencia corta son los más utilizados en audiología (8).

El trazo ABR se genera por la superposición de la actividad eléctrica en varios sitios de la vía auditiva. Como ya se mencionó en la respuesta al estímulo se logra observar diferentes ondas etiquetadas consecuentemente con número romanos del

I al V, las cuales son generadas en distintas regiones de la vía auditiva. Las latencias absolutas de dichas componentes u ondas cambian según la intensidad del estímulo, pero la diferencia de tiempo entre cada componente permanece relativamente constante independientemente del estímulo. La onda I se genera en la parte distal del nervio auditivo, en la región de las células ganglionares; la onda II se genera en la parte central del nervio auditivo en la región de la entrada al tronco cerebral; la onda III se genera en la parte ipsilateral del núcleo coclear; la onda IV en los núcleos olivares y la onda V se generan en el núcleo del lemnisco lateral en la región del tegmentum del cerebro medio (Figura 10) (9,10).

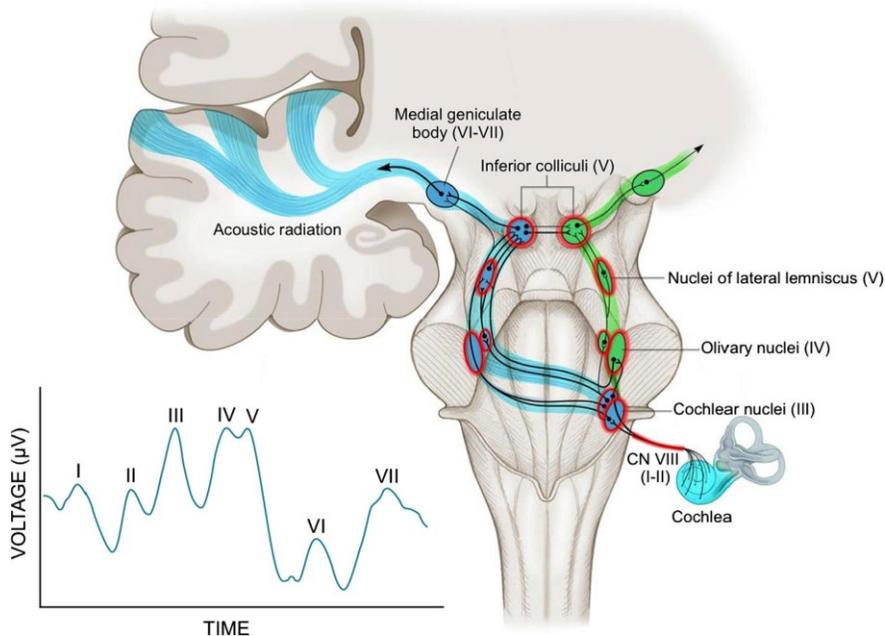


Figura 10. Regiones de la vía auditiva donde se generan las ondas I-VII de ABR (11).

Los PPATC son importantes ya que permiten el diagnóstico de pérdidas auditivas conductivas, cocleares y retrococleares. Usualmente cuando la intensidad del estímulo disminuye la latencia absoluta aumenta. Podemos analizar ésta relación con la ayuda de la función latencia-intensidad donde para sujetos normales forma una curva que desciende de izquierda (baja intensidad y larga latencia) a la derecha (alta intensidad y corta latencia).

Otra de las principales aplicaciones de diagnóstico neuronal de la medición del ABR es para la detección de tumores en el octavo nervio craneal. Gracias a la

sensibilidad del ABR se puede saber el porcentaje de tumores detectados. La especificidad del ABR es el porcentaje de casos de no tumor que están indefinidos. La sensibilidad y la especificidad dependen del criterio de diagnóstico y de la separación entre los valores de distribución en el ABR medido para sujetos sanos y con tumores.

Tabla 1. Latencias normales de los PPTAC (ms)(8).

Sujetos normales (± 3 DN)*	Onda I	Onda III	Onda V	Intervalo I-III	Intervalo III-V	Intervalo I-V
Hombres adultos	1.65	3.79	5.82	2.14	2.02	4.16
Mujeres adultas	1.62	3.74	5.58	2.12	1.86	3.97

*DN= Desviación normativa

II.3.2. DPOAE

En 1978 Kemp registró las primeras emisiones otoacústicas y propuso que éstas reflejan procesos activos involucrados en la transducción del estímulo auditivo (8). La cóclea puede producir sonidos llamados **otoemisiones acústicas**. Se producen por las vibraciones de las células ciliadas externas, en respuesta a las ondas sonoras y señales de las neuronas de la vía eferente. Después esta vibración viaja hasta el estribo y para después abandonar el oído. Se detectan poniendo un micrófono cerca de la membrana timpánica (1).

Las emisiones otoacústicas se pueden dividir en espontáneas y provocadas. Las emisiones otoacústicas espontáneas (EOE) son señales acústicas en forma de tonos con una baja intensidad de origen coclear y pueden medirse en el conducto coclear sin la necesidad de algún estímulo. No pueden detectarse en oídos con pérdidas auditivas mayores de 25-30 dB y son inaudibles para la misma persona.

Las emisiones otoacústicas provocadas transitorias (EOPT) se originan dentro de la cóclea por un aumento no lineal del movimiento de las células ciliadas externas, a causa de la estimulación de un sonido. Dichas emisiones se presentan en un tiempo de alrededor 20 ms después.

En audiolología es importante la prueba de DPOAE para permitir entender cómo las células externas de nuestra cóclea están funcionando. También es una prueba usada en audiolología clínica que detecta la pérdida de audición con precisión.

Las emisiones otoacústicas por productos de distorsión (DPOAE) son sonidos de baja intensidad que se producen durante el proceso de audición normal. Se generan cuando dos tonos puros (f_1 y f_2) se presentan simultáneamente y esto genera que la cóclea emita otro sonido. Estas emisiones viajan desde su sitio de origen en la membrana basilar alrededor de f_1 y f_2 a la región de su frecuencia característica. Viaja en dirección opuesta a como normalmente viaja el sonido a nuestros oídos, desde su sitio de origen, a través del oído medio y hasta el canal auditivo. Las emisiones son medidas con un micrófono especializado con determinada sensibilidad introducido en el meato auditivo. La respuesta se promedia y se analizan sus componentes a través de un programa usando la transformada rápida de Fourier dentro de una ventana de tiempo de 20ms, desplegando finalmente el nivel de respuesta (12).

En la clínica, las frecuencias están generadas con base en el rango de f_2 , ya que f_1 es una frecuencia a un nivel de estímulo preestablecido. La gráfica resultante se le llama "DP-grama", la cual es una gráfica de las amplitudes de DPOAE en función a la frecuencia f_2 . Para realizar una prueba de DPOAE es necesario seleccionar el nivel absoluto de los tonos primarios, el nivel de separación, la frecuencia de los tonos primarios y la proporción de frecuencia entre los tonos primarios (la relación entre la frecuencia de los tonos).

El nivel de tono primario es un factor primordial para grabar las DPOAEs. En un rango de 55-65 dB SPL, provee una mejor precisión para poder separar a sujetos con audición normal de los sujetos con pérdida de audición. Los tonos de niveles medio producen las DPOAEs más diagnosticas. Para el nivel de separación, estudios han mostrado que a un nivel de separación de 10 dB, produce la amplitud más larga y el DPOAE más robusto para el rango de nivel medio. El DPOAE es diagnósticamente más efectivo cuando la frecuencia f_2 se graba entre 2000 Hz y 8000 Hz, a esto se refiere la frecuencia de los tonos primarios. A una frecuencia f_2

de 500 Hz, la habilidad para separar individuos con audición normal y con daño auditivo es complicada debido al ruido base que se encuentra en el sistema. Por último, la proporción de frecuencia se refiere a la separación que hay entre las frecuencias de los tonos puros primarios. En promedio 1.2 es la proporción f_2/f_1 que produce la DPOAE más robusta y está considerada como la proporción de frecuencia óptima; que es el tono f_2 presentado a una frecuencia 1.2 veces más alta que el tono f_1 . La proporción de frecuencia óptima varía ligeramente según la amplitud y frecuencia del estímulo. A bajos niveles la frecuencia de proporción, f_2/f_1 necesita ser ligeramente más pequeña que 1.2 para producir una amplitud óptima. Clínicamente no es necesario hacer este pequeño ajuste; pero en la mayoría de los casos, 1.2 es la proporción de frecuencia que produce la DPOAE más robusta o maximiza cualquier respuesta de amplitud disponible. (12)

Para llevar a cabo la medición de DPOAEs es necesario tener un espacio con bajo nivel de ruido, un adecuado ajuste de la sonda dentro del oído, el menor movimiento del sujeto al que se le está realizando la prueba; esto para que los resultados siguientes de la prueba sean confiables: DPOAE ausente, DPOAE se presenta claro y normal; y DPOAE presente pero no normal.

La medición más frecuentemente usada en las pruebas de DPOAEs es $2f_1-f_2$, aunque la cóclea produce otras distorsiones (f_2-f_1 , $2f_2-f_1$), la de $2f_1-f_2$ es la de mayor amplitud ya que alcanza una intensidad de 5-15 dB.

$$f_{dpoae} = 2f_1 - f_2$$

La f_1 siempre tiene que ser de menor frecuencia que la f_2 . La frecuencia del producto de distorsión o f_{dae} siempre es menor que f_1 y f_2 .

Cuando no se encuentra el DPOAE en dos o más frecuencias f_2 con una suficiente relación señal-ruido (SNR), entonces es una respuesta ausente. Una suficiente relación señal-ruido (SNR) se refiere al cálculo de ruido base usado por la instrumentación la cual calcula la media del ruido base con la variación de la respuesta (desviación estándar) incorporada en la medición; en éste caso, 3-4 dB SNR es suficiente para detectar una respuesta. Si el ruido base es usado solo cómo

referencia entonces de 5-6 dB SNR o mayor es requerido. Por lo tanto, un resultado ausente es aquel en donde el DPOAE no está presente entre al menos 3-6 dB SNR para más de una frecuencia f2.

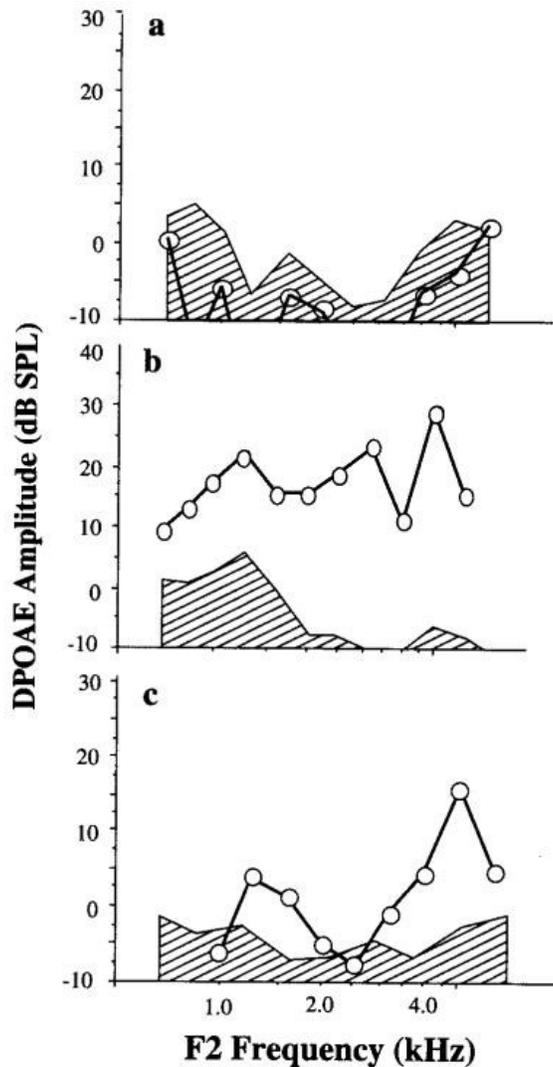


Figura 11. a) DP-grama donde muestra la ausencia de DPOAE ya que todos los puntos se encuentran por debajo ruido base. b) El DP-grama muestra DPOAE presente y normal en un niño de 6 años. SNR y los valores de la amplitud absoluta son robustos y cumplen con los criterios. c) El DP-grama muestra DPOAE presente pero no normal en niño de 8 años con una leve pérdida de audición neurosensorial. El DPOAE está ausente en algunas frecuencias f2, baja amplitud en otras y completamente normal en las frecuencias más altas. (12)

Un DPOAE ausente nos dice que hay una disfunción coclear. La disfunción y grado de pérdida de audición puede variar de leve a profunda. El test de DPOAE no puede determinar el grado de pérdida de audición. En la figura 11 se pueden ver diferentes DP-gramas.

Un DPOAE se puede decir que está presente y es normal cuando: a) el 70% de los puntos son mayores a 3-6 dB SNR; b) existe una apropiada amplitud absoluta para la edad del paciente. Ambos criterios van de la mano.

El DPOAE está presente pero no es normal cuando cumple o marginalmente cumple los criterios de SNR pero tiene que tener una amplitud absoluta excesivamente baja para un paciente de esa edad. Podemos observar un ejemplo en la figura 8 c) donde para algunas frecuencias f_2 está ausente, pero para otras sí.

II.3.2.1. Sensibilidad del micrófono

Las pruebas de DPOAE se realizan con la ayuda de un micrófono para poder grabar la respuesta del oído. La sensibilidad de un micrófono analógico es sencillo y fácil de interpretar. Típicamente especificado en unidades logarítmicas de dBV (decibeles con respecto a 1 V), nos dice cuántos volts de la salida serán dados en SPL. Para un micrófono analógico, su sensibilidad, en unidades lineares de mV/Pa puede ser expresado logarítmicamente en decibeles:

$$Sensibilidad_{dBV} = 20 \times \log_{10} \left(\frac{Sensibilidad_{mV/Pa}}{Salida_{AREF}} \right)$$

Donde $Salida_{AREF}$ es de 1000 mV/Pa (1 V/Pa) radio de salida de referencia.

Dado esto, con la ganancia preamplificadora apropiada, la señal del micrófono puede ser correctamente relacionada según el nivel de entrada que se desee en el resto del sistema.

Un micrófono con alta sensibilidad no significa que siempre será mejor que uno de baja sensibilidad, ya que ésta nos dice algunas características del micrófono, pero no es lo mismo que la calidad. Un micrófono adecuado para una aplicación específica realiza un balance entre el nivel de ruido, punto de recorte, distorsión y la sensibilidad.

Para aplicaciones de largo alcance, los micrófonos de alta sensibilidad son de gran ayuda, ya que el sonido es atenuado conforme la distancia incrementa entre la fuente y el micrófono. El nivel de la señal acústica decrece 6 dB (un medio) cada vez que la distancia a la fuente se duplica.

La mayoría de los electretos y los micrófonos MEMS tienen una sensibilidad entre -46 dBV y -35 dBV (5.0 mV/Pa a 17.8 mV/Pa). Algunos módulos condensadores de micrófonos tienen integrados preamplificadores, así que pueden tener una alta extra sensibilidad de -18dBV (13).

