



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA (B11.56.1)

**Caracterización fenotípica de pacientes
con acúfeno severo y generación de un
modelo celular con variantes raras en el
gen *ANK2***

Autor: JUAN MARTIN-LAGOS MARTINEZ

Directores: JOSÉ ANTONIO LÓPEZ ESCÁMEZ & LIDIA FREJO NAVARRO

GRANADA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Juan Martín –Lagos Martínez
ISBN: 978-84-1195-705-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/102609>

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL OÍDO INTERNO	14
1.1.1. Cóclea	14
1.1.2. Órgano de Corti.....	15
1.1.3. Anatomía general de la vía auditiva	17
1.1.4. El sistema nervioso central auditivo	19
1.2. ACÚFENO	24
1.2.1. Definición y epidemiología.....	24
1.2.2. Fisiopatología	25
1.2.3. Acúfeno y audición normal.....	27
1.2.4. Trastornos asociados al acúfeno	28
1.3. BASES GENÉTICAS DE LOS ACÚFENOS	32
1.3.1. Gen <i>ANK2</i>	33
1.4. GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES.....	35
1.4.1. Definición y características de las hPSC	36
1.4.2. iPSC	39
1.4.3. Aplicaciones potenciales de las hPSC	42
1.4.4. Aspectos éticos relacionados con la investigación de hPSC.....	45
1.5. RESPUESTAS EVOCADAS AUDITIVAS	47
1.5.1. Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral (PEATC).....	51
1.5.2. Potenciales Evocados Auditivos de latencia media (PEALM)	55
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	60
2.1. HIPÓTESIS	60
2.2. OBJETIVOS	60
2.2.1. Objetivo principal	60
2.2.2. Objetivos específicos	60

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
3.1. COMITÉ DE ÉTICA.....	62
3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	62
3.2.1. Criterios de inclusión	63
3.2.2. Criterios de exclusión.....	63
3.3. CARACTERIZACIÓN PSICOACÚSTICA	63
3.3.1. Audiometría Tonal Liminar (125-8000 Hz) y alta frecuencia (9000-20.000 Hz).....	63
3.3.2. Acufenometría	64
3.4. CARACTERIZACIÓN PSICOMÉTRICA	65
3.4.1. Cuestionarios de calidad de vida.....	66
3.4.2. Cuestionarios de ansiedad y depresión.....	68
3.4.3. Herramienta de evaluación de deterioro cognitivo	69
3.5. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO	70
3.5.1. Metodología para el registro de las REA	70
3.4.1.1 Entorno	70
3.4.1.2 Electrodo	70
3.4.2 Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral	71
3.4.3 Potenciales Evocados Auditivos de Latencia Media	72
3.6. DERIVACIÓN CELULAR Y CULTIVO	72
3.6.1. Diferenciación de iPSCs en neuronas del oído interno	73
3.6.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	75
3.6.3. Tinción de inmunofluorescencia	75
3.6.4. Análisis Western Blot.....	76
4. RESULTADOS.....	78
4.1. DATOS DEMOGRÁFICOS	78
4.2. EVALUACIÓN PSICOACÚSTICA	78
4.3. EVALUACIÓN PSICOMÉTRICA	82
4.4. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA	83
4.4.1. Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral	83
4.4.2. Potenciales Evocados Auditivos de Latencia Media	86

4.5. GENERACIÓN DEL MODELO CELULAR	87
4.5.1. Selección de pacientes y caracterización audiológica.....	87
4.5.2. Caracterización de la línea celular ANK2-24	90
4.5.3. Generación de neuronas del oído interno a partir de la línea celular ANK2-2492	
5. DISCUSIÓN	98
5.1. ALTERACIONES EN CALIDAD DE VIDA.....	98
5.2. DEPRESIÓN Y ANSIEDAD	99
5.3. HIPERACUSIA.....	100
5.4. DETERIORO COGNITIVO.....	101
5.5. RESPUESTAS EVOCADAS.....	102
5.6. MODELO CELULAR.....	104
6. CONCLUSIONES	110
7. BIBLIOGRAFIA	112
8. ANEXOS	128

ABREVIATURAS

BNLC	Banco Nacional de Líneas Celulares
dBHL	<i>del inglés, Decibel Hearing Level</i> , nivel de audición en decibelios
dB SPL	<i>del inglés, Decibel Sound Pressure Level</i> , nivel de presión sonora en decibelios
EBS	<i>del inglés, Embryoid Bodies</i> , Cuerpo embrionarios
ECOG	Electrococleografía
EEG	Electroencefalograma
EM	Enfermedad de Meniere
EVA	Escala Visual Analógica
FDA	<i>del inglés, Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>del inglés, Fluorescence In Situ hybridization</i> , Hibridación in situ con fluorescencia
HADS	Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión
hESC	<i>del inglés, human Embryonic Stem Cells</i> , Células Madre Embrionarias Humanas
hPSC	<i>del inglés, human Pluripotent Stem Cells</i> , Células Madre Pluripotentes Humanas
iPSC	<i>del inglés, human induced Pluripotent Stem Cells</i> , Células Madre Pluripotentes Inducidas Humanas
IR	Inhibición Residual
ISSCR	<i>del inglés, The International Society for Stem Cell Research</i> , Sociedad Internacional para la Investigación de Células Madre
KΩ	KiloOhmnios
MML	<i>del inglés, Minimum Mask Level</i> , Mínimo Nivel de Enmascaramiento
MoCA	Evaluación Cognitiva de Montreal
MPA	Músculo Postauricular
Mseg	Milisegundos

NBN	<i>del inglés, Narrow Band Noise</i> , Ruido de Banda Estrecha
NCD	Núcleo Coclear Dorsal
NCV	Núcleo Coclear Ventral
NOI	Neuronas de Oído Interno
PA	Potencial de Acción del nervio auditivo
PBMC	<i>Del inglés, Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> , Células Mononucleares de Sangre Periférica
PEALM	Potenciales Evocados Auditivos de Latencia Media
PEATC	Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral
PHQ-9	Cuestionario de Salud del Paciente
PON	Progenitores Óticos Neurales
PS	Potencial de Sumación coclear
PTA	<i>del inglés Pure Tone Average</i> , Media de Tonos Puros
REA	Respuestas Evocadas Auditivas
RN	Recién Nacido
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa
Seg	Segundos
SeV	Virus Sendai
SIA	Segmento Inicial del Axón
SKY	<i>del inglés Spectral Karyotype</i> , Cariotipo Espectral
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	<i>del inglés, Single Nucleotide Polimorfism</i> , Polimorfismo de Nucleótido Único
SSPA	Sistema Sanitario Público de Andalucía
TEA	Trastorno del Espectro Autista
TF	<i>del inglés, Transcription Factors</i> , Factores de Transcripción

THI	del inglés Tinnitus Handicap Inventory, cuestionario de discapacidad del acúfeno
THS–GÜF	Test de Hipersensibilidad al Sonido
WN	<i>Del inglés White Noise</i> , Ruido Blanco
μV	Microvoltios

RESUMEN

Introducción: El acúfeno es la percepción de ruido en ausencia de una estimulación acústica externa. Afecta a más del 15% de la población adulta, aunque hasta un 3% puede sufrir un trastorno asociado a hiperacusia, trastornos emocionales cognitivos y conductuales. Las respuestas evocadas auditivas de corta y media latencia pueden aportar información sobre los cambios electrofisiológicos en individuos con acúfeno crónico severo. La secuenciación del ADN ha demostrado la contribución de las variantes raras y comunes al acúfeno crónico, habiéndose descrito una sobrecarga de variantes missense del gen *ANK2*, que codifica la anquirina-B, en individuos con acúfeno crónico severo. Estas mutaciones facilitan la ramificación axonal y la formación de sinapsis excitatorias que explicarían la perpetuación del acúfeno severo y sus trastornos asociados. La generación de un modelo humano de acufeno mediante células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes ofrece una oportunidad única para estudiar la contribución de las variantes en el acúfeno.

Métodos: Se reclutaron 12 pacientes con acúfeno crónico y variantes heterocigotas en el gen *ANK2*, realizándose una caracterización audiológica mediante potenciales auditivos, pruebas psicoacústicas y psicométricas, empleando diversas herramientas estandarizadas. Paralelamente hemos diferenciado progenitores ótico-neuronales y neuronas a partir de iPSCs, confirmando la expresión de marcadores génicos y celulares, incluyendo *ANK2*, mediante qPCR e inmunotinción.

Resultados: Todos los pacientes refirieron un acúfeno persistente y unilateral, descrito principalmente como ruido blanco. Siete de los pacientes (58%) presentaban un fenotipo extremo, y todos los pacientes refirieron algún grado de hiperacusia. Siete pacientes mostraron un trastorno cognitivo leve, independiente de la edad. Aunque los potenciales no mostraron diferencias en las latencias en función de la presencia de acúfeno, se observaron amplitudes significativamente mayores de las ondas Pa, de los potenciales de latencia media en los oídos enfermos.

El modelo celular de acúfeno severo muestra una expresión significativamente mayor de *ANK2* en la línea celular control en comparación con la línea celular del paciente. Aunque ambas líneas celulares mostraban formación de neuronas multipolares, la línea celular del paciente mostraba un patrón único en el que las neuronas estaban

estrechamente agrupadas, y se observaban mayores proyecciones neuronales y dendritas en comparación con la línea control.

Conclusiones: Los pacientes con variantes de *ANK2* y acúfenos discapacitante presentan un endofenotipo caracterizado por hiperacusia, acúfenos persistentes similares al ruido, hipoacusia de alta frecuencia y amplitudes aumentadas en los potenciales de latencia media. Sin embargo, la ansiedad, la depresión y los síntomas cognitivos varían entre los individuos. El modelo celular generado es valioso para investigar los cambios celulares y moleculares asociados al gen *ANK2* y resulta muy prometedor para evaluar terapias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL OÍDO INTERNO

El oído interno está constituido por una cavidad irregular denominada laberinto óseo que se encuentra excavada en el interior del hueso peñasco. Su interior está compartimentado mediante el laberinto membranoso o conducto coclear cuya parte anterior corresponde a la rampa media o coclear. El laberinto está dividido en dos regiones anatómicas y funcionales diferentes: la cóclea (laberinto anterior) y el vestíbulo y conductos semicirculares (laberinto posterior).