II.4. Mielina

Tanto las neuronas sensoriales como las motoras están recubiertas de mielina. Las vainas de mielina están organizadas en capas concéntricas formadas por capas bimoleculares de lípidos entremezclados con capas de proteínas. La mielina consiste en 70% lípidos y 30% proteínas, con alta concentración de colesterol y de fosfolípidos (14).

Las responsables de la formación de la mielina alrededor de los axones son las células gliales de Schwann y los oligodendrocitos. Las células de Schwann actúan en el sistema nervioso periférico, en cambio, los oligodendrocitos son las células gliales que actúan en el sistema nervioso central. Una célula de Schwann produce una sola vaina de mielina para un segmento de un axón; a comparación de los oligodendrocitos que producen vainas de mielina hasta para 30 axones. El número de capas de mielina de un axón es proporcional al diámetro de éste, largos axones tienen una capa más gruesa de mielina; los axones con diámetros muy pequeños no están mielinizados (4).

Antes de la mielinización las células de Schwann se recuestan a lo largo de los axones, éstas se alinean en intervalos regulares para formar posteriormente segmentos mielinizados, los espacios entre cada segmento son desmielinizados y se llaman nodos. Una vez que la membrana de cada célula de Schwann rodee el axón, formará una doble membrana llamada mesaxón, la cual se elongará y rodeará en espiral al axón en forma de capas concéntricas. Durante ese proceso el citoplasma de las células de Schwann se exprime y se forma una estructura compacta, la vaina de mielina madura (Figura 12) (1).

Para que los oligodendrocitos se activen para formar mielina en los axones es necesaria la presencia de otras células llamadas astrocitos. Los astrocitos son células gliales al igual que los oligodendrocitos, constituyen casi la mitad de las

células en el cerebro. Juegan un papel importante en la nutrición de las neuronas y regulan la concentración de iones y neurotransmisores en el espacio extracelular.

Durante la mielinización temprana del sistema nervioso periférico, las células de Schwann expresan una proteína importante llamada Glicoproteína Asociada a la Mielina (MAG). La MAG pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y se encuentra en el margen de la vaina de mielina madura (compacta) e involucra otras proteínas que influyen en la habilidad de reconocimiento de células (14).

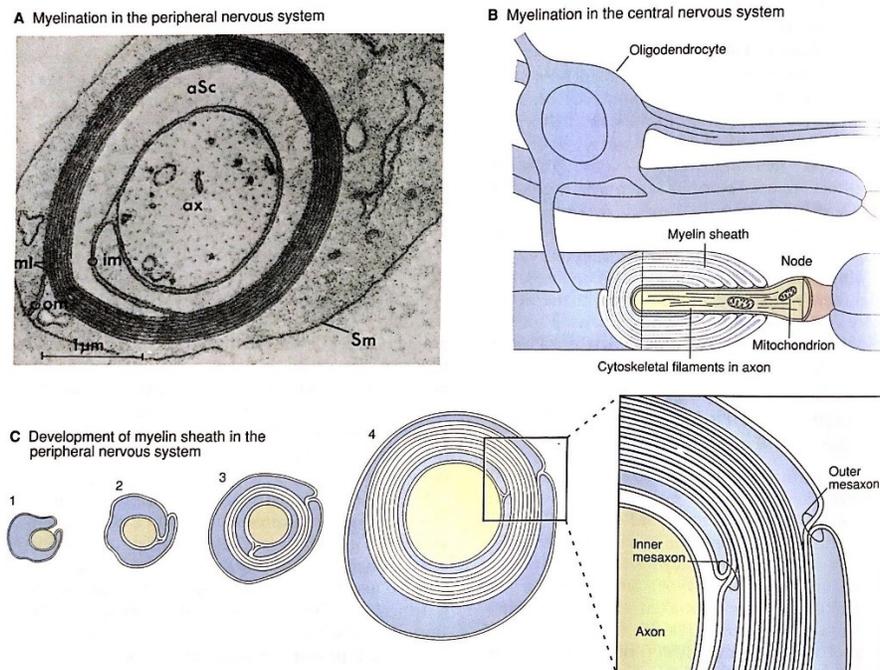


Figura 12. A. Una micrografía electrónica de una sección transversal de un axón (ax) en el nervio ciático de un ratón. La laminilla espiral de la vaina de mielina (ml) empieza su estructura con con el mesaxón interno (im). La vaina espiral se desarrolla como si surgiera de la superficie de la membrana (Sm) de la célula de Schwann hasta el mesaxón externo (om). El citoplasma de la célula de Schwann (aSc) sigue presente en el axón, pero eventualmente se exprimirá y la vaina se convertirá compacto. B. Un axón en el sistema nervioso central recibe su vaina de mielina de un oligodendrocito. C. Una fibra de un nervio periférico es mielinizada por la célula de Schwann (14).

II.4.1. Enfermedades desmielinizantes

La mielina tanto en el sistema nervioso central como en el periférico involucra el mismo grupo de 7 proteínas básicas producidas por un mismo gen por la unión de un empalme de RNA. Dichas proteínas con capaces de producir una fuerte respuesta inmune. Actualmente se han elaborado experimentos en los que se inyectan las proteínas básicas de la mielina y causan encefalomielitis alérgica, caracterizada por inflamación local y desmielinización en el sistema nervioso

central. Pacientes con esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes tienen problemas con las sensaciones y el movimiento ya que la desmielinización hace mas lenta la transmisión de las señales nerviosas.

Otra enfermedad que afecta la mielina se encuentra en los ratones con la mutación de Shiever (Shi). Estos ratones tienen una mielinización deficiente y anormal en el sistema nervioso central. El ratón experimenta fuertes temblores, convulsiones frecuentes y por lo general mueren jóvenes (14).

Más de la mitad de las proteínas de la mielina en los axones centrales son la proteína proteolípida (PLP). Existen mutaciones de la PLP en los humanos, como por ejemplo, la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher. Se sugiere que la PLP está involucrada en la disminución de la mielina ya que se ha encontrado en animales mutantes un reducido número de PLP, hipomielinización , degeneración y muerte de oligodendrocitos (4).

Otra proteína que se encuentra en la mielina periférica es la Proteína Mielina Cero (MPZ o P₀). Esta abarca el plasmalema de la célula de Schwann, tiene un dominio intracelular y pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. En ratones genéticamente modificados a los que se les ha eliminado la función del P₀ muestran poca coordinación motora, temblores y convulsiones (4).

Otra proteína involucrada en ratones mutantes con temblores es la Proteína de Mielina Periférica 22. Existe una proteína similar en los humanos codificada por un gen en el cromosoma 17. Mutaciones del gen PMP22 en el cromosoma 17 produce graves neuropatías periféricas hereditarias, cómo la enfermedad de “Charcot-Marie-Thooth”. Esta enfermedad es caracterizada por debilidad muscular progresiva, un notable decremento en la conducción de los nervios periféricos, en los ciclos de desmielinización y remielinización (4).

II.4.2. Rata TAIEP

La rata taiep es un mutante de tubulina de la cepa Sprague Dawley (SD) que entre otros signos clínicos, presenta hipomielinización y desmielinización progresiva hasta tener una gran hipomielinización en el sistema nervioso central (SNC) cuando

es adulta (15). Taiep es el acrónimo de los principales síntomas motores que la caracterizan: temblor, ataxia, inmovilidad, epilepsia y parálisis.(16) La ataxia es un daño en la coordinación del movimiento voluntario de los músculos, es un hallazgo físico, no una enfermedad (17). La ataxia se presenta en la ratas taiep a los 2 meses de edad, episodios de inmovilidad aparece a los seis meses y presentan una máxima susceptibilidad entre los siete y los ocho meses de edad, siendo mayor incidencia en los machos que en las hembras (16).

La alteración en la mielina en las ratas taiep se debe a la acumulación anormal de microtúbulos en el citoplasma y en los procesos de los oligodendrocitos, por lo tanto, altera los mecanismos de transporte desde el retículo endoplasmático rugoso hacia la porción Cis del aparato de Golgi. El crecimiento de los microtúbulos es alterado ya que su crecimiento es en contra de las manecillas del reloj en lugar de a favor, cómo sucede con los oligodendrocitos normales, lo que altera los mecanismos de transporte de las principales proteínas de la mielina (16). Las ratas taiep presentan niveles subnormales de las proteínas de mielina: la proteína básica de mielina, la proteína proteolipídica, la 3', 5' nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa y de la proteína básica de la mielina de los oligodendrocitos. Las alteraciones en la mielina producen cambios en los componentes centrales de los potenciales provocados auditivos y en los somatosensoriales (16).

Debido a que las ratas taiep presentan una enfermedad neurodegenerativa desmielinizante en el SNC y la vía auditiva involucra al tallo encefálico; con el objeto de analizar la función auditiva de las ratas taiep, en este trabajo de tesis se compararán pruebas de función auditiva entre las ratas enfermas y controles sanos.

Una vez adquiridos los datos de las audiometrías se procesarán y analizarán las señales en Matlab, para poder identificar las latencias, las amplitudes y los umbrales en el caso de las pruebas ABR y las amplitudes de las DPOAEs. Se buscará encontrar diferencias significativas entre las ratas taiep y sanas, para cada una de las variables.

III. Desarrollo

III.1. Calibración

Antes de realizar las pruebas de audición en ratas primero se llevó a cabo la calibración del instrumental utilizado. En el caso de las pruebas ABR se calibró una bocina y para las pruebas de DPOAE dos tweeters. Es necesaria una calibración antes de realizar las pruebas para disminuir el error de medición y para aumentar la confiabilidad en los resultados.

III.1.1. Calibración ABR

Parte de la prueba ABR involucra emitir estímulos a través de una bocina, la cual debe estar calibrada. Se midió la amplitud del sonido emitido por la bocina según lo indicado desde el programa, con la ayuda de un instrumento de precisión (micrófono).

La bocina a calibrar fue del tipo MF1 (altavoces magnéticos de multicampo), marca TDT. La bocina MF1 generalmente se utiliza en el laboratorio para pruebas de audición de bajas frecuencias o de exposición de ruido, ya que maneja un rango desde 1kHz hasta 50kHz y tiene una baja distorsión. Como instrumento de precisión se utilizó el micrófono "Gras 46BE". El micrófono Gras es un instrumento especializado que tiene un rango de frecuencia de 4 Hz a 80 kHz, con un rango de 35 dB a 160 dB y una sensibilidad de 3.6 mV/Pa. Para poder llevar a cabo la calibración, el micrófono se colocó frente a la bocina a una distancia de 13 cm, como lo muestra la *figura 13*. Ambos se encontraban dentro de una caja anecoica. Una cámara o caja anecoica es una sala o espacio especialmente diseñado para absorber el sonido que incide sobre las paredes, el suelo y el techo de la misma, anulando los efectos del eco y la reverberación del sonido (18). La caja anecoica utilizada estaba hecha de madera, recubierta en su exterior con corcho y en su interior cubierta de esponja en cada una de las paredes de la caja.



Figura 13. Calibración de la bocina (izquierda) con ayuda del micrófono Gras (derecha).

Para realizar las pruebas de calibración y los experimentos se utilizó el chasis PXIe 1073 de National Instruments (Figura 14). El PXIe 1073 cuenta con una serie de ranuras (slots) adaptables para llevar a cabo pruebas o mediciones. Las ranuras instaladas en el chasis eran la NI PXIe-4610 y la NI PXI-4461. El NI PXIe-4610 es un amplificador de baja distorsión y poco ruido que ofrece una señal de salida versátil capaz de controlar sistemas de pruebas y cargas reales como bocinas. El PXIe-4610 genera un ruido mínimo y maximiza la potencia desde una sola ranura PCI Express. También es fácil de usar para conectar fuentes de señal dinámica a amplificadores externos, tiene una ganancia de 10X y cuenta con dos canales de entrada y dos de salida.

El NI PXI-4461 es un módulo de sonido y vibración, está diseñado para aplicaciones de sonido y vibraciones, proporciona una generación de señales dinámicas de dos canales y una adquisición de dos canales y tiene seis ajustes de ganancia para configurar su rango de entrada. El PXI-4461 incluye un hardware y un software necesario para realizar medidas precisas con micrófonos, acelerómetros y otros transductores que tienen rangos dinámicos muy altos. Entre sus aplicaciones más comunes incluyen pruebas de audio; ruido automotriz, vibración y severidad (NVH); y monitoreo de condición de máquinas.

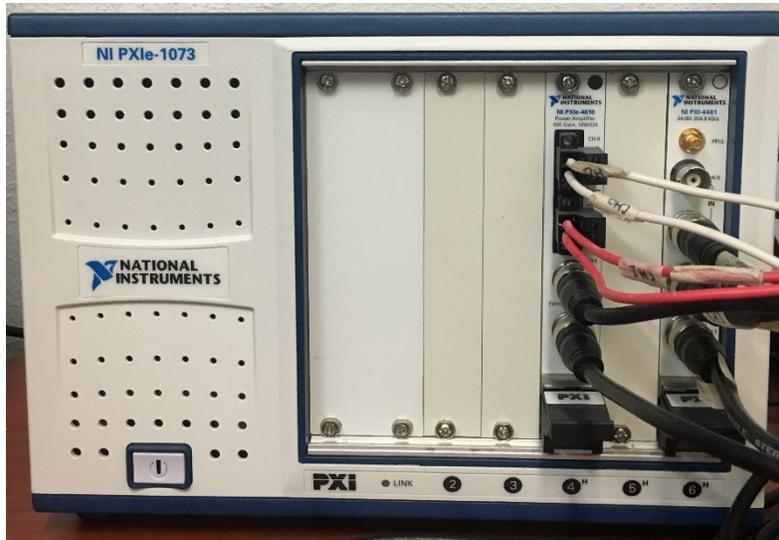


Figura 14 Chasis PXIe 1073 de NI, con un amplificador instalado en el slot 4 y un módulo de sonido en el 6. El PXIe-4610 cuenta con dos entradas (IN CH0, CH1) y dos salidas (OUT CH0, CH1). El módulo de sonido PXI-4461 tiene 4 conectores hembra BNC (AI0, AI1, AO0 y AO1) para conectar señales analógicas. También tiene un conector macho SMB (PFI0) para conectar disparadores digitales de niveles TTL externos.

El amplificador PXIe-4610 cuenta con dos entradas (IN CH0, CH1) y dos salidas (OUT CH0, CH1). El módulo de sonido PXI-4461 tiene 4 conectores hembra BNC (AI0, AI1, AO0 y AO1) para conectar señales analógicas. También tiene un conector macho SMB (PFI0) para conectar disparadores digitales de niveles TTL externos. El micrófono Gras se conectó a la entrada AI0 o AI1 del PXI-4461 y la bocina MF1 a la salida AO0.