Dentro del laberinto óseo encontramos la perilinfa, con una elevada concentración de iones Na^+ y baja en K^+ . Por su parte, en el laberinto membranoso encontramos la endolinfa con características iónicas diferentes, baja concentración de Na^+ y elevada de K^+ .

La endolinfa se forma principalmente a través de la estría vascular en el laberinto anterior y por las células oscuras que rodean las crestas ampulares y el utrículo en el laberinto posterior. Este líquido se reabsorbe en el saco endolinfático [1].

1.1.1. Cóclea

La cóclea está situada en la parte anterior del laberinto. Consiste en un conducto espiral cónico con una longitud de 30 mm y un diámetro de 1-2 mm, que se enrolla hasta completar dos vueltas y media sobre un eje central denominado modiollo (Figura 1). Desde este eje se extiende una protuberancia ósea denominada lámina espiral ósea, proyectada hacia el conducto coclear y que se continúa con la membrana basilar [2]. En la base de la cóclea existe una excavación que permite el paso de fibras nerviosas del nervio auditivo desde el ganglio de Corti, que se aloja en el canal de Rosenthal.

El interior de la cóclea se encuentra dividido en 3 compartimentos o rampas: vestibular, coclear y timpánica. Las rampas vestibular y timpánica, bañadas en perilinfa, se unen en el ápex coclear mediante el helicotrema. La rampa vestibular está separada de

la coclear por la membrana de Reissner, mientras que la membrana basilar separa la rampa coclear de la timpánica.

La anchura y el grosor de la membrana basilar varía desde la base al vértice coclear, donde es más fina, algo fundamental para la llamada tonotopía coclear. Sobre ella asienta el órgano de Corti.

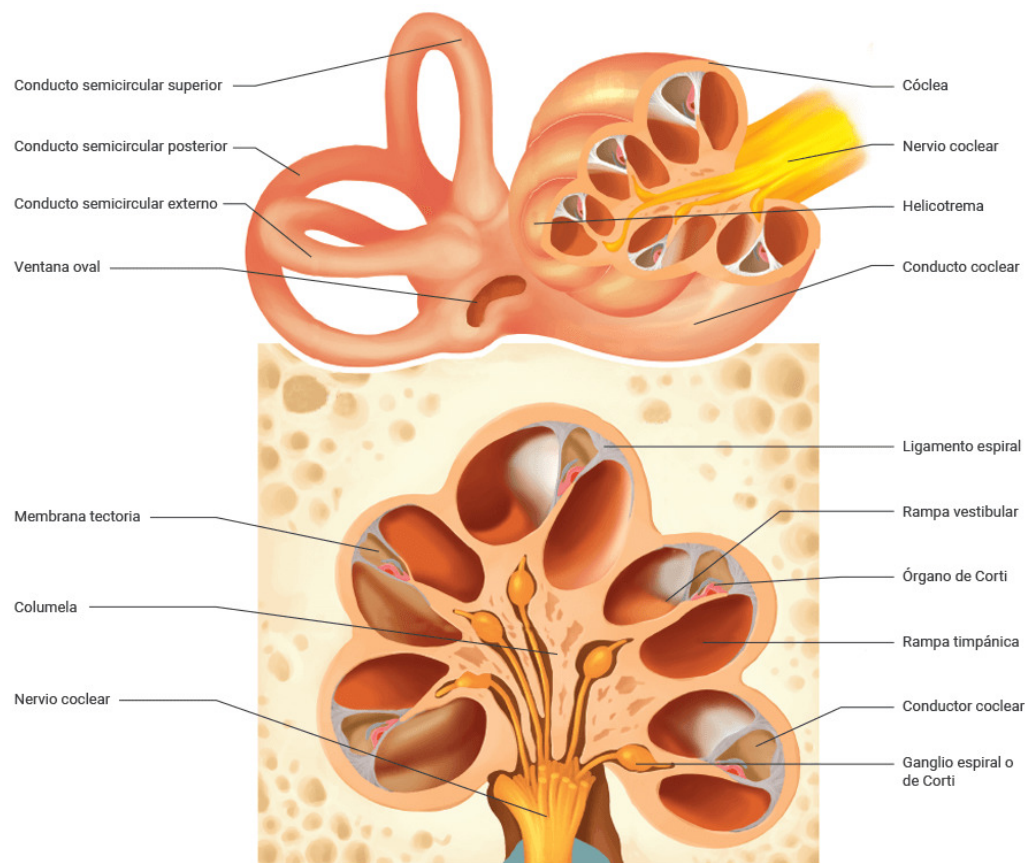


Figura 1. Estructura anatómica del laberinto óseo y membranoso (tomado de *Actualización en Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 2021).

1.1.2. Órgano de Corti

El órgano de Corti se sitúa en la parte interna del conducto coclear. Es el receptor auditivo y está formado principalmente por dos grupos celulares: las células ciliadas (externas e internas) y las células de sostén (Figura 2).

Las células de sostén o células de Deiters sirven de soporte a las receptoras. Se ubican bajo las células ciliadas externas.

Sobre el órgano de Corti se encuentra la membrana tectoria, una membrana acelular formada sobre todo por glucoproteínas. Está cargada negativamente. Se encuentra en contacto con los estereocilios de las células ciliadas externas. En su porción medial se ancla al limbo espiral.

La estría vascular está formada por células marginales, intermedias y basales. Se encuentra en la pared lateral de la rampa coclear. Se encarga de mantener una alta concentración de potasio en la endolinfa para mantener su potencial. El ligamento espiral se sitúa lateralmente.

Las células ciliadas (o células receptoras neurosensoriales) están polarizadas y se dividen en internas y externas. En su polo apical se encuentran los estereocilios que se relacionan con canales de mecanotransducción que permiten el flujo de potasio desde la endolinfa al interior de las células ciliadas. Carecen de movilidad propia y se unen entre sí mediante puentes glucoproteicos. Las células ciliadas también tienen una distribución tonotópica frecuencial a lo largo de la cóclea [3].

- Células ciliadas externas. Dispuestas en tres filas. Existen unas 13.000 por cóclea. Su polo basal se apoya sobre las células de soporte. Tienen capacidad contráctil gracias a las prestinas. Los estereocilios se encuentran anclados en la membrana tectoria. Forman sinapsis con las neuronas aferentes de tipo II y con el sistema eferente medial (cada neurona inerva 10 células ciliadas externas).
- Células ciliadas internas. Situadas en una sola fila, se apoyan sobre la membrana basilar. Existen 3.500 células por cóclea. Forman sinapsis con las neuronas aferentes de tipo I del ganglio espiral (cada célula ciliada interna es inervada por 10-15 neuronas de tipo I).

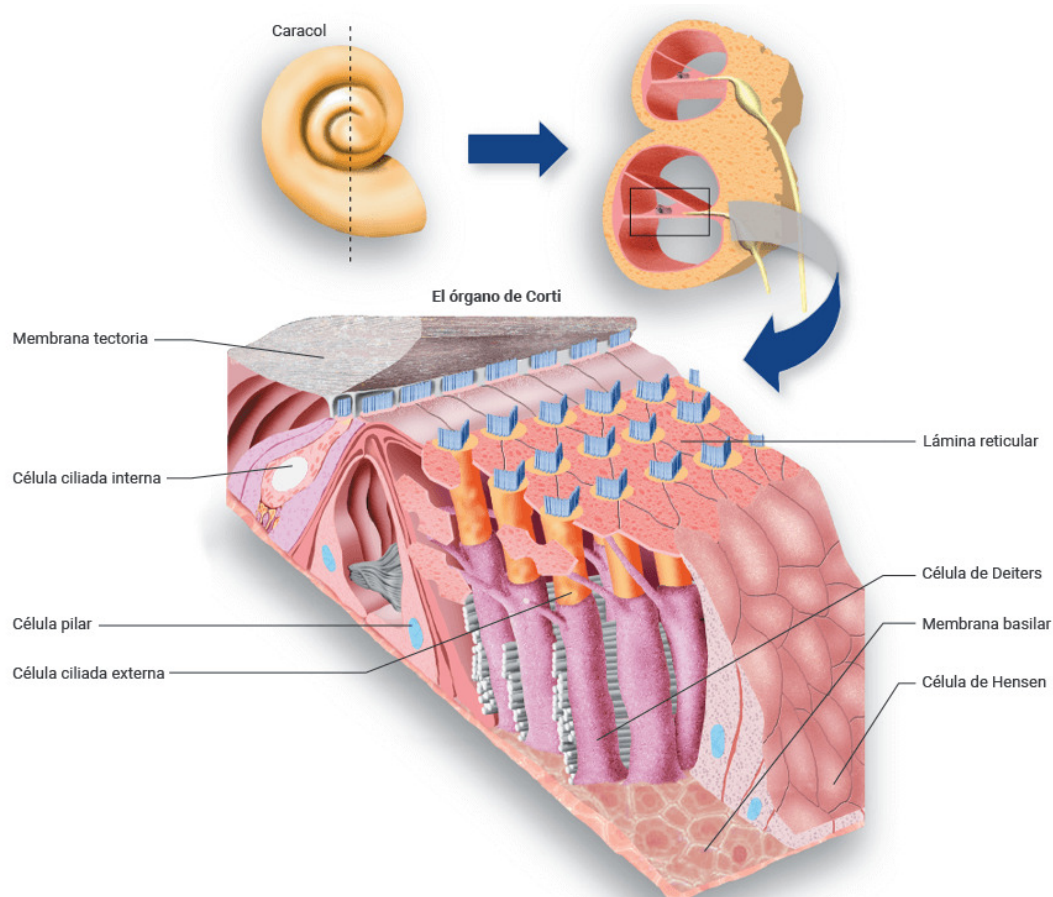


Figura 2. Representación esquemática del Órgano de Corti situado sobre la membrana basilar y formado por células ciliadas internas, células ciliadas externas y células de sostén. La membrana tectoria se sitúa por encima de este conjunto celular (tomado de *Actualización en Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 2021)

1.1.3. Anatomía general de la vía auditiva

Tras la recepción del estímulo sonoro se produce la transmisión de la vibración de la cadena osicular a los líquidos laberínticos a través de la ventana oval. Dicha transmisión se convierte en una onda de presión que se transmite por la perilinfa que consigue mover la membrana basilar.

Esa onda viajera se desplaza por la membrana basilar hasta que encuentre la zona de la membrana en la que sus propias características físicas son las necesarias para realizar el máximo desplazamiento. Debido a la organización tonotópica de la misma, las frecuencias altas estimularán la región basal y las frecuencias graves, la región cercana al ápex (primer filtro coclear). Esta organización tonotópica se mantiene a lo largo de toda la vía auditiva hasta la corteza auditiva.

Cuando la membrana basilar asciende, por la presión perilinfática ejercida desde la rampa timpánica, empuja al órgano de Corti hacia la membrana tectoria. La deflexión de los estereocilios de las células ciliadas externas produce la apertura de canales iónicos que permiten la despolarización mediada por K^+ de estas células. Ello produce una actividad contráctil por la acción de las prestinas, que conlleva el incremento de la intensidad de movimiento de la membrana basilar, consiguiendo estimular a las células ciliadas internas (segundo filtro coclear).

Las células ciliadas internas, mediante la deflexión de sus estereocilios, provoca la despolarización de esta liberando glutamato a los receptores postsinápticos (verdaderos transductores mecanoeléctricos).

Se activan las neuronas aferentes primarias de tipo I que a través del nervio auditivo llegan a los núcleos cocleares. Esta información continua por la vía auditiva hacia el complejo olivar superior tras cruzar línea media en su mayoría (análisis comparado binaural). A través del lemnisco lateral llega al colículo inferior y al cuerpo geniculado medial, proyectándose posteriormente sobre la corteza auditiva.

Existe una vía eferente descendente que permite el control neural del mensaje auditivo mediante sinapsis con la vía aferente y neuronas eferentes. Por ejemplo, la vía eferente controla la actividad contráctil de las células ciliadas externas, siendo útil como amplificador coclear. Sin las células ciliadas externas, se pierde la selectividad frecuencial del receptor auditivo.

1.1.4. El sistema nervioso central auditivo

1.1.4.1 Generalidades

El sistema nervioso auditivo se considera una vía compleja en la que encontramos conexiones ascendentes directas, vías descendentes, y sistemas de arco reflejo. La información procedente del sistema auditivo periférico, es decir, la cóclea u oído interno, llega a los núcleos auditivos centrales a través del nervio auditivo; éste transmite la información auditiva a través de una serie concatenada de estaciones neuronales ubicadas en bulbo raquídeo, protuberancia, mesencéfalo y finalmente corteza cerebral del lóbulo temporal (Figura 3). Es una vía mayoritariamente cruzada puesto que buena parte de las fibras ascendentes cruzan al lado contralateral una vez que sobrepasan los núcleos cocleares del tronco cerebral. Puesto que existen conexiones entre ambos lados a lo largo de distintos niveles de la vía, se puede llevar a cabo un análisis binaural de la información y un procesamiento auditivo central de la misma, de forma integrada. Este mecanismo proporciona la posibilidad de localización del sonido y el análisis de sonidos complejos, entre otros beneficios.

Posee un sistema de filtrado de la información ascendente, dependiente del aprendizaje y la memoria, y que está regulado por centros superiores, incluyendo la corteza cerebral. Este mecanismo se produce gracias a la jerarquización de la vía auditiva que presenta fibras descendentes que partiendo de núcleos superiores regulan, modulan y controlan la actividad de centros auditivos inferiores.

Por último, es importante resaltar que dentro de la vía auditiva pueden distinguirse partes relevantes de cada estación neuronal que está organizada de manera progresiva en función de los tonos a los que son más sensibles sus neuronas. Esta organización tonotópica es un espejo de la distribución tonal, de agudos a graves, que se encuentra en el interior del oído interno [4].

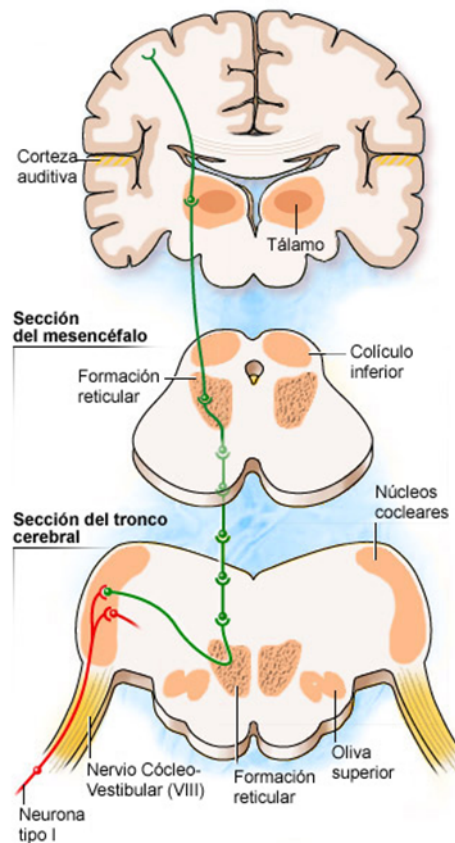


Figura 3. Representación esquemática de la vía auditiva. Es una vía corta (con 3 o 4 niveles), rápida (compuesta por fibras mielínicas gruesas) y que acaba en la corteza auditiva primaria. Transmite la información codificada por la cóclea. En cada de los niveles se realiza una actividad específica de decodificación y de interpretación que se transmite a los niveles superiores (Tomado de *Viaje al mundo de la audición*, www.cochlea.eu, 2017).

La vía auditiva está conformada a grandes rasgos por 3 tipos de vías nerviosas:

- Vía auditiva ascendente
- Vía auditiva descendente
- Vías y centros secundarios

1.1.4.2 Vía auditiva ascendente

Constituye un complejo sistema de filtros, analizadores y sistemas de comparación que tienen como objetivo fundamental extraer la mayor información neuronal auditiva posible procedente del órgano periférico.

El primer análisis del mensaje neural se lleva a cabo en los núcleos cocleares y el complejo olivar superior. Estas estaciones reciben los axones del ganglio espiral de tipo I/nervio auditivo y en ellos se elabora el mensaje complejo que es remitido a centros superiores.

- Núcleos cocleares (Situados en el límite bulbo-protuberancial): Se encargan de la decodificación de la intensidad, patrones temporales (duración, inicio y finalización del estímulo auditivo) y el mantenimiento del análisis frecuencial conformado por el oído interno. Desde aquí, la información se transmite a regiones superiores de la vía, concretamente al complejo olivar superior y al colículo inferior a través de su proyección. El complejo de los núcleos cocleares está constituido por dos estructuras: el núcleo coclear dorsal (NCD) y el núcleo coclear ventral (NCV) [5].
- Núcleos del complejo olivar superior (protuberancia): Participa en la localización espacial del sonido gracias a la binauralidad. Característicamente tiene una proyección doble: ascendente, hacia el lemnisco medial y el colículo inferior (centros superiores), y otra descendente al receptor auditivo.

En la región más alta del tronco cerebral se encuentran los núcleos del lemnisco lateral y núcleos del colículo inferior. Al igual que en el caso del complejo olivar superior, reciben proyecciones binaurales y por tanto, van a contribuir a la localización de la fuente sonora.

La última estación es el complejo tálamo-cortical, donde se incluyen el cuerpo geniculado medial (tálamo) y la corteza cerebral auditiva. Este complejo es el encargado del análisis complejo del mensaje auditivo una vez que ha superado los centros inferiores

y por tanto de la integración de la información sonora [6]. Contribuye a su interpretación y su comparación binaural, y contribuye también a la integración sensorial con otros sentidos especiales y a la respuesta comportamental. Los patrones de distribución de la estimulación en el complejo talamocortical permiten comprender que se establezcan áreas corticales de carácter primario o tonotópicas otras no tonotópicas y otras de actividad multisensorial [7].

El cuerpo geniculado medial presenta diferentes núcleos de significaciones funcionales complejas. La región ventral envía directamente sus proyecciones a la corteza auditiva primaria y está conformada por neuronas muy selectivas tonotópicamente. La región dorsal, por su parte, no tiene organización tonotópica y envía sus proyecciones a la corteza auditiva secundaria. Es importante destacar que además de enviar información al cortex primario y secundario, el cuerpo geniculado reciben proyecciones descendentes desde estas cortezas por lo que se establecen verdaderas redes neuronales para el análisis del mensaje auditivo, incluyendo el filtrado de información bajo el control cortical.

Como ya se ha comentado, en la corteza auditiva encontramos dos tipos de regiones funcionales principales: el área o corteza auditiva primaria y el área o corteza auditiva secundaria.

- La **Corteza auditiva primaria** está localizada en la circunvolución de Heschl. Clásicamente ha sido considerada como una mera representación anatómica tonal de los estímulos. La actividad de esta región se encuentra muy influida por las características del estímulo acústico en frecuencia, intensidad y localización espacial de la fuente del sonido, teniendo en cuenta, que el estado atencional influye de manera importante en su integración [8].

- La **Corteza auditiva secundaria** se encuentra ubicada en una zona más superior del lóbulo temporal y tiene un papel importante en la localización espacial del sonido y el análisis de sonidos complejos [9].

1.1.4.3 Vía auditiva descendente

La vía auditiva descendente es aquella que transmite información desde la corteza auditiva hasta el receptor periférico. Está constituida por proyecciones relativamente independientes de los centros superiores de la vía o la corteza, de forma que conforman circuitos subcorticales que influyen filtrando mensajes de la vía auditiva más inferior. Una vez que el sistema actúa con todas sus estructuras, el mensaje eferente descendiente que se origina en la corteza auditiva va a transmitirse al cuerpo geniculado medial, de aquí al colículo inferior y de él, se proyectan bilateralmente circuitos hasta los núcleos periolivares y a los núcleos cocleares. Por último, las neuronas del complejo olivar superior proyectan sobre el receptor auditivo u oído interno.