Para controlar el módulo PXIe 1073 y realizar las pruebas de calibración, se utilizó una interfaz de LabView llamada ABR-C-Calibration (*Figura 15*). La interfaz es muy sencilla de utilizar, los pasos para realizar la calibración para ABR-click fueron los siguientes:

- 1) Se selecciona la ubicación donde se desea guardar el programa en "Calibration file path"; la entrada en "Input channel" que correspondía al micrófono Gras (AI0 o AI1) y la salida "Output channel" que es la bocina (AO0).
- 2) La frecuencia de muestreo siempre se manejó a 100,000 muestras por segundo y se seleccionó el número de repeticiones (por lo general entre 5 y 10).
- 3) Se presiona el botón de "Start"

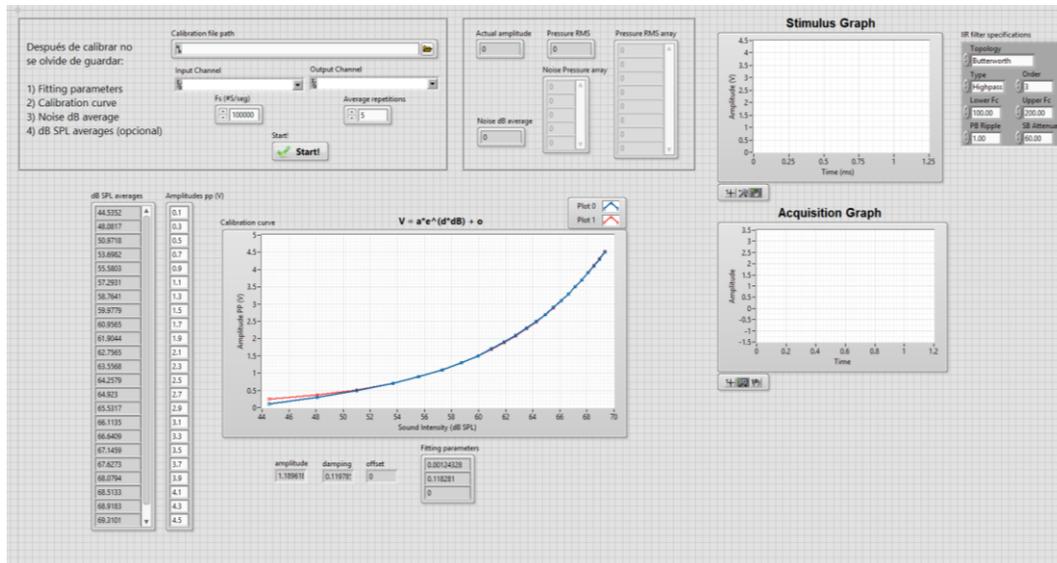


Figura 15. Interfaz de LabView para realizar calibraciones de ABR-click.

El programa despliega una gráfica del estímulo que es emitido por la bocina para ser captado por el micrófono en unidades de Pascales (Pa). El micrófono tiene una sensibilidad de 4 mV/Pa. También aparece otra gráfica “Acquisition Graph” la cual muestra las amplitudes obtenidas en tiempo real y a su vez se le aplica un filtro de Buttherworth pasa altas. Por último, aparece otra gráfica “Calibration curve” que muestra el promedio de la intensidad del sonido (dB SPL) para las diferentes amplitudes pp (Volts). Esta última gráfica va en función de la fórmula:

$$V = a \cdot e^{(d \cdot dB)} + o$$

Donde ‘a’ es la amplitud obtenida, ‘d’ el *damping* y ‘o’ el *offset*. Damping se refiere a la disminución de la amplitud de un cuerpo vibrante a lo largo del tiempo (18). Estas tres variables serán nuestros parámetros de ajuste que se modificarán en el programa que genera el estímulo para poder realizar los experimentos.

La calibración de la bocina se realizó para dos tipos de estímulos: clicks y tonos puros. El estímulo click es un impulso rectangular, tienen una corta duración y tienen un amplio espectro. Su amplio espectro de frecuencias está destinado a respuestas provocadas de muchas fibras nerviosas a lo largo de la cóclea y es la mejor opción para evaluar la vía auditiva, ya que por su rapidez, genera una buena sincronía neural que produce una morfología claramente definida (19,20). Un tono puro se

genera con una onda sinusoidal que tiene una longitud de onda, una amplitud, un periodo (T) y una frecuencia (21).

Para la calibración de estímulos tipo clicks los datos obtenidos fueron:

Tabla 2 Parámetros de ajuste para calibración ABR- click

Amplitud	0.000853491
Damping	0.120602
Offset	0
Noise dB average	48.6431

Para el caso de la calibración de tonos puros se usó el programa ‘ABR-PT-calibration’, este programa es muy parecido al de calibraciones de clicks pero la única diferencia es que muestra una cuarta gráfica de las curvas de calibración para las frecuencias de 500, 1k, 2k, 4k, 6k, 8k, 12k, 16k, 32k, y 32k (Hz) de manera individual. La gráfica de ‘Calibration curves’ es la que muestra todas las curvas de calibración juntas. Como resultado se obtienen los parámetros de ajuste: amplitud, damping y offset; que serán modificados en el programa que genera los tonos puros en los experimentos. Los datos obtenidos de la calibración son los mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Datos obtenidos de calibración de bocina utilizada para pruebas de ABR-tonos puros

Frecuencia(Hz)	Amplitud	Damping	Offset
500	0.000082	0.112539	0
1000	0.000040	0.115706	0
2000	0.000058	0.115361	0
4000	0.000031	0.115455	0
6000	0.000099	0.115762	0
8000	0.000061	0.115418	0
12000	0.000053	0.115519	0
16000	0.000058	0.115775	0
24000	0.000052	0.115526	0
32000	0.000040	0.115509	0
40000	0.000035	0.115369	0

III.1.2. Calibración DPOAE

Para la estimulación sonora en los experimentos de DPOAEs se utilizaron ‘tweeters’. Un tweeter es un altavoz especializado que emite frecuencias altas

correspondientes a las últimas tres octavas del rango de audiofrecuencia. Los tweeters utilizados eran marca Radox, con una impedancia de 8 ohms, un rango de frecuencia de 1kHz-21 kHz, una potencia de 100 W, con sensibilidad de 105 dB y un imán de neodimio de 4.2 oz.

Para realizar la calibración se utilizaron dos micrófonos; el marca Gras, ya descrito, que sería el instrumento de calibración y un segundo de la marca Shure que captaría las emisiones otoacústicas. El micrófono marca Shure modelo MX150B/O-TQG, es un micrófono de condensador de electreto profesional, omnidireccional, con una respuesta de frecuencia de 20 Hz a 20kHz y una sensibilidad de -46.5 dBV/Pa (4.5 mV). Se realizó un sistema cerrado entre los tweeters y el micrófono Shure. El micrófono Gras 46BE se colocó frente al micrófono Shure para comparar el nivel de sonido captado por los dos diferentes micrófonos. Los tweeters y los dos micrófonos fueron colocados dentro de la caja anecoica. *Figura 16*

También fue necesario utilizar una interfaz de audio para conectar el micrófono Shure al chasis de National Instruments ya que la entrada del micrófono no es compatible con este. La interfaz utilizada fue la 'TRI CAPTURE' marca Roland, con alimentación USB, frecuencia de muestreo de 96 kHz, 48 kHz y 44.1kHz y una salida de 4dBu.

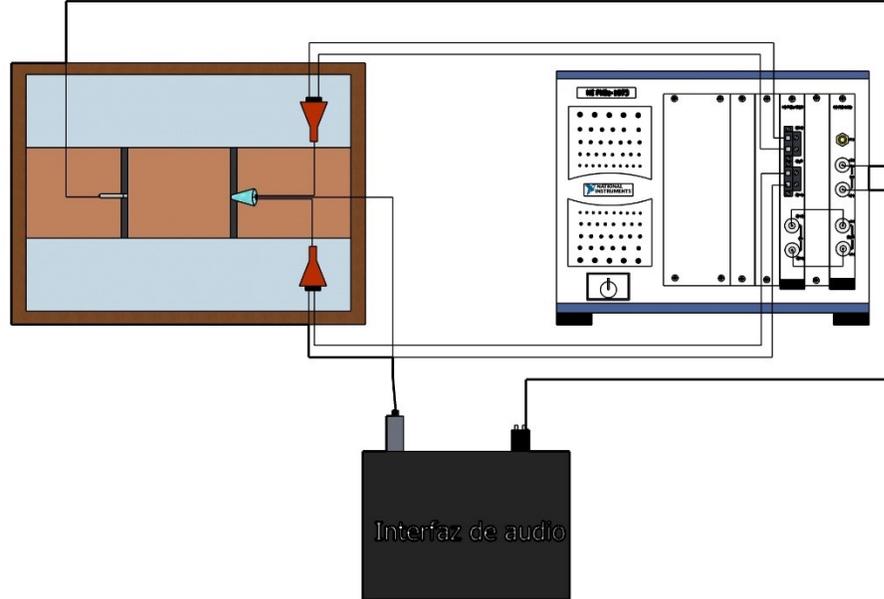


Figura 16. Sistema utilizado para la calibración de los tweeters. Dentro del recuadro café se muestra cómo los tweeters están conectados a las salidas CH0 y CH1 del amplificador del chasis. El micrófono Shure (dentro de la carcasa azul) está conectado a la interfaz de audio a través de un adaptador; después la salida estéreo de la interfaz de audio se conecta un adaptador estereofónico que va conectado a un cable coaxial que se conecta a la entrada AI1 del módulo de sonido PXI-4461. El micrófono Gras se conecta a la entrada AI0 del módulo de sonido y la entrada CH0 del amplificador se conecta a través de un cable coaxial a la salida AO0 del módulo de sonido y la entrada CH1 del amplificador se conecta a la salida AO1 del módulo del sonido.

Una vez que ya se realizaron todas las conexiones que muestra la figura 16, el chasis de National Instruments es conectado a la computadora para poder manipular y realizar las pruebas a través del software LabView utilizando la interfaz 'DPOAE-calibration'. La calibración de los tweeters hizo por separado, es decir, primero el tweeter uno y después el tweeter dos. Los pasos para realizar la calibración fueron:

- 1) Se selecciona la ubicación donde se desea guardar el programa en "Calibration file path"; la entrada en "Input channel" que era el micrófono Gras (AI0) y el micrófono Shure (AI1); y por último la salida "Output channel" que es uno de los dos tweeters(AO0 o AO1).
- 2) La frecuencia de muestreo siempre se estableció a 100,000 muestras por segundo y se selecciona el número de repeticiones (por lo general entre 5 y 10).
- 3) Se presiona el botón de "Start"

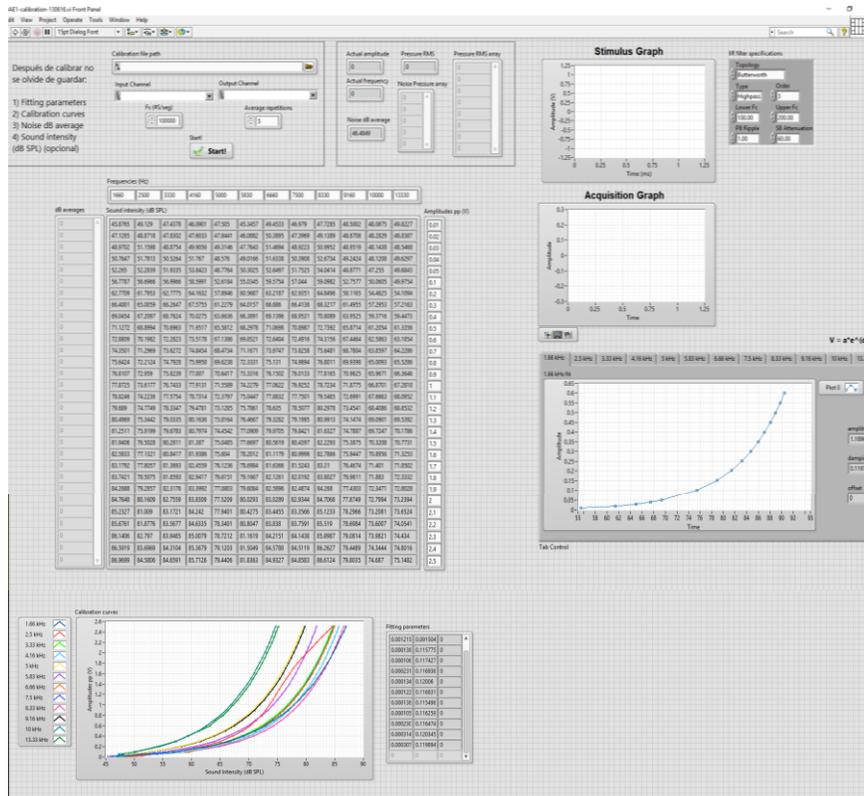


Figura 17. Programa utilizado para calibración de los tweeters. El programa despliega cuatro gráficas, una referente al estímulo que se le está enviando a los tweeters, la gráfica de adquisición la cual grafica en tiempo real los sonidos detectados por el micrófono y las gráficas de curvas de calibración.

La interfaz de calibración para DPOAEs es muy similar a la de los tonos puros (Figura 17). El programa despliega cuatro gráficas, una hace referencia al estímulo que se está mandando, otra de las amplitudes que se están obteniendo en tiempo real en el que se realiza una prueba, otra muestra las curvas de calibración obtenidas por separado para las frecuencias de 2k, 3k, 4k, 5k, 6k, 7k, 8k, 9k, 10k, 11k, 12k, 16k (Hz); y la última, muestra las curvas de calibración en una sola gráfica. Estas curvas también están en función de la fórmula antes mencionada ($V = a \cdot e^{(d \cdot dB)} + o$) y se obtienen tres variables: amplitud, damping y offset para cada una de las frecuencias (Tabla 4).

Tabla 4. Valores para calibración de tweeters 1 y 2.

Tweeter 1	Frecuencia (Hz)	Amplitud	Damping	Offset
	2000	2.52706E-5	0.123828	0
	3000	0.000109918	0.152406	0
	4000	0.000268691	0.123496	0

	5000	0.000237472	0.138731	0
	6000	0.000233952	0.127504	0
	7000	0.000367577	0.123418	0
	8000	0.000372152	0.11838	0
	9000	0.000474347	0.121793	0
	10000	0.000285769	0.150524	0
	11000	0.000327052	0.145757	0
	12000	2.87499E-5	0.205744	0
	16000	0.000186467	0.15924	0
Tweeter 2	2000	2.38915E-5	0.123152	0
	3000	0.000333949	0.134954	0
	4000	0.000347996	0.118977	0
	5000	0.000604835	0.123652	0
	6000	0.000298538	0.123453	0
	7000	0.000414006	0.121292	0
	8000	0.000358579	0.11817	0
	9000	0.000459179	0.121292	0
	10000	5.25956E-5	0.176759	0
	11000	6.52664E-5	0.173486	0
	12000	5.12904E-7	0.278863	0
	16000	6.79255E-6	0.222816	0

Estos valores de la tabla anterior se modifican en el programa que genera el estímulo para las DPOAEs. Lo mismo se realizó para el otro tweeter.

III.2. Pruebas experimentales en los modelos animales

Todas las pruebas experimentales se realizaron con la aprobación del comité de bioética de la Universidad de Guanajuato, con número CIBIUG-P30-2015.

Se utilizaron ratas taiep y controles sanos de la misma cepa (SD) de 3 y 7 meses de edad. Los animales se anestesiaron vía IP con una mezcla de ketamina/xilacina: 0.125mg/kg /5mg/kg, respectivamente. Durante el procedimiento experimental los animales se mantuvieron sobre una manta cálida para mantener su temperatura en 37°C.