1.1.4.4 Vías y centros secundarios o no primarios

Las vías secundarias tienen un gran interés funcional puesto que permiten entre otras funciones integrar el mensaje auditivo con aquella información que procede de otros sistemas sensoriales.

Una vez que la información auditiva abandona los núcleos cocleares, que es común a todas las vías auditivas, una serie de fibras pequeñas se unen a la vía reticular ascendente, que es común a todas las modalidades sensoriales. Tras varias estaciones dentro de la formación reticular, y después en la parte inespecífica del tálamo, esta vía conduce a la denominada corteza multisensorial. También se establecen otras conexiones con el hipotálamo y los centros vegetativos (Figura 4).

El papel de esta vía, que reagrupa diferentes mensajes sensoriales enviados simultáneamente al cerebro, es la de permitir una selección del tipo de información que debe ser procesado con prioridad. Es decir, que en las vías del sistema reticular participa, con los sistemas de despertar y de las motivaciones, en la selección de la información que debe ser tratada prioritariamente por el cerebro. Además, esta vía está vinculada a los centros de la vigilia (despertar), así como a los centros de la vida vegetativa. La integridad y el buen funcionamiento de las vías primarias y no primarias son necesarios para la percepción consciente [10].



Figura 4. Representación de las vías y centros secundarios o no primarios de la vía auditiva

(Tomado de *Viaje al mundo de la audición*, www.cochlea.eu, 2017).

1.2. ACÚFENO

1.2.1. Definición y epidemiología

El acúfeno o tinnitus se define como la percepción de ruidos auditivos en ausencia de un estímulo acústico externo. Se clasifican en 2 categorías: acúfenos objetivos y acúfenos subjetivos. Aquel objetivo es el generado a raíz de una fuente interna identificable, como flujos sanguíneos turbulentos u otoemisiones acústicas. El acúfeno subjetivo es originado por una actividad neuronal espontáneo anormal dentro de la vía auditiva del paciente [11]. Se trata de un síntoma auditivo frecuente que afecta al 5-15% de la población, causando una importante discapacidad en estos pacientes, que no está relacionada con la pérdida de audición. Existe un importante grupo de trastornos que se asocian al acúfeno, como la hipoacusia, los trastornos psiquiátricos, las enfermedades neurodegenerativas o la disfunción temporomandibular; sin embargo, los mecanismos moleculares que explican el desarrollo del acúfeno no se conocen bien, y no se ha establecido la contribución de factores genéticos y epigenéticos. Además, el tratamiento de este problema no se ha estandarizado, y existe una gran variabilidad en la práctica

clínica y el enfoque terapéutico entre países [12]. Entre otras causas, los criterios diagnósticos del acúfeno no se han establecido claramente hasta la fecha debido a la ausencia de una definición estandarizada.

Conceptualmente, hasta la fecha, no existe un claro consenso sobre la definición de acúfeno como para clasificarlo como síntoma o trastorno. Los criterios diagnósticos del acúfeno no se han establecido hasta la fecha debido a la falta de una definición operativa o estandarizada. Las definiciones actuales no diferencian a los pacientes con acúfeno de los que lo padecen junto con otras comorbilidades, discapacidad funcional o disfunción cognitiva. De Ridder y cols [13] ha propuesto las definiciones de acúfeno como síntoma y como trastorno. En este sentido, el trastorno de acúfeno sería aquel con sufrimiento del paciente asociado a este síntoma. De hecho, entre un 1 y un 3% de la población puede ser diagnosticada de un trastorno debilitante por acúfeno asociado a alteraciones del sueño y malestar psicológico, con consecuencias emocionales y conductuales que repercuten significativamente en la calidad de vida relacionada con la salud [14].

El principal factor de riesgo del acúfeno es la pérdida de audición, pero a menudo se asocia con otras alteraciones, como hiperacusia, ansiedad, depresión, hipertensión, insomnio o migraña [15].

1.2.2. Fisiopatología

En la actualidad se reconoce al acúfeno como el resultado de una mayor plasticidad en el sistema auditivo central asociado a la aparición y progresión de la pérdida auditiva. La aparición de acúfeno está relacionada con diferentes núcleos de la vía auditiva, especialmente el núcleo coclear, el colículo inferior, el núcleo geniculado medial del tálamo y la corteza auditiva primaria. La percepción del acúfeno implica diferentes vías neuronales, estando también implicadas otras estructuras como el hipocampo y la corteza prefrontal.

Tradicionalmente se ha pensado que el acúfeno se origina exclusivamente en la cóclea pero hay hechos objetivos que han objetivado que esta etiología no es decisiva. En consecuencia, se plantea la hipótesis de que el sistema nervioso central puede

responder a diferentes cambios adaptativos con fines compensatorios, induciendo así la aparición del acúfeno. Después de cualquier daño coclear, hay una actividad reducida en las fibras nerviosas auditivas que deben recolectar información del área dañada del órgano de Corti, y llega menos información acústica al sistema nervioso central; es por ello que el SNC compensa esta situación de déficit [16, 17].

Los mecanismos fisiopatológicos que explican este sistema de compensación han sido descritos:

- El mecanismo de neuroplasticidad anormal que consiste en el aumento de la actividad de neuronas del sistema auditivo central y cambios en la respuesta de las neuronas a la estimulación acústica [18].
- El acúfeno puede explicarse también como el resultado de un aumento de la actividad excitadora, una disminución de la actividad inhibitoria o una combinación de ambos fenómenos. La liberación de neurotransmisores inhibitorios (GABA y glicina) en los núcleos cocleares ventral y dorsal se reduce después de la pérdida de aferencias cocleares [18], lo que ocasiona un cambio en la expresión de los receptores de estas sustancias. La pérdida de audición también provoca un aumento de los neurotransmisores excitadores, posiblemente debido a la hipertrofia de las fibras excitadoras no auditivas que intentan llenar los huecos que dejan las fibras del nervio coclear. En el núcleo geniculado medial, la expresión del receptor GABA aumenta, lo que induce una mayor hiperpolarización de las neuronas talámicas, haciéndolas más susceptibles a responder con ráfagas de potenciales de acción [19].
- La lesión de determinadas zonas del órgano de Corti se acompaña de una reorganización del mapa de fonemas de la corteza auditiva. Esta condición a menudo se asocia con la aparición de hipersincronía de la actividad neuronal, lo que induce la aparición de acúfeno [20].

Por otra parte, existen factores no auditivos relacionados con el acúfeno. Muchos impulsos neuronales de diferentes sistemas sensoriales convergen a lo largo del sistema auditivo. La relación entre la vía auditiva y el sistema somatosensorial es relevante para el desarrollo del acúfeno porque el núcleo coclear recibe información de la cara y el

cuello a través de los axones excitadores del ganglio trigémino, el núcleo espinal del trigémino y el núcleo de la columna dorsal. Las células fusiformes del núcleo de la columna dorsal desempeñan un papel central en la integración de la información auditiva y somatosensorial porque reciben inervación de ambos sistemas [20].

1.2.3. Acúfeno y audición normal

En torno a un 10-15% de pacientes que presentan acúfeno tienen una audición en umbrales de normalidad en las frecuencias de 250 a 8000Hz. Este hecho no demuestra ausencia total de daño coclear en pacientes con este síntoma.

Por definición, el audiograma mide los umbrales auditivos de actividad de las fibras más sensibles del nervio coclear que suelen tener un umbral de respuesta más bajo. Por lo tanto, un paciente con acúfenos puede tener una audiometría normal siempre que sus fibras de umbral bajo permanezcan intactas, aunque se haya producido alguna pérdida de sus fibras auditivas de umbral alto, o de alguna de las sinapsis entre estas fibras y las células ciliadas internas. Por otro lado, las audiometrías de alta frecuencia, que evalúan todas las frecuencias del espectro audible humano, es decir, de 125 a 20000Hz, son pruebas fundamentales para una completa evaluación auditiva en estos pacientes. En pacientes con acúfenos y audiograma normal, es obligatorio realizar esta prueba, para buscar hipoacusias ocultas o hipoacusias de alta frecuencia [21].

En estudios de respuestas electrofisiológicas auditivas con Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral (PEATC) en pacientes con acúfeno, se ha demostrado que la amplitud de la onda I, que refleja la actividad del nervio auditivo, es menor, mientras que la onda V, que refleja la actividad del colículo inferior, muestra la misma amplitud en los pacientes que en la población normal [22]. Estos datos sugieren claramente que en estos pacientes la actividad del sistema auditivo central ha aumentado para equilibrar la disminución de la actividad del nervio auditivo debida a la pérdida de fibras de umbral alto o de sus sinapsis, lo que refuerza la hipótesis de que el acúfeno podría aparecer como una respuesta compensatoria exacerbada al daño coclear, incluso en casos en los que no hay hipoacusia demostrable en la audiometría.

1.2.4. Trastornos asociados al acúfeno

Junto con la hipoacusia, otras comorbilidades frecuentemente asociadas al acúfeno son la ansiedad, la depresión, el deterioro cognitivo e incluso, el insomnio. Estas situaciones están presentes en el 50% de los pacientes con acúfeno crónico [12]. Es por ello, que, junto a una evaluación audiológica completa, el abordaje estándar de estos pacientes debería estar acompañado por medidas psicoacústicas del acúfeno y cuestionarios estandarizados para determinar la gravedad y su impacto en la calidad de vida relacionada con la salud.

1.2.4.1 Alteraciones de la calidad de vida

Un porcentaje importante de la población puede sufrir acúfenos de forma transitoria en algún momento de su vida. Pero cuando la presencia de un acúfeno se torna en permanente, esa situación va a afectar negativamente la calidad de vida del individuo. Curiosamente, en personas con síntomas persistentes e inmutables, las características psicológicas del acúfeno (como el volumen o el tono) no están significativamente relacionadas con su gravedad o el resultado del tratamiento. En estos casos, es mucho más probable que sea la propia interpretación del acúfeno que generen las vías no auditivas asociadas la que influya en la alteración de la calidad de vida más que el sonido en sí mismo [23]. El envejecimiento suele tener una importante relación en estos pacientes; a medida que las personas envejecen, suelen notificar un deterioro de los aspectos de la calidad de vida relacionados con la salud física. Concretamente, en pacientes con acúfenos, la hipoacusia probablemente tenga un efecto aditivo en este tipo de percepciones negativas.

El malestar psicológico, como las actitudes y cogniciones negativas, los problemas de concentración, el insomnio, la depresión y la ansiedad, son predictores importantes de las variaciones en la calidad de vida [24]. Cada vez hay más evidencia que sugiere que las percepciones cognitivas erróneas, las respuestas emocionales negativas y los procesos de atención son importantes en la habituación disfuncional que causa el malestar severo por el acúfeno.

1.2.4.2 Ansiedad y depresión

La depresión y la ansiedad se identifican habitualmente como factores que contribuyen al grado de angustia de las personas que padecen acúfeno. Asociados a ellos, la pérdida de audición, los cambios relacionados con la edad, y diversos tipos de estrés condicionan un importante estado de ánimo negativo en estos pacientes [25].

La alta prevalencia de síntomas de depresión en pacientes con acúfeno puede tener tres asociaciones: la depresión en sí misma puede ser un factor contribuyente a la persistencia del acúfeno; el propio sonido puede ser un factor predisponente a la depresión; por último, el acúfeno como comorbilidad de la depresión [26].

Numerosos estudios demuestran una presencia significativa de trastornos psicopatológicos y elevadas puntuaciones de ansiedad y depresión en los pacientes con acúfenos [27–29]. Este hecho no indica que estos sujetos sean ansiosos, depresivos o psicopatológicos en sí mismos, ni que estas situaciones sean la causa del acúfeno. Es más probable que la propia experiencia del padecimiento del acúfeno pueda afectar a la gravedad de trastornos psicológicos como la ansiedad, la depresión o, incluso, trastornos de somatización [30]. Bhatt et al.[31] encontraron que las personas que habían experimentado acúfenos en los últimos 12 meses experimentaron una mayor frecuencia de depresión en comparación con las personas que no lo tenían. Además, en su serie, demostraron consistentemente que los pacientes con ansiedad y acúfeno eran más comunes que los pacientes con ansiedad y sin acúfeno.

Por último, en el estudio de Shargorodsky et al. [14] concluyen que el 50% de los pacientes con trastornos de ansiedad pueden padecer acúfenos y que la prevalencia de estos trastornos en pacientes con acúfenos es mayor en comparación con la población general.

1.2.4.3 Deterioro cognitivo

El deterioro cognitivo es una condición que se ha relacionado ampliamente con pacientes que padecen acúfenos. De hecho, la gravedad de los síntomas, que incluyen

alteraciones en el pensamiento, el aprendizaje, la memoria, el juicio o en la toma de decisiones, se ha correlacionado con la gravedad de acúfeno [32, 33].

Las características de las alteraciones de la cognición en el acúfeno crónico aún son indeterminadas y sigue sin clarificarse si el deterioro cognitivo es una respuesta secundaria a las manifestaciones de la enfermedad o una característica primaria de la enfermedad subyacente [34]

Por una parte, se da la circunstancia ya comentada de que el principal factor de riesgo del acúfeno es la pérdida de audición. Es conocida la correlación que existe entre hipoacusia y deterioro cognitivo que determina que la pérdida de audición puede condicionar la aparición temprana de déficits cognitivos [35, 36]. Concretamente, la hipoacusia parece exacerbar los déficits cognitivos en los ancianos y puede servir como factor pronóstico del deterioro cognitivo leve [34]. Varios mecanismos pueden estar teóricamente implicados en esta asociación [37, 38]: una comunicación verbal pobre asociada a hipoacusia puede llevarnos a error en tests cognitivos, además de que en los individuos con deterioro cognitivo subclínico puede sobreestimarse la hipoacusia; el desarrollo de las alteraciones de la cognición pueden acelerarse debido al sobreesfuerzo de las redes neuronales para interpretar sonidos que recibe con dificultad debido al déficit auditivo; por último, la pobre ejecución cognitiva asociada a hipoacusia determina fenómenos de aislamiento social, soledad y depresión.

Si nos centramos en la cognición disfuncional asociada al acúfeno, incluyendo la cognición por evitación y el pensamiento catastrófico, se ha descrito una fuerte asociación con elevadas puntuaciones en cuestionarios de ansiedad, depresión y angustia por el acúfeno. En relación a este tipo de paciente, en la actualidad debemos tener presente que la hipoacusia es un factor de riesgo independiente y modificable para el deterioro cognitivo [39]. Estos patrones cognitivos se han asociado al deterioro de la función ejecutiva, la atención y la memoria [40].

1.2.4.4 Hiperacusia

La hiperacusia es una condición caracterizada por una hipersensibilidad auditiva causada por la mayoría de los sonidos que rodean a una persona. La estrecha

relación entre los mecanismos fisiopatológicos del acúfeno y la hiperacusia está ampliamente aceptada, ya que muchos pacientes refieren sufrir ambos síntomas simultáneamente.

Generalmente se acepta que la hiperacusia es causada por cambios en el proceso de amplificación del sonido que resultan en una disminución del umbral de discomfort del individuo cuando se enfrenta a un ruido ambiental <90-100 dBHL en dos o más frecuencias.

Se postula que esta alteración tiene dos orígenes: un origen periférico o un origen central [41]:

- Dependiendo del origen periférico, la amplificación anormal de las ondas de presión acústica realizadas por las células ciliadas externas puede provocar irritación a nivel de las células ciliadas internas. Esta situación puede deberse a una sobreexcitabilidad o falta de inhibición cuando el sonido alcanza el nivel de estímulo de las células ciliadas internas. La disfunción de la contracción del músculo estapedial (reflejo acústico) también puede explicar la hiperacusia, que puede deberse a algún defecto en la innervación muscular o a alguna patología sistémica que puede afectar a este mecanismo [42].

- Por otro lado, dependiendo del origen central, existen dos mecanismos que pueden contribuir a la fisiopatología de la hiperacusia. Esta entidad ha sido descrita en pacientes con patologías provocadas por desbalances en los niveles de serotonina [43]. Por tanto, una hipótesis es que los cambios en los mecanismos de secreción o recaptación de este neurotransmisor provocan cambios patológicos en la modulación de la señal sonora. Por otro lado, se cree que el glutamato liberado por la sinapsis entre la célula ciliada interna y el nervio auditivo durante situaciones de estrés pueden inducir a una hiperexcitabilidad y aumentar el efecto de la señal sonora sobre la vía auditiva [44].

Recientemente se han descrito teorías que explicarían la aparición del acúfeno y la hiperacusia asociada cuyo origen sería el aumento de la ganancia central como respuesta a un daño celular causado por ruido, ototóxicos u otros mecanismos [45], que tendría una repercusión en estructuras superiores de la vía auditiva como la corteza auditiva, el núcleo geniculado medial o el colículo inferior. Una vez generada la sobreexcitación de la vía auditiva, los mismos filtros y conexiones a nivel subcortical y

del sistema límbico serían los responsables, a través de la activación del sistema nervioso autónomo, de provocar la reacción psicoemocional y aversiva observada en la hiperacusia.

1.3. BASES GENÉTICAS DE LOS ACÚFENOS

Se han descrito ampliamente datos epidemiológicos y genéticos que apoyan que el acúfeno, sobretudo el grave, tiene una contribución genética, y las variantes comunes y raras con efectos epistáticos conforman el fenotipo [15, 46].

Uno de los estudios sobre acúfenos realizado en gemelos demostró de una elevada concordancia entre gemelos monocigóticos con acúfeno bilateral, lo que indica una herencia genética para el acúfeno bilateral grave y una heredabilidad alta de 0,62 en mujeres jóvenes con acúfenos bilaterales. Cederroth et al. realizaron un estudio sobre adoptados suecos para investigar la asociación de factores genéticos o ambientales con el acúfeno [46]. Para llevarlo a cabo, reclutaron a sujetos adoptados, a padres biológicos y a padres adoptivos. Los resultados demostraron una ausencia de asociación entre la transmisión del acúfeno y los factores ambientales compartidos. Sin embargo, se notificó una heredabilidad de 0,32, lo que sugería la asociación del acúfeno con factores genéticos.

Por otra parte, también se han descrito en la bibliografía estudios familiares basados en grandes poblaciones. En un primer estudio a gran escala, se reclutaron 198 familias de toda Europa y el análisis reveló una heredabilidad de 0,06-0,14 para hermanos y de 0,01-0,07 para padres e hijos; y una heredabilidad de 0,11 en mujeres y hombres, lo que demostró que la contribución de los factores genéticos en el acúfeno es relativamente baja [47]. En Suecia, se realizó un estudio a gran escala sobre agregación familiar para determinar la proporción de riesgo de recurrencia entre hermanos. Este estudio ha descubierto que el cociente de riesgo de recurrencia es significativamente mayor para el acúfeno grave en las mujeres y ha puesto de relieve la importancia del nivel de gravedad del acúfeno y el sexo para futuros estudios genéticos [48].

Varios estudios de genotipado han investigado la contribución genética al acúfeno, en particular al acúfeno crónico. Estos estudios han seleccionado genes

candidatos para su secuenciación o genotipado y han reclutado una muestra muy pequeña de pacientes con acúfeno crónico. Se han sugerido la implicación de varios genes candidatos, como *KCNE1* [49], *SLC6A4* [50], *KCNE3*[51], *GDNF*, *BDNF*, *KCTD12* [52, 53], *GDNF* [54] y la vía metabólica [55], pero las pruebas que apoyan estos hallazgos son muy débiles[47]. Hay principalmente 3 problemas que influyen en estos resultados: 1) la inclusión de pacientes sin un fenotipo adecuado (nivel de gravedad, edad de aparición, grupo de edad); 2) la falta de replicación en una cohorte independiente; y 3) el sesgo de selección de genes candidatos, ignorando la múltiple interacción de las proteínas en los complejos procesos biológicos.