III.2.1. ABR

Una vez anestesiada la rata, se le colocaron tres electrodos subcutáneos:

- Positivo: Se coloca en la región retroauricular del oído de prueba (Figura 18).

- Negativo: Se coloca en la línea media del cráneo.
- Electrodo de referencia (tierra): En la parte caudal de la rata, entre las dos patas traseras.

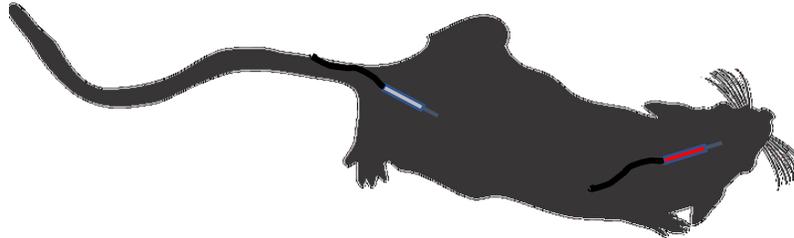


Figura 18. Configuración de electrodos en la rata. El electrodo verde es el positivo, el rojo el negativo y el gris es la tierra (22).

Debido a que la señal de los electrodos era muy pequeña, éstos se conectaron a un amplificador de precisión de ECG, como lo muestra la figura 19, pero en lugar de utilizar el amplificador operacional OPA2604, se utilizó el amplificador operacional TL062 con factor de amplificación de 200. La salida del amplificador se conectó a la entrada del chasis PXIe 1073.

Para la estimulación sonora, la bocina MF1 se colocó frente al oído de prueba a una distancia de 13 cm.

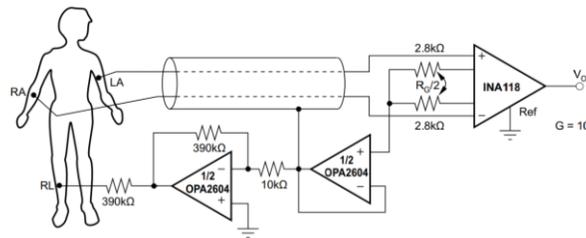


Figura 19. Amplificador ECG utilizado en la rata. Los electrodos se colocaron como antes mencionado en la figura 16. El amplificador operacional OPA2604 se sustituyó por el TL062.(23)

Las pruebas audiométricas realizadas fueron ABRs estimulando con clicks y con tonos puros a través de una interfaz de LabView.

III.2.1.1 ABR-Click

Adquisición de datos ABR-click

La interfaz utilizada para realizar las pruebas de ABR-click se muestra en la figura

20. Para realizar las pruebas se siguieron los pasos siguientes:

- 1) Se introduce el nombre del operador que realizará la prueba en 'User name', el nombre del experimento en 'Subject ID' y por último, la ubicación en donde se guardarán los archivos de datos en 'File path'.
- 2) En 'Input Channel' se selecciona la entrada AI0 del PXI-4461 (slot6) y en 'Output Channel' la salida AO0. La frecuencia de muestreo para todas las pruebas realizadas fue de 100000 muestras por segundo.
- 3) Después en 'Protocol settings' se introduce el número de pruebas que se desea realizar, que en éste caso para click eran siete pruebas, una prueba cada 10 dB en un rango de 10-70 dB. También en 'Type of stimulus' se selecciona el tipo de estímulo, que será click.
- 4) Para poder realizar las pruebas a diferentes decibeles, se selecciona la amplitud dB SPL, la frecuencia de estimulación 'Stimulation freq'; que en todas las pruebas permaneció en 20 estímulos por segundo, y el número de repeticiones que variaba entre 1000 y 2000 según lo deseado. Después se presionaba el botón de 'Add' y así para las diferentes amplitudes. Una vez añadidas todas las pruebas en 'Protocol list', se presiona el botón "Start!" para que comenzara a correr el programa.

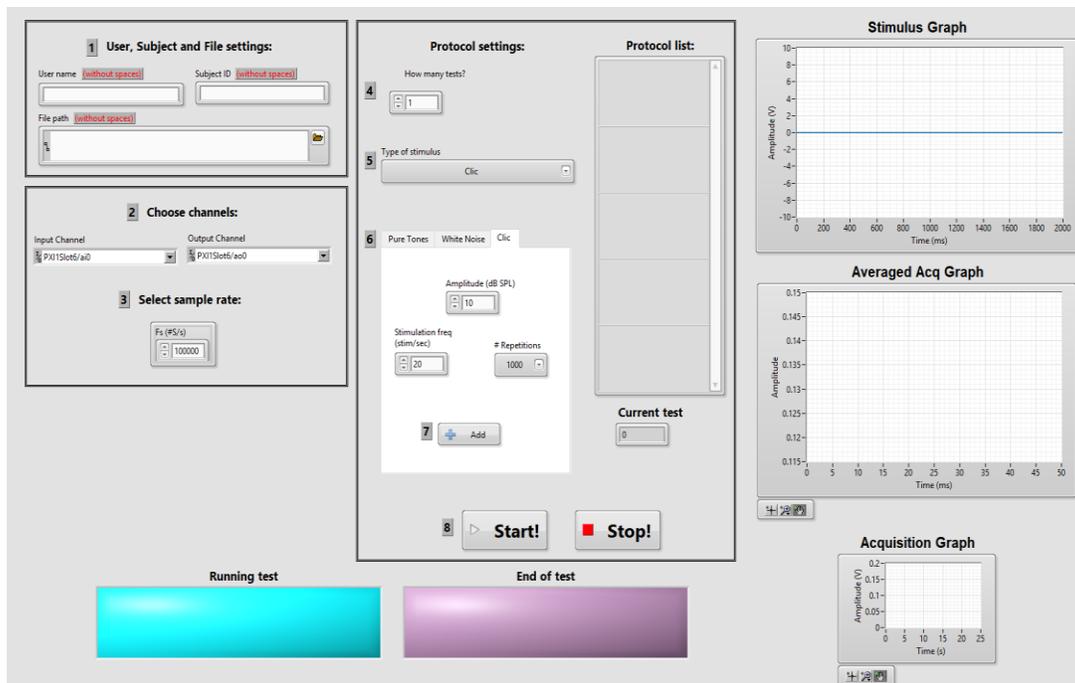


Figura 20. Interfaz para pruebas ABR-click.

En el programa se logran observar tres gráficas. ‘Stimulus Graph’ muestra el estímulo que está siendo emitido por la bocina hacia el oído de la rata, la gráfica “Avaraged Acq Graph” muestra el promedio filtrado de las amplitudes obtenidas en tiempo real; y la gráfica “Acquisition Graph” muestra el promedio de todas las amplitudes obtenidas, pero sin aplicar ningún filtro.

El programa generará entre dos a cuatro archivos de datos según el número de repeticiones, cada archivo de 500 datos cada uno.

En ocasiones si la rata mostraba signos de reflejos, se administraba otra dosis de anestésico para seguir realizando las pruebas, es por esto por lo que hay que prestar atención a la gráfica de adquisición ya que muestra en tiempo real la señal que se está adquiriendo.

Una vez terminadas las pruebas se le retiran los electrodos. En caso de que se vayan a realizar más pruebas se verifica que la rata presente un buen estado de anestesia, presionando ligeramente la pata y verificar que no se muestre un reflejo de flexión del miembro, de ser positivo se añade la mitad de la dosis inicial para

mantener el estado anestésico. Después se utiliza otra programa en Matlab para poder realizar el análisis de los datos obtenidos.

Análisis de datos ABR-Click

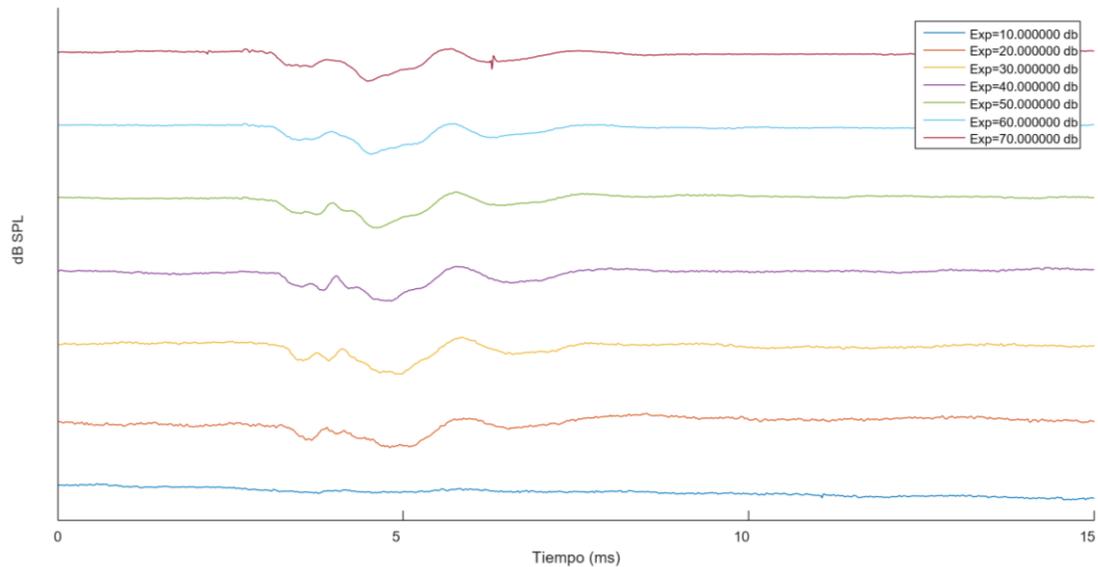
El análisis de los datos de ABR se realizó en MATLAB a través del programa llamado 'RevisaClick'.

El programa está conformado por una serie de funciones que llevan a cabo todo el procesamiento de los datos. El programa llama al directorio donde se encuentran los archivos de datos de las pruebas realizadas para analizar y revisar su contenido. También el programa verifica que la frecuencia de muestreo entre cada archivo sea la misma, que el estímulo sea un click, que los estímulos por segundo sean los mismos, que la duración de la señal sea la misma, que la duración del estímulo sea la misma y que el retraso sea el mismo. A su vez, se extrae la información de las pruebas realizadas que se almacenan en el archivo ".expinfo"; como es el nombre del usuario, el ID del sujeto de prueba, el nombre del archivo, la dirección donde se encuentran guardados los archivos, la frecuencia de muestreo, el estímulo, la amplitud (dB SPL), los estímulos por segundo, el número de repeticiones, la duración de la señal, la duración del estímulo y la duración del retraso. Se crea un filtro pasa banda de 300 y 3000 Hz, para aplicarlo a la matriz de datos. Después el programa se encarga de leer todos los archivos donde se seccionaron los datos, encuentra el largo de la dimensión de la matriz de datos y aplica un filtro a los trazos generados por los datos.

Después se crea un arreglo (7*1500*5000), el cual contiene los datos de las siete señales a diferentes decibeles en respuesta al estímulo click. El programa muestra cuatro gráficas, dos gráficas que contienen las señales de 10-70 dB sin filtrar, pero una escalando cada trazo y la otra usando la escala del trazo a 70 dB y las otras dos muestran las siete señales obtenidas a diferentes decibelios, pero filtradas con un filtro pasa banda de 200 y 3000 Hz, escalando cada trazo por separado y otra usando la escala del trazo a 70 dB. Se aplicó un segundo filtrado a las señales y otras se escalaron con base al trazo de 70 dB para lograr obtener una mejor

visualización del umbral, pero las demás gráficas sirvieron para poder hacer una comparativa en cuanto a la claridad de la señal.

a)



b)

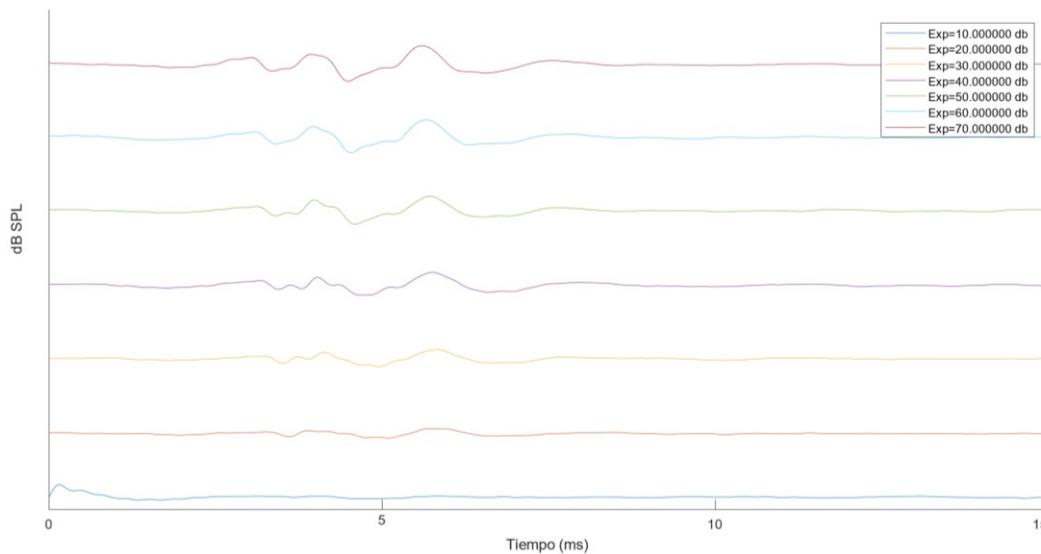


Gráfico 1. a) Gráfica que muestra trazos de 10-70 dB de la prueba ABR-click, sin filtrar, donde cada trazo tiene su escala propia. b) Mismos trazos que los anteriores pero filtrados y escalados según el trazo de 70 dB. Ambas gráficas fueron obtenidas de la prueba de audición ABR-click para la rata SD4_250717, donde su umbral se encuentra a los 20 dB.

El umbral de audición es importante ya que nos dice cuando el sujeto comienza a escuchar y se puede identificar cuando en el trazo se comienzan a ver las ondas

del ABR. En el gráfico 1 se muestra el caso de la rata SD4_250717, que es una rata sana y el umbral se puede localizar a los 20 dB. Además, se puede observar que la gráfica B) es una señal más limpia en comparación de la A), ya que se le aplicó un filtro y se usó una única escala para los trazos, que en este caso es la de los 70 dB.

Una vez identificado el umbral en las pruebas para click se utilizó un programa parecido al que se usó para la detección de umbrales para identificar las amplitudes de las ondas ABR pero en lugar de generar una sola gráfica con todos los trazos, se obtuvo una gráfica independiente de amplitud (μV) contra tiempo (ms), para cada trazo. A estos trazos al igual que en de los umbrales se les aplicó un filtro pasa banda de 200 y 3000 Hz (Gráfico 2).

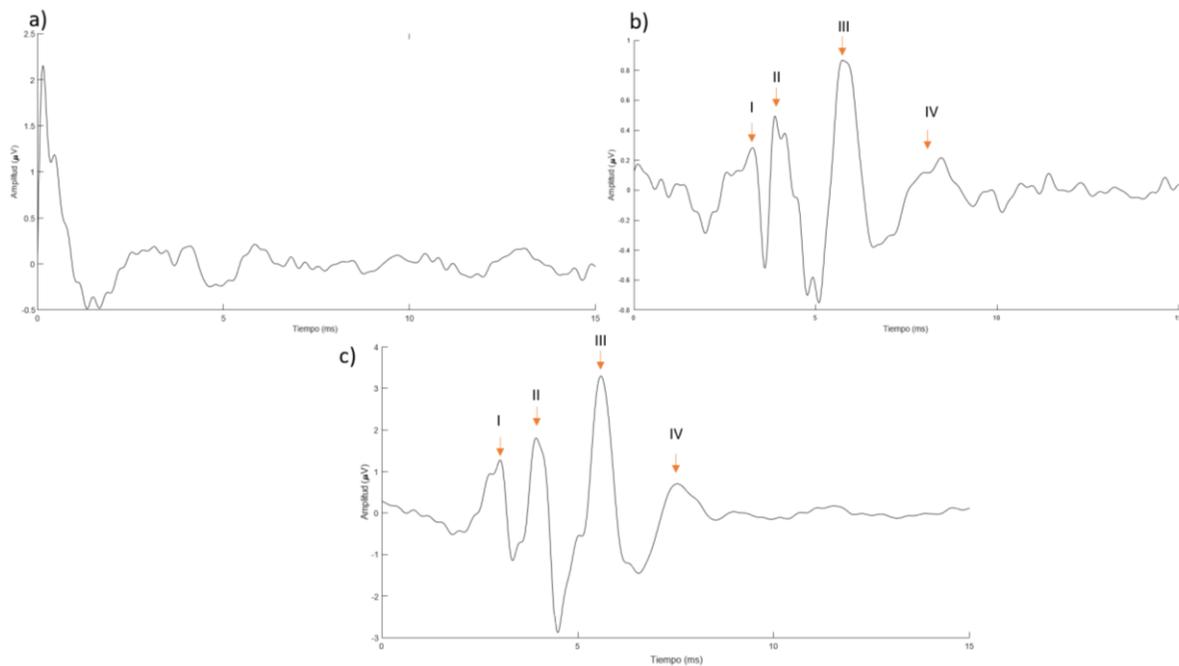


Gráfico 2. (a) Resultado de la prueba de ABR_(click) a 10 dB, realizada en la rata SD4_250717, donde no se logran apreciar las ondas en respuesta al estímulo click. (b) Umbral de audición detectado a los 20 dB. (c) Trazo de un click del ABR a los 70 dB.

En las gráficas obtenidas de cada experimento, se identificaron las ondas (picos positivos) de la prueba ABR-click con la ayuda de cursores de Matlab para después exportar los valores de amplitud y tiempo a Excel para poder organizar los datos e interpretar los resultados.

Los experimentos se clasificaron en dos grupos, ratas sanas y ratas taiep, conformado por 8 y 5 sujetos respectivamente. Una vez obtenidos los vectores de Matlab, se calcularon amplitudes, latencias y umbrales de las ondas I-V en el trazo del ABR a diferentes decibeles en los que se realizaron las pruebas.

III.2.1.2. ABR-PT

Adquisición de datos ABR-PT

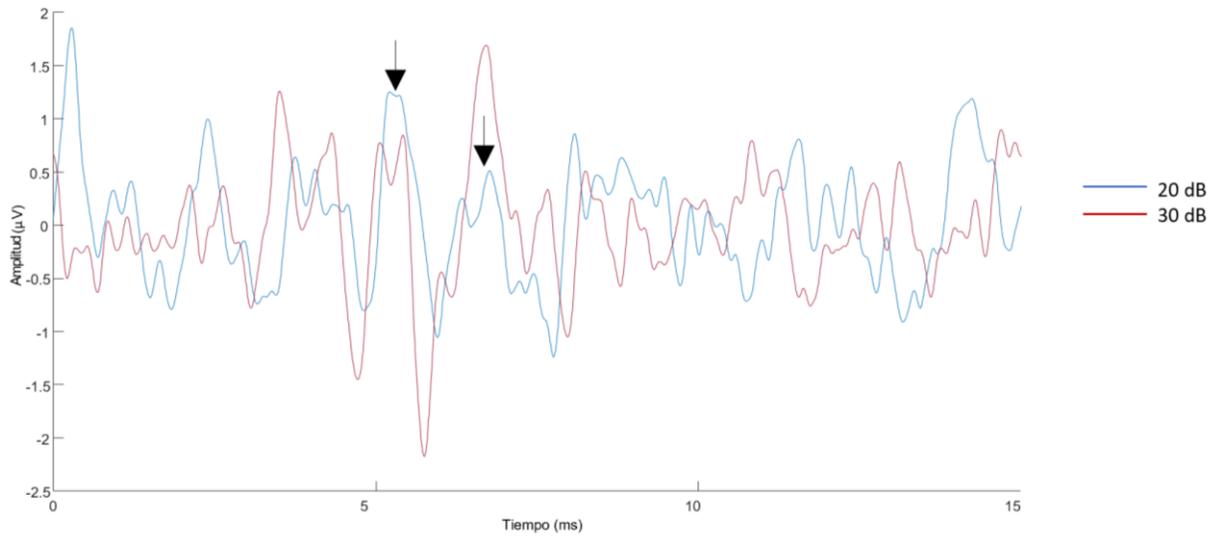
Para realizar las pruebas de tonos puros se utilizó la misma interfaz que para clicks; pero en lugar de seleccionar la pestaña de click se selecciona la de Pure Tones. Las pruebas se realizaron a frecuencias de 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16000 y 32000 Hz y de 10-70 dB. La frecuencia de estímulo continuó siendo la misma de 20 estímulos por segundo y el número de repeticiones variaba entre 500 a 2000 repeticiones.

Análisis de datos ABR-PT

De igual manera el análisis de datos obtenidos de la prueba de ABR-Tonos puros, se realizó con un programa de Matlab, que realiza el mismo tipo de análisis y gráficos que para lo clicks.

El programa genera una serie de gráficas que muestran los trazos de amplitud contra tiempo de cada una de las pruebas realizadas a diferentes frecuencias, en respuesta a un estímulo de tonos puros. En las gráficas de tonos puros se obtuvieron solamente los umbrales de audición para las diferentes frecuencias. Esto se hizo con una comparativa visual entre los trazos de diferentes decibeles a una sola frecuencia. Por ejemplo, en el *gráfico 3a* se compararon los trazos de 20 y 30 dB de la rata SD2_020417 a una frecuencia de 8000 Hz. Se busca encontrar el umbral de audición comparando las ondas y encontrando semejanzas entre éstas. En este caso el umbral se encontró a los 20 dB. En el *gráfico 3b* se juntaron todos los trazos (20-60 dB) y se puede observar cómo las ondas del trazo a 60 dB coinciden con las demás. Era necesario realizar la comparativa de trazos uno a uno en orden descendiente debido a que la diferencia de amplitudes podía afectar en la interpretación del umbral.

a)



b)

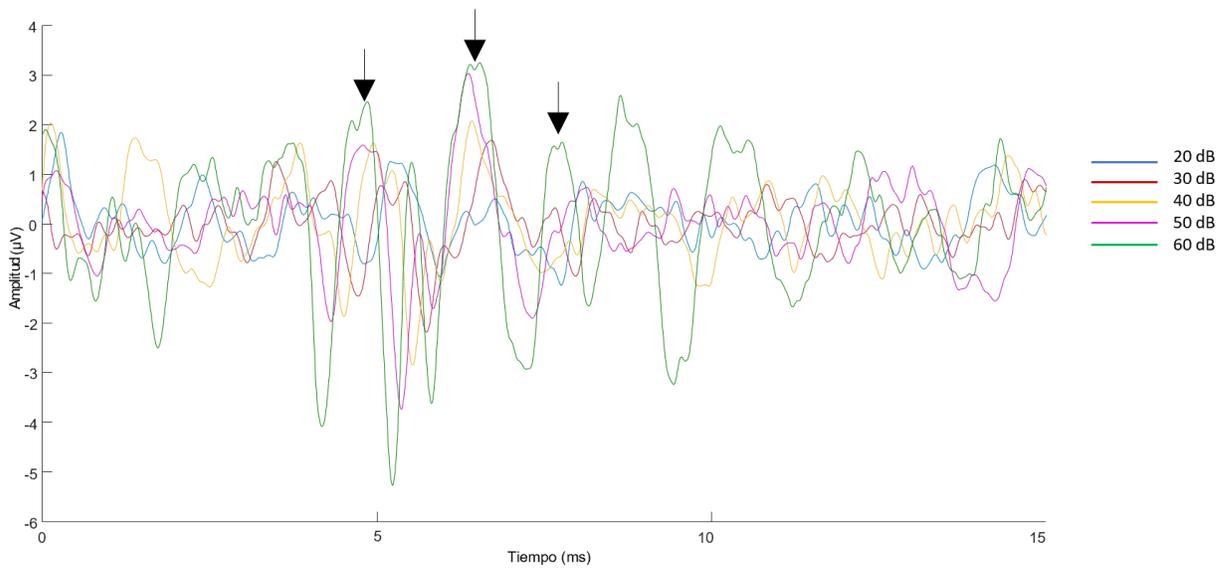


Gráfico 3. a) La gráfica muestra las ondas de 20 y 30 dB generadas a 8000 Hz por la prueba ABR-Tonos puros, realizada en la rata SD2_020417. El umbral de la rata se encuentra a los 20 dB, ya que se alcanzan a percibir ondas desde los 20 dB, cómo lo indican las flechas negras sobre los picos positivos. b) Muestra los trazos a diferentes decibeles, donde también se pueden apreciar las ondas. *Las gráficas se realizaron en función del tiempo (ms) contra amplitud (μV).

Una vez identificados los umbrales de audición, se realizaron los audiogramas correspondientes en los cuales, por conveniencia, se incluyeron los encontrados para los clicks.

III.2.2. DPOAE

Adquisición de datos DPOAEs

Al igual que en las calibraciones de DPOAE, los dos tweeters se pusieron en un sistema cerrado con el micrófono Shure dentro de un dispositivo de plástico que se introdujo dentro del canal auditivo externo de la rata anestesiada. La función del micrófono Shure fue recoger las emisiones otoacústicas.

Los tweeters se conectaron a las salidas CH1 y CH2 (positivo y negativo, respectivamente) del amplificador PXIe-4610 instalado en el chasis PXIe 1073 NI. El micrófono Shure se conectó por medio de un adaptador a la interfaz de sonido 'TRI CAPTURE' y ésta se conectó a la entrada AI0 del módulo de sonido PXI-4461. Por último, se conectaron con cables BNC, las dos entradas CH0 y CH1 del PXIe-4610 con las salidas AO0 y AO1 del PXI-4461, respectivamente.

La interfaz usada para las pruebas se muestra en la figura 21.

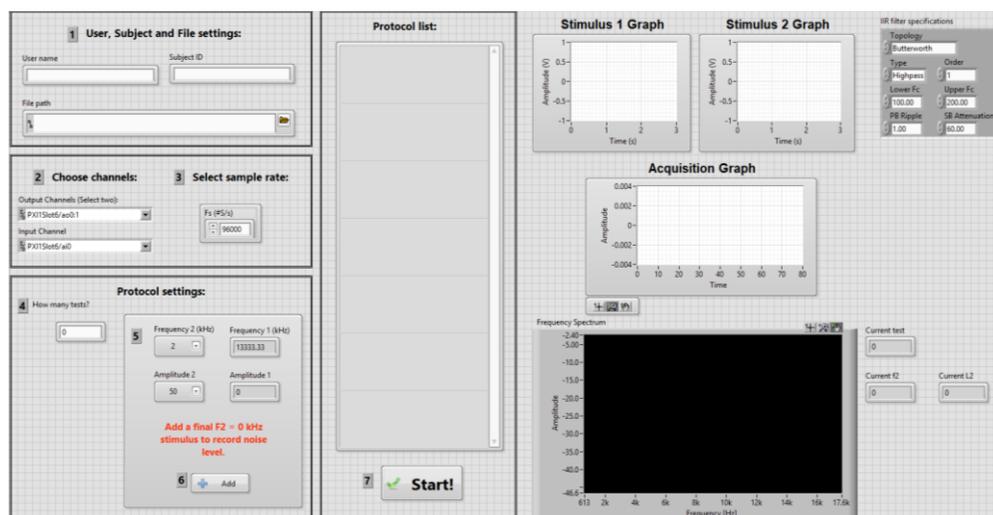


Figura 21. Interfaz para realizar pruebas DPOAE.

Los pasos a seguir para las pruebas DPOAE fueron los siguientes:

- 1) Primero se introdujo el nombre del operador, el nombre del sujeto al que se le realizarían las pruebas y la ubicación donde se guardarían los archivos de datos generados por el programa.
- 2) En 'Output channels' se seleccionaron dos canales de salida AO0 y AO1, por los dos tweeters. El canal de entrada fue AI0, proveniente de la interfaz de audio que estaba conectada al micrófono. La frecuencia de muestreo para todas las pruebas siempre fue 96000 muestras por segundo.
- 3) Después se introdujo el número de pruebas que se deseaban realizar y por último se seleccionaban las frecuencias y amplitudes con las que se deseaba estimular. Las frecuencias que con las que se trabajó fueron 3, 6, 8, 10 y 12 kHz para amplitudes de 50 y 60 dB. También siempre se realizaba una prueba sin frecuencia para medir solo el ruido.

En el programa solo se podía modificar la frecuencia y amplitud del segundo tono puro debido a que la frecuencia del otro tono está en función del segundo.

En la figura 21 también se observan cuatro gráficas. 'Stimulus 1 Graph' y 'Stimulus 2 Graph' corresponden a los dos tonos puros generados por los tweeters, la gráfica 'Acquisition Graph' muestra la señal obtenida en respuesta en tiempo real; aplicando un filtro Butterworth pasa altas de primer orden; y la gráfica 'Frequency Spectrum' muestra el espectro de frecuencias de las señales obtenidas.

Lo que realiza el programa de DPOAE, es generar dos tonos puros, en donde el usuario determina solo la frecuencia f_2 ya que la f_1 va en función de la f_2 .

$$f_2 = 1.2(f_1)$$

$$f_1 = \frac{f_2}{1.2}$$

Una vez generados los dos tonos puros se genera cómo respuesta el DPOAE, el cual es captado por el micrófono Shure en forma de diferencia de presión (Pa).

Análisis de datos DPOAE

Los datos obtenidos de las pruebas DPOAEs también se analizaron con un programa de Matlab llamado 'AnalizaDPOAE'.

En el programa se introduce el directorio donde están los archivos a analizar. El programa tiene la opción de grabar las gráficas si es deseado o no. Después realiza un listado de los archivos con extensión '.expinfo.dat' y los '.dat' presentes en el directorio.

Después para generar el nombre de las gráficas de las diferentes pruebas una función lee el contenido del archivo '.expinfo.dat' (como es la frecuencia de muestreo, la frecuencia uno, la amplitud de la frecuencia uno, la frecuencia dos y su amplitud; la frecuencia del DPOAE, la duración de la señal, la duración del estímulo la duración del retraso, entre otros) y los guarda en diferentes variables.