1.3.1. Gen *ANK2*

El gen *ANK2* (ENSG00000145362), localizado en el cromosoma 4q25-q26, codifica la anquirina-2, una proteína estructural de gran tamaño que porta dominios de muerte y de replicación de la anquirina. Esta molécula se encarga de unir proteínas integrales al citoesqueleto fundamental de espectrina-actina. Esto le hace ser imprescindible en algunas actividades estructurales como la organización a escala micrométrica de las membranas plasmáticas de vertebrados en múltiples situaciones fisiológicas.

El gen *ANK2* está formado por 46 exones en total y, el exón 37/38 está específicamente relacionado con el tejido cerebral [56]. Este gen codifica dos polipéptidos diferentes, incluyendo la anquirina-2 (expresado en diferentes tejidos) y la anquirina-2 Gigante, una variante de isoforma neuroespecífica expresada ampliamente en el sistema nervioso central, con 2133 residuos codificados por el exón 37 entre los dominios de muerte y de unión a la espectrina [57].

La Anquirina-2 Gigante es una proteína clave para mantener la conectividad y la actividad neuronal en el sistema nervioso central. Contribuye al desarrollo, mantenimiento y perfeccionamiento de los circuitos neuronales en distintas áreas cerebrales. Las señales neuronales que se inician en el Segmento Inicial del Axón (SIA) regulan la actividad neuronal (Figura 5). Se ha demostrado que la falta de entrada de estímulo auditivo provoca un aumento de la longitud de este SIA y, en última instancia,

puede conducir a un aumento de la conectividad de las neuronas auditivas en el tronco encefálico [58]. A esto se suma, además, un aumento de la corriente de Na^+ en toda la célula, de la excitabilidad de la membrana y de los estímulos espontáneos. Tras la privación auditiva, la preservación de la función auditiva indica que el cambio puede haberse producido a nivel de la funcionalidad sináptica más que a nivel estructural. Sin embargo, los cambios homeostáticos que se producen en el SIA podrían desempeñar un papel importante para mantener la integridad de las neuronas restantes en los circuitos auditivos [58] algo que también puede ocurrir en el acúfeno grave [59].

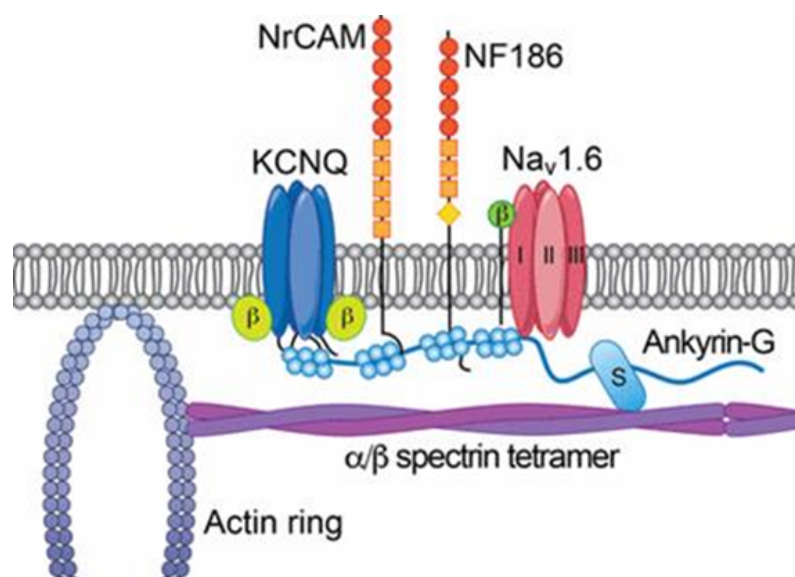


Figura 5. Esquema de los componentes clave del SIA. Entre ellos se incluyen moléculas de adhesión celular (NrCAM y NF186) y canales iónicos (KCNQ y NaV), todos ellos unidos a repeticiones de anquirina en el extremo amino. AnkG está, a su vez, unido al tetrámero de espectrina que se muestra asociado a un anillo de actina. Los tetrámeros y los anillos de actina asociados están espaciados ~190 nm [60].

La existencia de variantes raras en la isoforma ankB puede producir un aumento de la ramificación axonal [57]. En humanos, se han descrito previamente variantes raras en el gen *ANK2* en individuos con Trastorno del Espectro Autista (TEA) [57] y síndrome de QT largo [61]. Aunque los fenotipos auditivos se han investigado poco en los TEA, hay datos que sugieren una mayor sensibilidad al ruido o hiperacusia en los TEA [62]. Por tanto, dada la estrecha relación entre acúfeno e hiperacusia, es probable que *ANK2*

pueda estar implicado en los procesos de activación sensorial, que se cree que subyacen al acúfeno grave con un aumento de su intensidad [63].

El acúfeno como trastorno neurológico puede tener relación con la privación sensorial del input auditivo, como probablemente ocurre en la pérdida de audición de alta frecuencia o en la EM, con la reorganización sináptica que conlleve a cambios en la excitabilidad neuronal en diferentes áreas cerebrales, pero también con otro efecto fisiopatológico: la mayor conectividad con regiones cerebrales no auditivas como se observa a menudo en pacientes con acúfeno, sobre todo con acúfeno grave [64].

Se ha descrito la expresión de *ANK2* en neuronas de varias regiones cerebrales auditivas y no auditivas distintas dentro del cerebro del ratón. En ellas, desempeña un papel en el desarrollo y la función de la ramificación axonal y la conectividad sináptica. Amanat et al. [59] objetivaron una marcada expresión de este gen en la vía auditiva, incluido el córtex auditivo, el córtex dorsal del colículo inferior, el núcleo medial del cuerpo trapezoidal y el núcleo coclear dorsal. Estos hallazgos apoyan que múltiples núcleos de la vía auditiva podrían estar implicados en el desarrollo del acúfeno grave. Además, Pudieron demostrar una mayor expresión de *ANK2* en una serie de regiones cerebrales no auditivas que se han asociado con el acúfeno, incluyendo el córtex, el hipocampo y el cerebelo [65, 66].

1.4. GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES

Recientemente, las células madre pluripotentes humanas (hPSC; del inglés *human pluripotent stem cell*), que incluyen tanto a las células madre embrionarias humanas (hESC; del inglés *human embryonic stem cell*) como a las células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC; del inglés *induced pluripotent stem cell*), han surgido como un nuevo modelo ofreciendo ventajas únicas para los estudios del desarrollo. Las hPSC pueden recapitular aspectos del desarrollo embrionario humano a la vez que mantienen la capacidad de diferenciarse a cualquier linaje celular del organismo humano. Además, las hPSC suponen un potente recurso en medicina regenerativa como fuente potencial de células maduras funcionales capaces de reconstituir órganos o tejidos en individuos con distintas patologías.

1.4.1. Definición y características de las hPSC

Las hPSC son células con capacidad de auto-renovación, crecimiento ilimitado *in vitro* y potencialidad para diferenciarse a cualquier linaje celular representativo de las tres capas germinales de un embrión en desarrollo (ectodermo, mesodermo y endodermo) [67].

Las hPSC poseen mecanismos moleculares y rutas de señalización que controlan la capacidad de auto-renovación y diferenciación a cualquier linaje celular del organismo.

Se han identificado tres factores de transcripción claves que controlan el mantenimiento del estado pluripotente son OCT4, SOX2 y NANOG. OCT4, SOX2 y NANOG constituyen el núcleo transcripcional, ya que su expresión es fundamental para establecer la identidad celular de las células madre y para el desarrollo temprano del embrión. Estos tres factores se unen a sus propios promotores de forma cooperativa y forman un circuito interconectado de auto-regulación. De todos ellos, OCT4 es el más indispensable ya que presenta funciones activadoras que inducen y mantienen la pluripotencia, pero además tiene funciones represoras que inducen la diferenciación celular. Por tanto, OCT4 es considerado como el regulador esencial de la pluripotencia [68].

Las hPSC deben ser caracterizadas para determinar su potencial real y poder ser empleadas tanto en investigación básica como para aplicaciones clínicas. Para la lograr una caracterización celular completa de las hPSC deben realizarse varios ensayos:

- Marcadores de pluripotencia. La expresión de marcadores de pluripotencia se lleva a cabo mediante el análisis de marcadores de superficie específicos de las hPSC, como son SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y SSEA-3, y además pueden detectarse los TF endógenos OCT-4, NANOG, SOX2 y REX1, característicos de las hPSC. El ensayo de pluripotencia puede llevarse a cabo por varios métodos complementarios: inmunofluorescencia, RT-PCR (del inglés, *Reverse transcription polymerase chain reaction*) y/o citometría de flujo [69, 70].
 - La inmunofluorescencia es un método rápido y fácil, pero es cualitativo y requiere de un cultivo negativo para sustraer la señal de fondo.

- La RT-PCR permite cuantificar los niveles de expresión endógena a nivel de ARNm de los TF de pluripotencia. Aunque la técnica es informativa al mostrar el fenotipo de todo el cultivo celular, se pierde la información sobre la homogeneidad de la población celular.
 - La citometría de flujo complementa a la RT-PCR ya que provee información de diferentes poblaciones celulares de las hPSC. Puede emplearse para detectar tanto marcadores celulares de membrana (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y SSEA-3) como intracelulares (OCT-4 y NANOG).
- Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra presente en la membrana celular de todos los tejidos corporales. En hPSC, esta enzima se encuentra altamente expresada y por ello, esta técnica es ampliamente usada como marcador o indicador clave de la pluripotencia de las hPSC. Además, es un método rápido y sencillo que permite que las células con actividad fosfatasa alcalina se tiñan de color rosado [71, 72].
 - Análisis citogenético. Para visualizar el patrón cromosómico de las hPSC se realiza un cariotipo por bandeo-G mediante tinción de Giemsa y/o técnicas de citogenética molecular como el FISH (del inglés, *Fluorescence in situ hybridization* o el SKY (del inglés *Spectral Karyotype*). En el cariotipo clásico se suele utilizar una solución de Giemsa como tinción (específica para los grupos fosfato del ADN) para colorear las bandas de los cromosomas (Bandas-G). Cada cromosoma tiene un patrón característico de banda que ayuda a identificarla. Como alternativas a la tinción Giemsa, se encuentran las técnicas moleculares FISH o SKY, ya que presentan una mayor precisión al bandeo-G al permitir el estudio y la visualización simultánea de los 23 pares de cromosomas mediante sondas fluorescentes que identifican cada cromosoma con un color diferente. Estas técnicas mejoran la identificación y el diagnóstico de alteraciones cromosómicas que no pueden verse por la tinción Giemsa.
 - Arrays para la detección de SNPs. Los arrays para la detección de SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polimorfism*) son ampliamente usados para determinar

diferentes polimorfismos en una población. Los chips de ADN pueden utilizarse para genotipar las secuencias de un genoma particular en determinadas posiciones. Los oligonucleótidos pequeños son capaces de identificar polimorfismos de un sólo nucleótido que podrían ser los responsables de variaciones genéticas dentro de una población. Esta técnica es mucho más susceptible y una alternativa más adecuada que el cariotipado que a veces no es suficiente para detectar ciertas alteraciones como somáticas [73].