Otra función lee los archivos de datos de las pruebas

Se realizó una modificación en la sensibilidad del micrófono usado en las pruebas; cambiándola a 17 dB SPL, así que cómo los datos son presiones:

$$P = \frac{mV}{Sensibilidad_m}$$

$$mV = (P)(Sensibilidad_m)$$

Donde P es el valor de la presión (Pa) del archivo de datos y $Sensibilidad_m$ la sensibilidad del micrófono Shure configurada en 215; por esto se multiplicaron los datos por 215 dB SPL y se dividieron entre 17 dB SPL.

A la señal se le quita el primer segundo y después se genera un vector de frecuencias en Hertz (Hz) del archivo de datos de los experimentos, aplicándole la transformada rápida de Fourier. Como en este caso solo es importante obtener las frecuencias positivas se multiplica por dos la potencia, a excepción de la frecuencia cero.

Se calculan los Pascales RMS, multiplicando por la raíz de dos entre dos para después calcular los dB SPL siguiendo la fórmula:

$$dB\ SPL = 20 \log_{10} \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

Donde $P_0 = 20 \mu\text{Pa}$ (umbral auditivo) y P la presión captada por el micrófono, durante la prueba.

Después se grafica el espectro de los datos obtenidos, de frecuencias (Hz) contra dB SPL (Gráfico 4).

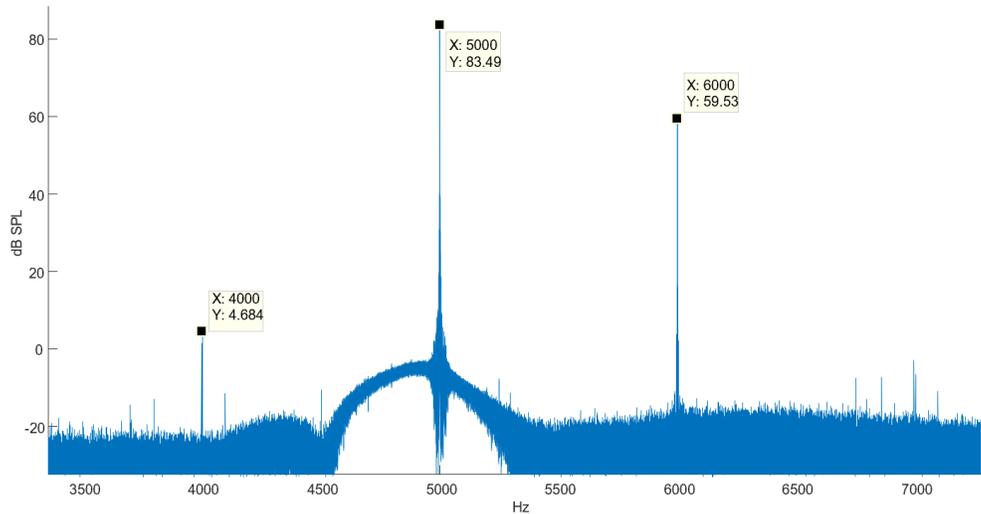


Gráfico 4. Espectro positivo de amplitud de la señal acústica de la rata Taipep-6_150417, donde $F_1=5000$ Hz, $A_1=83.49$ dB SPL, $F_2=6000$ Hz y $A_2= 60$ dB SPL. También muestra la amplitud del DPOAE a 4000 Hz de una amplitud de 4.684 dB SPL.

En el gráfico 4 se pueden observar los dos tonos con los que se estimuló la rata con dos tonos puros, uno con una frecuencia de 5000 Hz a 83.49 dB SPL de amplitud y otro de 6000 Hz a una amplitud de 59.53 dB SPL. El valor de la frecuencia del DPOAE teóricamente es la resta de dos veces la frecuencia uno menos la frecuencia dos ($(2*5000)-6000$), lo que nos da 4000 Hz, cómo se puede observar ese valor en la gráfica con una amplitud de 4.684 dB SPL.

Por último, el programa genera una tabla que permite identificar más fácilmente los valores de las DPOAEs para las diferentes frecuencias y amplitudes.

IV. Resultados

IV.1. ABR

Latencias ABR-Click

Para el caso de las pruebas ABR-click, se identificaron las latencias de los picos positivos de las ondas I-IV para comparar los promedios de latencias entre las ratas sanas con las taiep en pruebas realizadas a 20 dB arriba del umbral y a 70 dB.

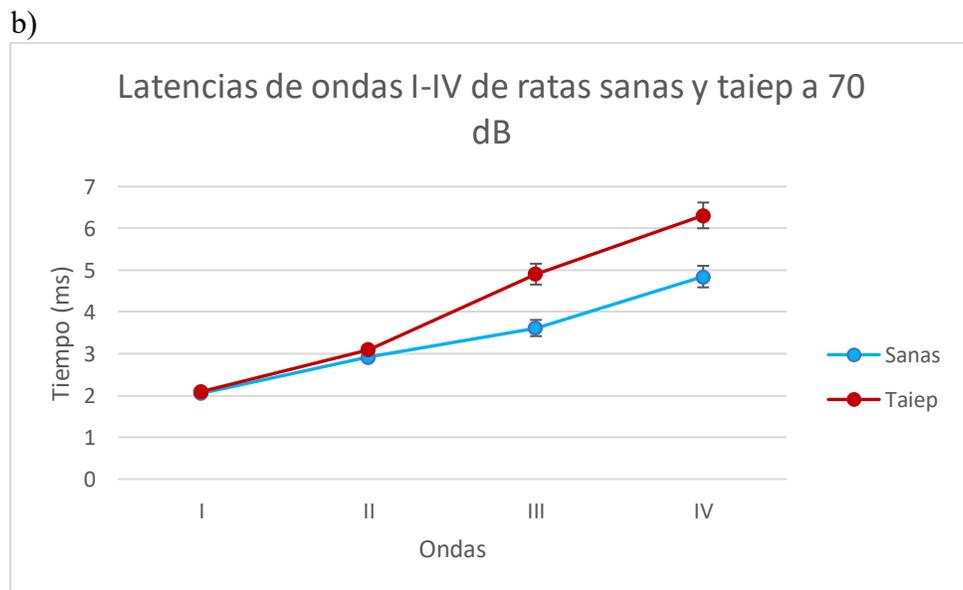
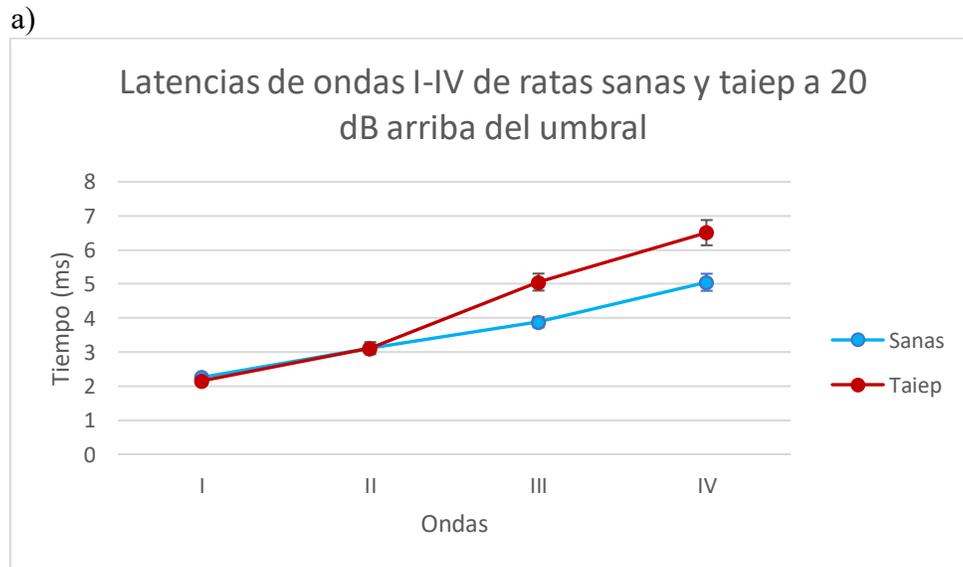


Gráfico 5 a) Gráfica de latencias de ratas sanas y taiep (media±SEM) para prueba ABR-click a 20 dB sobre del umbral detectado. b) Gráfica de promedio de latencias de ratas sanas y taiep pero para prueba ABR-click realizada a 70 dB.

Las ratas taiep presentan una latencia mayor en las ondas III y IV; es decir, tienen una respuesta más lenta ante un estímulo click (Gráfico 5a). Lo mismo ocurre a 70 dB, las ratas sanas presentan latencias menores en las ondas III y IV (Gráfico 5b).

Los estudios estadísticos se realizaron con el programa SPSS Statistics, versión 23 primero aplicando prueba de normalidad de Shapiro Wilk ya que el espacio muestral es menor a 50 y utilizando la prueba paramétrica de T-Student para pruebas normales o la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney para las pruebas donde no había normalidad. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

En la tabla 5 se muestran los promedios de las latencias de las ondas I -V con sus respectivos errores estándar de la media (SEM), para las ratas taiep y sanas.

*Tabla 5 Promedio de latencias para ratas sanas y taiep, con sus respectivos errores estándar de la media (SEM) para pruebas realizadas a 20 dB sobre el umbral y a 70 dB. '***' hace referencia a que si existen diferencias significativas y 'NDS' a que no existen diferencias significativas.*

	Onda	Sanas $\bar{X}_8 \pm SEM$	Enfermas $\bar{X}_5 \pm SEM$	T	U	P	Significancia
20 dB encima de umbral	I	2.26±0.067	2.16±0.04	1.138	-	0.28	NDS
	II	3.11±0.12	3.12±0.18	-0.048	-	0.96	NDS
	III	3.88±0.16	5.0±0.25	-4.24	-	0.001	***
	IV	5.05±0.25	6.50±0.37	-	3	0.027	***
70 dB	I	2.05±0.03	2.09±0.03	-1.036	-	0.322	NDS
	II	2.92±0.08	3.1±0.08	-	12.5	0.272	NDS
	III	3.62±0.19	4.9±0.25	-3.84	-	0.004	***
	IV	4.85±0.26	6.31±0.31	-	3	0.013	***

La onda I, II y III si presentaron normalidad lo que indica que la media de las latencias presenta una distribución normal. Por otro lado, la latencia de la onda IV no presentó una distribución normal.

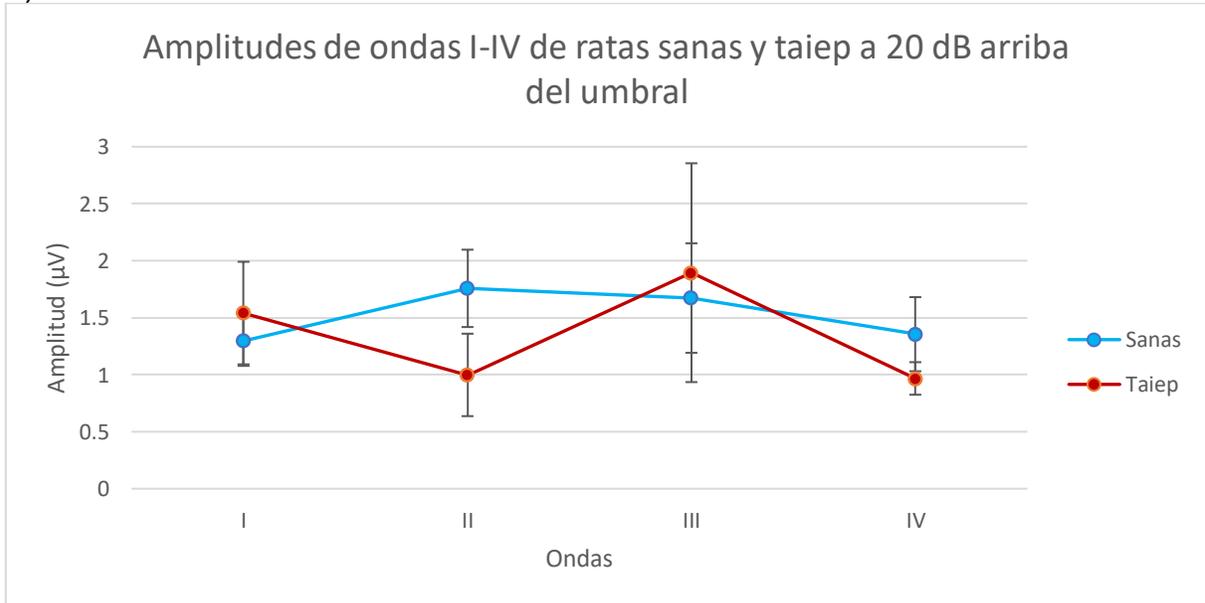
No se encontraron diferencias significativas en las latencias de las ondas I y II entre las ratas sanas y las taiep para las pruebas realizadas a 20 dB arriba del umbral; en cambio, en las ondas III y IV si se encontraron diferencias significativas.

Para las pruebas realizadas a 70 dB, no se encontraron diferencias significativas en las ondas I y II; pero en las ondas III y IV si se encontraron diferencias.

Amplitudes ABR-Click

La otra variable de interés a analizar en la prueba ABR-click fue la amplitud de las ondas. El gráfico 6 muestra el promedio de las amplitudes de cada una de las ondas para ratas sanas y taiep.

a)



b)

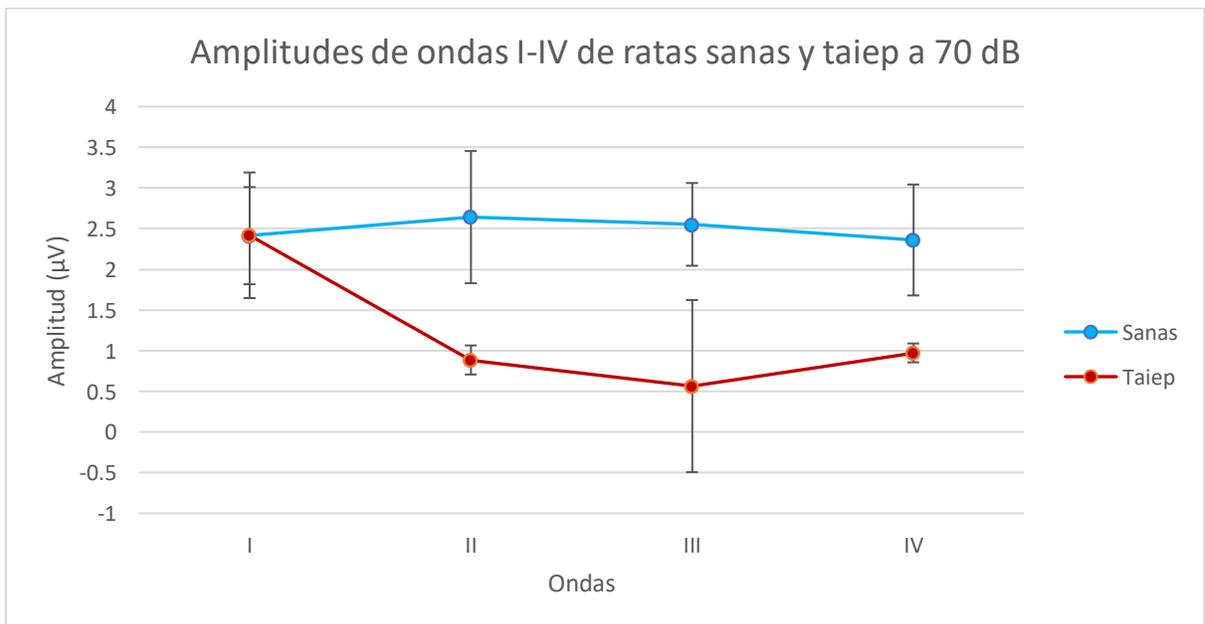


Gráfico 6 a) Promedio de amplitudes de las ondas I-V para ratas sanas y taiep a una intensidad de 20 dB arriba del umbral. b) Promedio de amplitudes a 70 dB arriba del umbral

Las pruebas realizadas a 20 dB arriba del umbral muestran en las gráficas una mayor amplitud en las ondas II y IV para las ratas sanas, pero las ratas taiep presentan una amplitud mayor en las ondas I, III y IV. Las pruebas a 70 dB muestran que las ratas sanas tienen una mayor amplitud en las ondas II, III y IV; las amplitudes de las ondas I y V son mayores en las ratas taiep. Al igual que en las latencias, se realizaron pruebas de normalidad y después pruebas paramétricas o no paramétricas para encontrar si hay diferencias significativas entre las amplitudes de las ratas sanas y las taiep (Tabla 6).

Tabla 6 Promedio de latencias para ratas sanas y taiep, con sus respectivos errores estándar de la media para pruebas realizadas a 20 dB arriba del umbral y a 70 dB.

	Onda	Sanas $\bar{X}_8 \pm SEM$	Enfermas $\bar{X}_5 \pm SEM$	T	U	P	Significancia
20 dB encima del umbral	I	1.30±0.22	1.54±0.45	-0.547	-	0.596	NDS
	II	1.76±0.34	0.998±0.36	1.464	-	0.171	NDS
	III	1.67±0.48	1.89±0.96	-	19	0.88	NDS
	IV	1.35±0.33	0.97±0.14	0.8	3	0.442	NDS
70 dB	I	2.41±0.6	2.41±0.77	-	19	0.884	NDS
	II	2.64±0.81	0.89±0.18	-	5	0.028	***
	III	2.55±0.51	0.56±1.06	-	8	0.201	NDS
	IV	2.36±0.68	0.97±0.12	1.57	-	0.15	NDS

Utilizando el mismo valor de significancia de $p < 0.05$; no se encontraron diferencias significativas en las ondas I, II, III y IV en las pruebas realizadas a 20 dB por encima del umbral.

En las pruebas realizadas a 70 dB, no se encontraron diferencias significativas para las ondas I, III y IV; por lo que las amplitudes se consideran no diferentes entre ratas sanas y taiep. La onda II si presentó diferencias significativas.

Umbrales auditivos

La tercera variable por analizar fue los umbrales auditivos detectados ante un estímulo click y tonos puros (Gráfico 7).

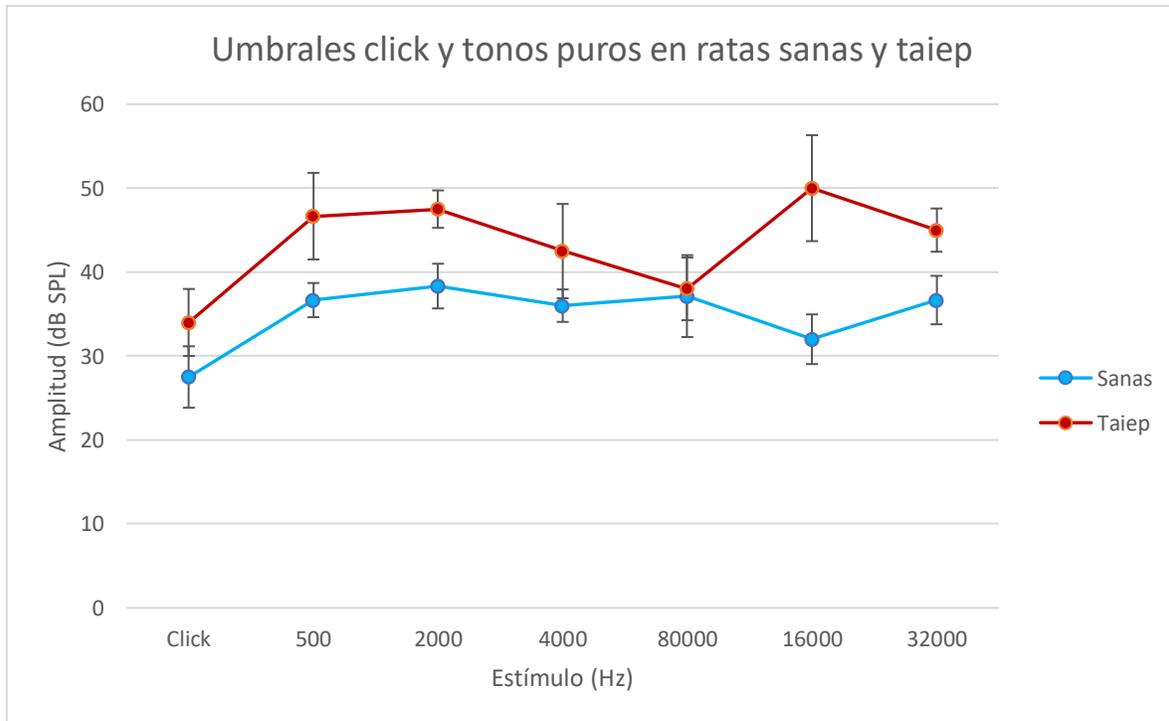


Gráfico 7 Promedio de umbrales auditivos para ratas sanas y taiep; ante estímulo click y diferentes tonos puros.

Las ratas sanas presentan amplitudes de umbrales menores que las taiep ante los diferentes estímulos. Esto es de esperarse ya que las sanas tienen más agudeza auditiva, por lo tanto, el umbral se presenta en niveles más bajos.

También se hicieron pruebas estadísticas para encontrar diferencias significativas para los diferentes estímulos.

Tabla 7 Promedio de umbrales de ratas taiep y sanas para diferentes estímulos con sus errores estándar de la media (SEM).

Estímulo	$\bar{X}_8 \pm SEM$	$\bar{X}_5 \pm SEM$	T	U	P	Significancia
CLICK	27.5±3.66	34±3.99		13	0.25	NDS
PT500	36.67±2.04	46.67±5.16		2	0.2	NDS
PT2000	38.33±2.66	39.54±2.23		4	0.07	NDS
PT4000	36±1.93	42.5±5.62		7	0.41	NDS
PT8000	37.14±4.88	38±3.74	-0.12		0.91	NDS
PT16000	32±2.96	50±6.31	-2.39		0.048	***
PT32000	36.67±2.89	45±2.58		5	0.11	NDS

Según los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas, la comparación entre las ratas no presenta diferencias significativas en el estímulo click ni en los tonos

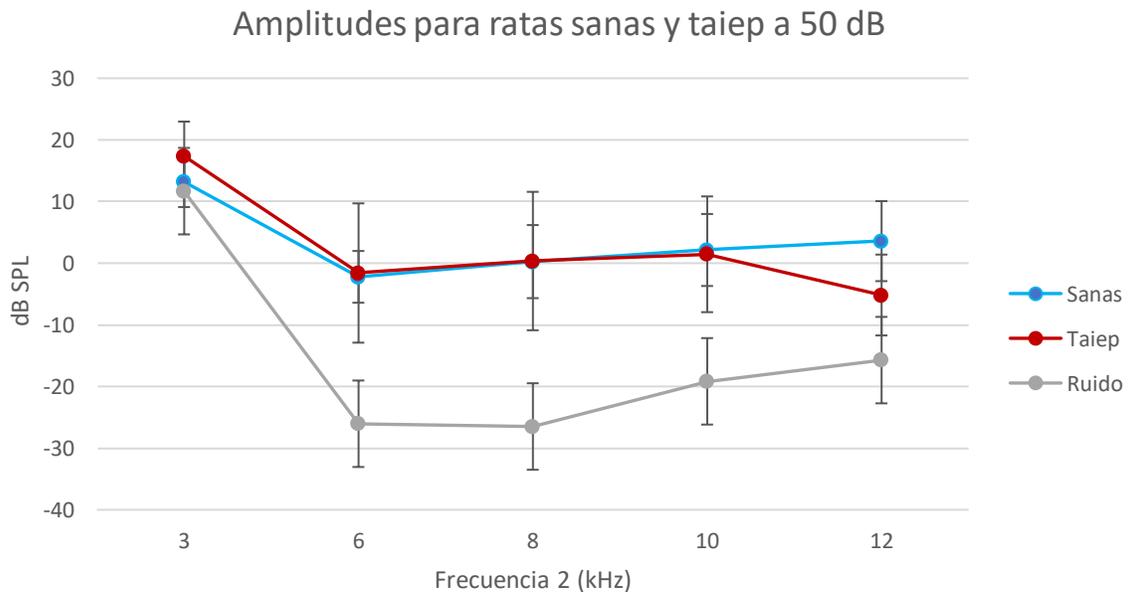
puros con frecuencias de 500, 2k, 4k, 8k y 32 k (Hz), lo que indica que las medias de los umbrales de ratas sanas no se consideran diferentes a las de las taiep. Solo se encontraron diferencias significativas en el tono puro a 16 kHz.

IV.2. DPOAEs

Amplitudes DPOAEs

Para las pruebas de DPOAEs se midió la amplitud (dB SPL) de las emisiones otoacústicas para diferentes frecuencias de f_2 a una amplitud de 50 y 60 dB. Estas amplitudes se promediaron, tanto para las ratas sanas como para las enfermas, para después realizar los DP-gramas (Gráfico 8).

a)



b)

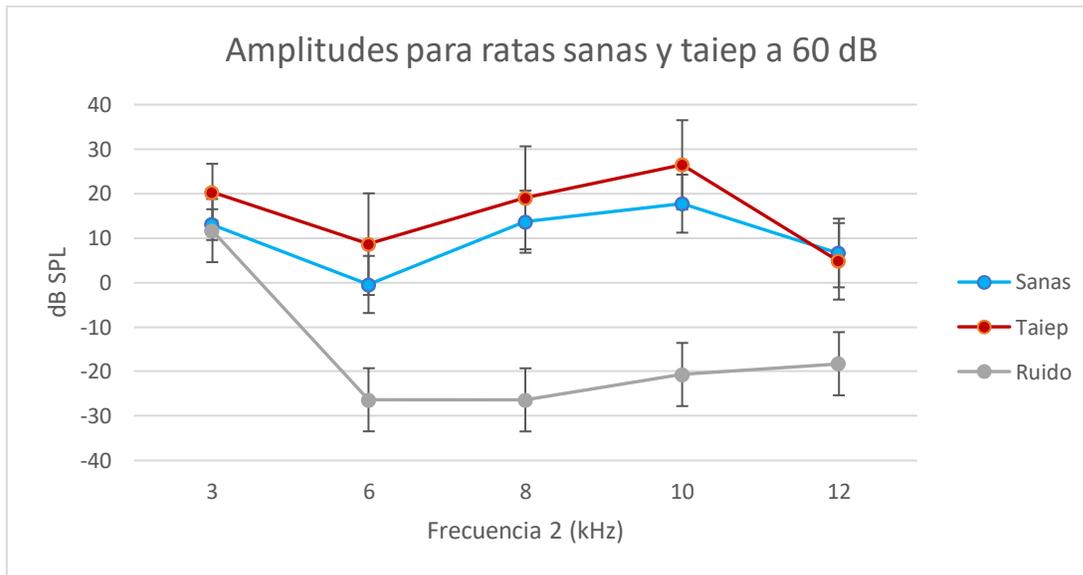


Gráfico 8 a) DP-grama de ratas sanas y enfermas para estímulo de 50 dB. b) DP-grama de ratas sanas y enfermas para estímulo de 60 dB. Ambas muestran el ruido promedio.

El promedio de las amplitudes de DPOAEs para diferentes valores de F_2 de las ratas sanas (azul) a una amplitud de 50 dB en el gráfico 8a no varía mucho en comparación con el de las taiep. En el gráfico 8b las taiep no presentan una gran diferencia de amplitud en las emisiones otoacústicas. El trazo gris muestra el ruido base.

Se realizaron pruebas de normalidad a los dos grupos y después pruebas paramétricas o no paramétricas según sea el caso para encontrar diferencias significativas (Tabla 8).

Tabla 8 Promedio de amplitudes de DPOAEs de ratas sanas y taiep con sus respectivos valores de significancia a una amplitud a_1 de 50 dB

F_2 (kHz)	Sanas $\bar{X}_8 \pm SEM$	Enfermas $\bar{X}_5 \pm SEM$	T	U	P	Significancia
3	13.19±4.08	17.37±5.59	-	15	0.46	NDS
6	-2.22±4.2	-1.6±11.3	0.54	-	0.603	NDS
8	0.25±5.93	0.34±11.23	-	15	0.46	NDS
10	2.14±5.84	1.44±9.39	-	15	0.46	NDS
12	3.58±6.49	-5.17±6.56	1.48	-	0.17	NDS

En la tabla 8 se observa que ninguna de las amplitudes del DPOAE para las diferentes frecuencias F_2 existen diferencias significativas entre las ratas sanas y las taiep. La presencia de valores negativos en las amplitudes significa que el DPOAE está presente, pero éste es anormal.

En las pruebas realizadas a 60 dB no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las frecuencias (Tabla 9).

Tabla 9 Promedio de amplitudes de DPOAEs de ratas sanas y taiep con sus respectivos valores de significancia a una amplitud a_1 de 60 dB.

F_2 (kHz)	Sanas $\bar{X}_8 \pm SEM$	Enfermas $\bar{X}_5 \pm SEM$	T	U	P	Significancia
3	13.02±3.46	20.44±6.38	-1.11	-	0.29	NDS
6	-0.44±6.42	8.63±11.43	0.019	-	0.96	NDS
8	13.67±6.98	19.04±11.57	0.55	-	0.6	NDS
10	17.73±6.53	26.48±10.01	0.19	-	0.85	NDS
12	6.64±7.72	4.77±8.6	-	20	1	NDS

V. Discusión de resultados

Latencias ABR-click

En las ondas III y IV si se encontraron diferencias significativas entre las ratas sanas y las taiep, esto se puede explicar debido a que las taiep presentan una disfunción en la región ipsilateral del núcleo coclear que es donde se origina la onda III y en los núcleos olivares donde se origina la onda IV. Una de las funciones del núcleo coclear es analizar el momento de inicio de un estímulo, por lo que, si la rata presenta una desmielinización, puede que la señal no esté llegando adecuadamente, ocasionando que las ratas taiep tengan una recepción más tardía ante la presencia de un estímulo click, afectando las latencias. Otras de las funciones de los núcleos cocleares son decodificar la intensidad de un sonido, analizan si la duración de un sonido si es corto o largo, el momento final de un estímulo y mantienen o transmiten el análisis frecuencial realizado por el receptor periférico. La falta de mielina en las neuronas que conforman los núcleos cocleares puede afectar en las funciones anteriores también influyendo a su vez en las

latencias de las ratas taiep. Una de las funciones del complejo olivar superior es la detección de diferencias de intensidad del sonido en ambos oídos obteniendo una localización espacial del origen del sonido y debido a la ausencia de mielina en las neuronas de esta área puede que las ratas taiep presenten problemas para poder detectar el origen del estímulo proveniente de la bocina, retrasando su tiempo de respuesta.