- Diferenciación *in vitro*. Se realizan ensayos de formación de cuerpos embrioides (EBs, del inglés *Embryoid Bodies*). Los EBs son agregados de células pluripotentes que inducen la diferenciación hacia las tres capas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo). Se utilizan técnicas de inmunocitoquímica para detectar marcadores celulares específicos de las tres capas germinales del embrión [74].
- Diferenciación *in vivo*. La formación de teratomas evalúa la generación espontánea de tejidos diferenciados pertenecientes a las tres capas germinales tras la inyección de hPSC en un ratón inmunodeprimido. Esta técnica determina el potencial de desarrollo a nivel poblacional ya que los teratomas no pueden formarse a partir de células individuales. Además, al no ser una técnica cuantitativa sólo puede realizarse un análisis histológico de los diferentes tejidos que se han diferenciado dentro de los teratomas. La formación de teratomas es el ensayo de referencia para evaluar el potencial de desarrollo de las hPSC [75]. Una técnica más novedosa es la formación de blastocistos quiméricos que evalúa la contribución de las PSC introducidas en embriones, en estadio de mórula o blastocisto durante el desarrollo embrionario. Las PSC de alta calidad dan lugar a un desarrollo normal generando quimeras de gran calidad que colonizan todos los tejidos embrionarios, incluida la línea germinal. Por el contrario, las PSC de menor calidad producen bajo quimerismo o embriones con viabilidad reducida. Este tipo de ensayos puede realizarse entre PSC y embriones de la misma especie o inter-especie (humano-ratón, humano-cerdo o humano-primate principalmente). Tanto los ensayos de formación de quimeras de hPSC en

embriones de ratón como la formación de quimeras con embriones humanos están permitidos bajo unas normas estrictas y éticas rigurosamente evaluadas por la comunidad internacional de investigación con células madre [76].

Una vez caracterizadas, deben depositarse en el Banco Nacional de Líneas Celulares (BNLC). El BNLC está adscrito a la Subdirección General de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto de Salud Carlos III (España). Su objetivo es garantizar la disponibilidad de las líneas celulares para la investigación biomédica, en todo el territorio nacional. El BNLC está formado por varios nodos establecidos en Barcelona, Valencia y Granada, siendo Granada el nodo central y ubicado en el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA) [77].

En definitiva, con todas las propiedades que las acompañan, las hPSC son ideales como modelo de estudio del desarrollo normal y patológico del ser humano.

1.4.2. iPSC

Las iPSC, células madre pluripotentes inducidas humanas, son células somáticas derivadas de pacientes o donantes sanos que son reprogramadas mediante la expresión ectópica de ciertas moléculas de ADNc, ARNm o factores proteicos. Las técnicas de reprogramación han avanzado en gran medida desde los métodos iniciales que implicaban la integración al azar de los vectores virales en el genoma de la célula a reprogramar [78], hasta los métodos actuales que no precisan integrarse para llevar a cabo una reprogramación efectiva, lo cual facilita su potencial terapéutico [79–81]. Los diferentes métodos de reprogramación abarcan la expresión ectópica de los cuatro factores de reprogramación (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) descritos por el Dr. Yamanaka. Estos factores juegan un papel esencial en el mantenimiento de la pluripotencia y diferenciación de las iPSC. OCT4 y SOX2 son imprescindibles en el mantenimiento de la pluripotencia, mientras que c-MYC y KLF4 son oncogenes que inducen la diferenciación celular y aumentan la eficiencia de reprogramación [78]. Alternativamente, el Dr. Thomson propuso un método de reprogramación similar empleando los factores OCT4, SOX2, KLF4 y LIN28 [82].

Los factores de reprogramación pueden ser introducidos mediante virus integrativos (retrovirus o lentivirus) [78], virus no integrativos (adenovirus, virus episomales, virus Sendai, plásmidos de expresión, etc.) [79, 80, 83, 84], medios físicos (nucleofección) o químicos (lipofección) [85]. Entre los métodos no integrativos, los virus Sendai (SeV, del inglés *Sendai virus*) son una técnica ampliamente utilizada en los para reprogramar iPSC. Los SeV son virus de ARN que pueden eliminarse fácilmente mediante selección negativa mediada por anticuerpos. Se replican en forma de ARN monocatenario en el citoplasma de las células infectadas, por lo que el ADN no se produciría ni se integraría en el genoma del huésped durante la transducción. Por tanto, son vectores seguros que pueden usarse en el campo de la terapia génica [81].

En un principio el proceso de reprogramación es iniciado por los factores exógenos, pero la transformación final a iPSC madura se consigue gracias a la expresión de factores endógenos. Los pasos iniciales del proceso son reversibles hasta la transformación en intermediarios tardíos. A partir de éstos se generarán las iPSC inmaduras, que han adquirido la pluripotencia pero aún conservan la memoria epigenética de la célula original, hasta que finalmente las células iPSC maduras pierden dicha memoria cuando se completa el proceso de reprogramación [86, 87] (Figura 6).

Tras la reprogramación, las células somáticas son dirigidas a un estado pluripotente, muy similar al de las hESC, por lo que adquieren la capacidad de auto-renovación y diferenciación a cualquier linaje celular del organismo adulto [78] (Figura 7).

La generación de iPSC es un gran recurso para la obtención de células específicas de pacientes para llevar a cabo estudios celulares y moleculares de los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades.

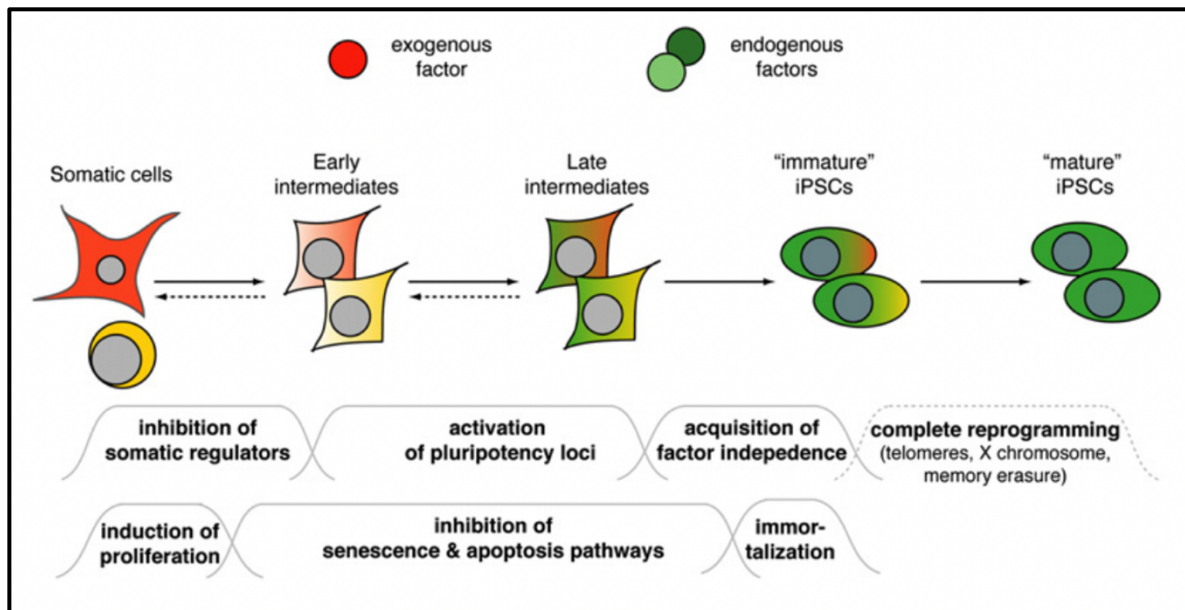


Figura 6. Esquema representativo de la reprogramación celular de células somáticas a iPSC y los cambios que se producen en el proceso. Adaptado de Stadtfeld and Hochedlinger [86].