En las pruebas realizadas a 70 dB, en las ondas III y IV si se encontraron diferencias significativas entre las ratas sanas y taiep, por lo que se concluye lo mismo que las pruebas a 20 dB arriba del umbral.

Amplitudes ABR-Click

La razón por la que no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las ondas (I-IV) a 20 dB sobre el umbral, puede ser porque la desmielinización que presentan las ratas taiep no afecta directamente en las amplitudes de las ondas, al menos en esa intensidad del estímulo.

En las pruebas realizadas a 70 dB, no se encontraron diferencias significativas para las ondas I, III y IV; pero la onda II si presentó diferencias significativas, por lo que la rata taiep puede presentar un daño en la zona central del nervio auditivo en la región de la entrada al tronco cerebral que es donde se origina esta onda. Este daño se puede explicar debido a la falta de mielina en el nervio auditivo provocando una estimulación menor en las taiep ante la presencia de un estímulo.

Umbrales auditivos

Solo se encontraron diferencias significativas en el tono puro a 16 kHz, donde las ratas taiep tienen un umbral de audición menor que las sanas. Existe una mejor respuesta auditiva en las ratas entre las frecuencias de 12-24 kHz y al presentar un umbral menor en esa frecuencia, se puede decir que la desmielinización de las neuronas del SNC afecta la percepción del estímulo y así su agudeza auditiva.

Amplitudes DPOAEs

El hecho de no encontrar diferencias significativas en ninguna de las amplitudes de las DPOAEs para las diferentes F_2 entre ratas sanas y taiep con una a_1 de 50 y 60 dB, se explica porque las emisiones otoacústicas se originan dentro de la cóclea y no en el nervio o vía auditiva, que es donde las ratas taiep pueden presentar una anomalía, debido a su desmielinización en el sistema nervioso central.

VI. Conclusiones

Para las pruebas ABR, las ratas taiep presentaron latencias mayores en las ondas III y IV en comparación de las sanas. También las taiep presentaron una amplitud menor en la onda II ante un estímulo de 70 dB. A su vez, las ratas taiep mostraron un umbral de audición menor que las sanas en la frecuencia de 16 kHz, dentro del rango donde existe una mejor respuesta auditiva.

La enfermedad neurodegenerativa desmielinizante en el SNC que sufren los mutantes taiep, puede afectar la vía auditiva provocando una mala recepción del estímulo, una mala respuesta ante este y una agudeza auditiva menor. Se realizaron las pruebas de ABR y DPOAE para tener una visión completa de la audición de las ratas taiep (la vía auditiva y la región coclear). No se encontró afección alguna en las DPOAEs de las ratas taiep, ya que esta se presenta en el SNC y no en la cóclea. De igual forma se trató de encontrar alguna relación con las pruebas ABR pero no se encontró algún resultado concluyente.

Para futuros experimentos se recomienda utilizar un tamaño muestral más grande y realizar el estudio por edades, debido a que las ratas taiep presenta una progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo.

El estudio de la audición en estos mutantes puede servir en un futuro como base para la investigación en humanos ya que estudios recientes han demostrado que las ratas taiep presentan una mutación en el gen de la tubulina $\beta 4A$, el mismo gen afectado en la tubulopatía humana.

Bibliografía

1. Tortora J. Gerard, Bryan Derrickson. (2013). "Sentidos especiales." pp. 657-666. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 13.^a ed. México, D.F.: Medica Panamericana.
2. Abadi S, Khanbabaee G, Sheibani K. (2016). *Auditory Brainstem Response Wave Amplitude Characteristics as a Diagnostic Tool in Children with Speech Delay with Unknown Causes*. 41(5):415–21. Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Abdala C, Oba SI, Ramanathan R. (2008). "Changes in the DP-Gram During the Preterm and Early Postnatal Period." *Ear Hear*. 29(4):512–23.
4. Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A.J.Hudspeth. (2012). *Principles of Neural Science*. 5.^a ed. McGraw-Hill. 1760 p.
5. Guyton C. Arthur. *Fisiología Humana*. 6.^a ed. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; 704 p.
6. NC Hearing Loss. "Sound Pressure Level". Consulta del 14 de enero de 2019 (<http://www.nchearingloss.org/spl.htm?fromncshhh>)
7. SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). "Scientific opinion on the Potential health risks of exposure to noise from personal music players and mobile phones including a music playing function." 23 de Septiembre 2008 (http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_018.pdf)
8. Poblano, A. (2003). *Temas Básicos de Audiología*. Aspectos Médicos: Trillas
9. ScienceDirect. (2010). "Auditory Brainstem Response". International Review of Research in Mental Retardation. Consulta del 25 de febrero de 2019 (<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/auditory-brainstemresponse>).
10. Lambell D. (2013). "The Auditory Brainstem Response: History and Future in Medicine." Baylor University. Waco, Texas. (<https://baylor-ir.tdl.org/baylor->

ir/bitstream/handle/2104/8669/devyn_lambell_honorsthesis.pdf;sequence=1

)

11. Olds C., Oghalai S. John. (2015). "Audiologic impairment associated with bilirubin-induced neurologic damage." Stanford University. Stanford, CA. (<https://pharmaceuticalintelligence.com/2015/02/22/neonatalpathophysiology/>)
12. Abdala C, Visser-Dumont L. (2001). "Distortion Product Otoacoustic Emissions: A Tool for Hearing Assessment and Scientific Study." House Ear Institute in Los Angeles, CA. 103(4):281–302. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614374/>)
13. Lewis J. y Moss B. (2012). "Understanding Microphone Sensitivity." Penn State University. (<https://www.analog.com/media/en/analogdialogue/volume-47/number-4/articles/mems-microphones-future-for-hearing-aids.pdf>)
14. Kandel R. Eric, Schwartz H. James, Jessell M. Thomas. (1995). *Essentials of Neural Science and Behavior* : Appleton & Lange.
15. Rodriguez S. Guadalupe, Barrios A. Juan, Fong M. Daniel. (2015). "Analysis of Chemokines and Receptors Expression Profile in the Myelin Mutant Taiep Rat." Working Paper ID 397310: Hindawi.
16. Eguibar R. José y Cortés Ma. Del Carmen. (2010). "El mutante de mielina taiep como un modelo de crisis de ausencia." Secretaría General de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: Puebla, México. (<https://www.anmm.org.mx/bgmm/2010/1/2010-146-1-11-18.pdf>)
17. Ashizawa T. y Xia G. (2016). "Ataxia." 22(4 Movement Disorders):1208–26. American Academy of Neurology. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5567218/>)
18. Hall W. James. (2013). *Introduction to Audiology Today*: Pearson Education (US).
19. Chertoff M. (2010). "Click- and chirp-evoked human compound action potentials." ID 21117748. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3188627/>)

20. Meneses Arévalo, Alexis & Toloza Cano, Daissy. (2012). Estudio de los protocolos de frecuencias e intensidades para la realización de exámenes en audiología. 10.13140/RG.2.1.2471.9761. (https://www.researchgate.net/publication/301561824_Estudio_de_los_protocolos_de_frecuencias_e_intensidades_para_la_realizacion_de_examenes_en_audiologia)
21. Jaramillo M. Ana. (2007). *Acústica: la ciencia del sonido*. ITM.
22. PNGFLY. "Cat Mouse Rat Rodent Clip art." (<https://www.pngfly.com/png-46/>)
23. Texas Instruments. (2000). "INA118 Precision, Low-Power Instrumentation Amplifier." Consulta del 2 de enero del 2019. (<http://www.ti.com/lit/ds/symlink/ina118.pdf>)



Asunto: aprobación de trabajo de tesis
León, Gto., a 13 de junio de 2019

DR. DAVID DELEPINE
DIRECTOR DE LA
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

En mi carácter de asesor del trabajo de tesis de licenciatura presentado por la alumna **Mariana Escobedo Torres**, para optar por el grado de licenciado en Ingeniería Biomédica con el trabajo titulado:

“Estudio de la función auditiva en un modelo animal de enfermedad neurodegenerativa desmielinizante”

me permito comunicarle que después de haber revisado y discutido el manuscrito, considero que dicha tesis reúne los requisitos y méritos suficientes para poder continuar con sus trámites de solicitud de examen de grado.

Agradezco mucho su atención y aprovecho para enviarle un saludo cordial.

ATENTAMENTE
“LA VERDAD OS HARÁ LIBRES”

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "V. H. Hernández".

DR. VÍCTOR HUGO HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
PROFESOR INVESTIGADOR



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS LEÓN

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS

León, Gto., 10 de junio 2019

Asunto: Aprobación de tesis de licenciatura

Dr. David Ghislain Delepine
Director de la División de Ciencias e Ingenierías
Universidad de Guanajuato

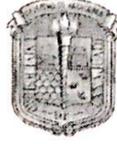
Por medio de la presente me permito informar que he revisado el trabajo titulado **“Estudio de la función auditiva en un modelo animal de enfermedad neurodegenerativa desmielinizante”** que para obtener el grado de **“Licenciatura en Ingeniería Biomédica”** presenta la **C. Mariana Escobedo Torres**.

Considero que el trabajo es de gran relevancia y con la calidad suficiente para que la **C. Mariana** obtenga al grado, por lo tanto, no tengo inconveniente en que se realicen los trámites necesarios para su presentación ante el comité.

Agradezco de antemano su atención y quedo a sus órdenes para atender cualquier duda o aclaración.

Saludos cordiales,

Dr. Gustavo Basurto Islas
Profesor Investigador
Departamento de Ingenierías Química,
Electrónica y Biomédica
División de Ciencias e Ingenierías
Universidad de Guanajuato Campus León



León, Guanajuato, a 6 de junio de 2019

Dr. David Yves Ghislain Delepine
Director División de Ciencias e Ingenierías
Campus León

PRESENTE:

Por medio de este documento hago constar que una vez revisado el trabajo de Tesis titulado: *“Estudio de la función auditiva en un modelo animal de enfermedad neurodegenerativa desmielinizante”* que presenta la **C. Mariana Escobedo Torres** para obtener el Título de **Licenciada en Ingeniería Biomédica**, lo encuentro satisfactorio y considero que cumple con los criterios de originalidad y calidad que exige nuestra institución, por lo que avalo se realice la defensa pública de esta tesis, para obtener el título mencionado.

Atentamente

“La verdad os hará libres”

Una firma manuscrita en tinta azul que parece ser la del Dr. Carlos Villaseñor Mora.

Dr. Carlos Villaseñor Mora

Profesor – Investigador Titular A

Departamento de ingeniería Química, electrónica y Biomédica
Loma del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre
C.P. 37150 León, Gto., México
vimcarlos@ugto.mx, Tel.
www.ugto.mx/campusleon



León, Gto, a 13 de junio de 2019
Asunto: Carta de Conformidad

Dr. David Yves Ghislain Delepine
Director de la División de Ciencias e Ingenierías
Campus León, Universidad de Guanajuato

Estimado Dr. Delepine:

Por medio de la presente informo a usted que he leído el manuscrito de tesis de la estudiante de Ingeniería Biomédica de la DCI, C. Mariana Escobedo Torres, la cual lleva por título "**Estudio de la función auditiva en un modelo animal de enfermedad neurodegenerativa desmielinizante**".

Después de haber realizado mis comentarios, la estudiante realizó las correcciones pertinentes. Por lo anterior doy mi consentimiento para que la **C. Mariana Escobedo Torres** defienda de manera oral su tesis de licenciatura en la fecha que sus directores de tesis juzguen conveniente.

Sin más por el momento, y agradeciendo la atención a la presente, me despido enviando un cordial saludo

Atentamente

Dr. Luis Carlos Padierna García
Profesor-Investigador

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍAS QUÍMICA, ELECTRÓNICA Y BIOMÉDICA
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
Loma del Bosque #103, Col. Lomas del Campestre. León, Gto. C.P. 37150
Tel. +52 (477) 7 88 51 00 ext. 8522
lc.padierna@ugto.mx
www.dci.ugto.mx/depingquim



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Campus León
División de Ciencias e Ingenierías

Oficio número: AGV-06-001

Asunto: Carta conformidad

Tesis de Licenciatura en Ingeniería Biomédica de la estudiante Mariana Escobedo Torres.

León Gto., junio 13, 2019.

DR. DAVID YVES GHISLAIN DELEPINE
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
CAMPUS LEÓN
PRESENTE

Estimado Dr. Delepine:

Sirva la presente para hacer de su conocimiento que he revisado el trabajo titulado **“Estudio de la función auditiva en un modelo animal de enfermedad neurodegenerativa desmielinizante”** que para obtener el grado de Licenciado en Ingeniería Biomédica pone a consideración la **C. Mariana Escobedo Torres**.

Le comunico que en mi opinión el trabajo reúne las características de nivel y calidad suficientes para una tesis de licenciatura. Asimismo, he discutido con la **C. Escobedo** algunos aspectos de su trabajo y le he indicado las correcciones que considero pertinentes, las cuales ha incluido en la versión final del trabajo. De esta manera no tengo objeciones para la presentación del mismo de acuerdo a la reglamentación respectiva.

Agradeciendo la atención prestada a la presente, me despido

ATENTAMENTE.
“LA VERDAD OS HARÁ LIBRES”

Dr. Arturo González Vega
Profesor del DIQEB

C.c.p Mariana Escobedo Torres
C.c.p. Archivo AGV.

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍAS QUÍMICA, ELECTRÓNICA Y BIOMÉDICA

Lomas del Bosque #103.

Lomas de Campestre, León Gto.

C.P. 37150

(477) 788 5100 Ext. 8435, Fax. Ext. 8410

www.diqeb.ugto.mx



León, Gto. a 11 de Junio del 2019

Asunto: Carta aval de sinodal

Dr. David Yves Ghislain Delepine
Director de la División de Ciencias e Ingenierías
Campus León
Universidad de Guanajuato

Respetable Dr. Delepine:

Por medio de la presente, hago constar que una vez revisado el trabajo de Tesis denominado: **“Estudio de la función auditiva en un modelo animal de enfermedad neurodegenerativa desmielinizante.”**, que presenta la **C. Mariana Escobedo Torres**, para obtener el Título de **Licenciada en Ingeniería Biomédica**, lo encuentro satisfactorio y considero que cumple con los criterios de originalidad y calidad que exige nuestra institución, por lo que avalo se realice la defensa pública de esta tesis, para obtener el título anteriormente mencionado. Sin más por el momento agradezco su atención y tiempo.

Atentamente
“La verdad os hará libres”

Dra. Silvia Alejandra López Juárez
Profesor tiempo completo
Sinodal

División de Ciencias e Ingenierías
Loma del Bosque 103, Lomas del Campestre, León, Gto. C.P 34150
Tel. 477 788 51 00
www.ugto.mx