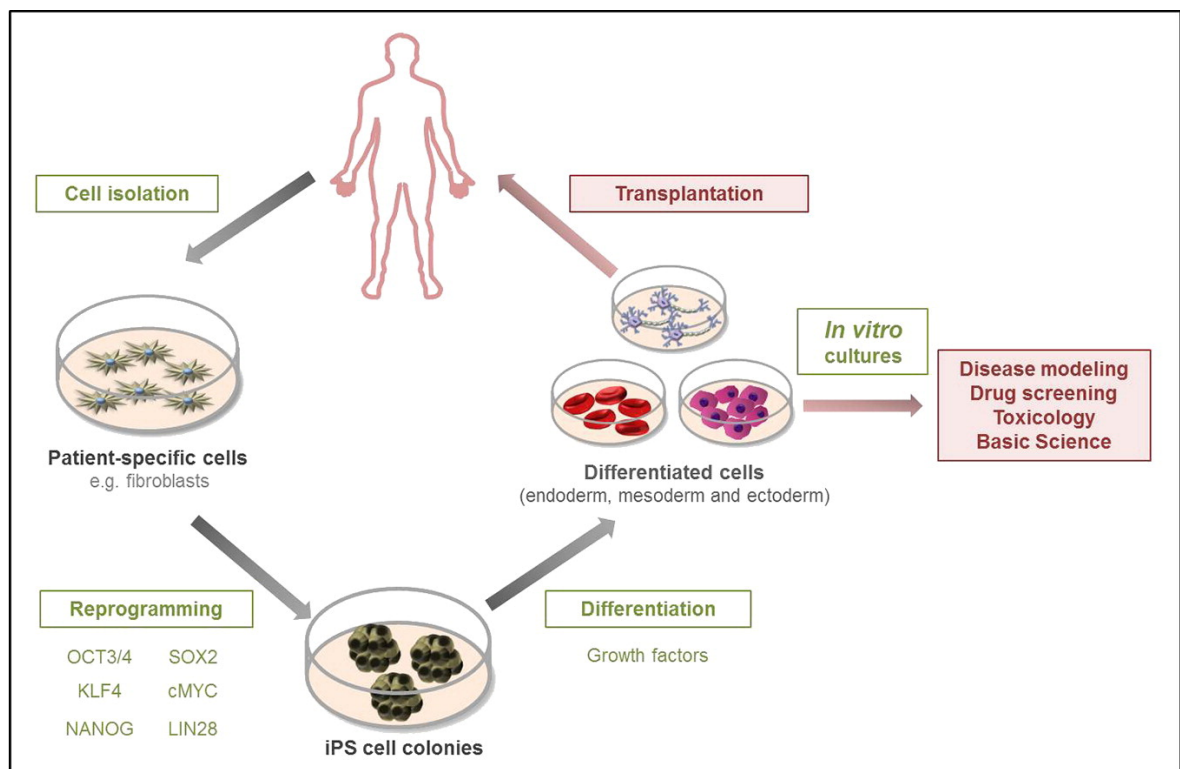


Figura 7. Generación de iPSC por reprogramación celular de células somáticas del propio paciente. Adaptado de De Lázaro *et al* [88].

1.4.3. Aplicaciones potenciales de las hPSC

Las hPSC, debido a su capacidad de expansión ilimitada *in vitro* y diferenciación a cualquier linaje celular poseen diversas aplicaciones con potencial terapéutico tanto para investigación como para su uso en clínica e industria (Figura 8).

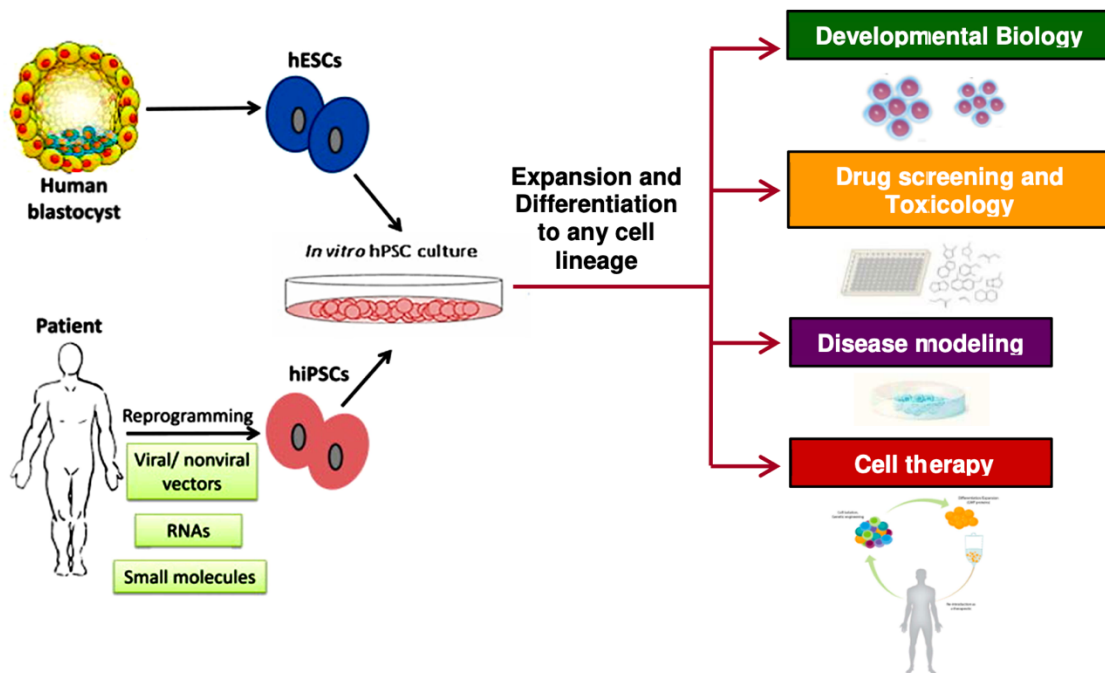


Figura 8. Esquema representativo de las aplicaciones de hPSC en investigación.

Adaptada de Barad *et al* [89]

- **Estudio del desarrollo biológico.** En biología, uno de los principales retos es entender el funcionamiento del desarrollo humano y la evolución de enfermedades, la mayoría de ellas causadas por defectos en el desarrollo o por defectos génicos. La mayor parte del conocimiento sobre el desarrollo humano ha sido extrapolado de estudios con organismos modelo. El ratón ha sido el principal organismo experimental para modelar el desarrollo humano. Ratones y humanos presentan un tamaño genómico similar y comparten el 99% de sus genes, además de presentar grandes similitudes en desarrollo, anatomía y fisiología [90]. Sin embargo, a pesar de ser un potente organismo modelo, tiene notables limitaciones.

Entre humanos y ratones existen diferencias obvias en el desarrollo embrionario, y también diferencias importantes en el desarrollo del sistema inmunológico, por lo que algunas investigaciones sobre enfermedades inmunológicas en ratones no son transferibles a los humanos [91]. Por tanto, se precisan nuevos modelos que recapitulen de manera más exacta el desarrollo humano. Cada vez existen más evidencias que sugieren que la diferenciación *in vitro* de las hPSC recapitula aspectos del desarrollo humano, y que pueden ser usadas como modelo de estudio del desarrollo biológico [92]. Uno de los objetivos más importantes de la investigación con hPSC es conocer mejor los controles genéticos y moleculares implicados tanto en el desarrollo humano como en el desarrollo de las enfermedades, y así poder establecer nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades.

- **Ensayo de fármacos.** El crecimiento ilimitado *in vitro* de las iPSC las hace ideales para la identificación y el ensayo de nuevos fármacos para el diseño de tratamientos específicos, sobre todo para el tratamiento de las enfermedades degenerativas. Los primeros ensayos de fármacos se llevaron a cabo con hepatocitos y cardiomiocitos derivados de iPSC, ya que los resultados son más robustos y fáciles de evaluar [93, 94]. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, la implementación de ensayos de fármacos ha sido más lenta por la complejidad de la patología. El difícil acceso al tejido afectado y la dificultad para crecer estas células *in vitro* por largos periodos de tiempo supone un gran problema en el diseño de fármacos específicos. Por lo que la generación de células neurales derivadas de iPSC de pacientes o donantes sanos supone un gran avance en la detección de compuestos y la evaluación de la eficacia del fármaco. Estas células mantienen los antecedentes genéticos de los pacientes, por lo que modelan con mayor precisión la fisiopatología y los fenotipos específicos de la enfermedad [95].
- **Estudios de citotoxicidad.** La exposición a diversos contaminantes ambientales, como solventes industriales, metales o pesticidas se ha visto incrementada en los últimos años y esto ha provocado un aumento de los defectos en nacimiento tanto en animales como en humanos, además de provocar enfermedades cardíacas, respiratorias, neurodegenerativas o ciertos tipos de cancer [96]. Regularmente, se

han empleado modelos animales para realizar pruebas toxicológicas y establecer las pautas de exposición humana. Sin embargo, los ensayos *in vivo* son costosos y requieren mucho tiempo, por lo que se precisa desarrollar métodos *in vitro*, rápidos y de bajo coste que puedan usarse para detectar sustancias tóxicas para el desarrollo humano o estudiar los niveles toxicidad de ciertos contaminantes o fármacos. El empleo de las hPSC es la mejor alternativa a los ensayos *in vivo*, ya que proporcionan un entorno más similar a las condiciones fisiológicas humanas para los ensayos de citotoxicidad. De hecho, las células procedentes de hESC se utilizan en gran medida en estudios de detección de sustancias tóxicas para el desarrollo humano [97, 98]. Además, el potencial que ofrecen las iPSC en estudios de medicina personalizada ha revolucionado el campo de la toxicología. Las células derivadas de las iPSC son muy utilizadas para ensayos de cardiotoxicidad, hepatotoxicidad y neurotoxicidad [99, 100].

- **Generación de modelos humanos de enfermedad.** La generación de iPSC de pacientes para desarrollar modelos de enfermedad permite profundizar en el estudio de la enfermedad y el diseño de nuevos fármacos para su tratamiento, dado que las iPSC pueden mantenerse de forma ilimitada en cultivo y diferenciarse a cualquier linaje celular. En 2009, Lee empleó iPSC para modelar la patogénesis de la disautonomía familiar [101]. Desde entonces, se ha ampliado el uso de las iPSC en la generación de modelos de enfermedad para estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de estas enfermedades. Hay muchos síndromes causados por la existencia de una o más copias extra de un cromosoma, como es el caso del Síndrome de Down, para el cual se han generado varias líneas iPSC que permitan estudiar el desarrollo de la enfermedad [102]. De hecho, en la actualidad el modelado de enfermedades mediante células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de pacientes ofrece una oportunidad única para estudiar enfermedades neurológicas raras, como puede ser el acúfeno crónico en pacientes con variantes raras en el gen *ANK2*.
- **Medicina regenerativa.** El principal objetivo de la medicina regenerativa es el acceso a cualquier tipo celular de forma ilimitada, que permita la reconstitución de un tejido u órgano lesionado. La falta de donantes es uno de los principales problemas para estos pacientes [103]. El uso de las iPSC ofrece un gran enfoque

para estos tratamientos, ya que las células que se usarán en el trasplante se diferenciarán de las iPSC previamente reparadas y generadas a partir de las células somáticas del propio paciente.

- **Terapia génica.** Este uso derivado de la medicina regenerativa ha supuesto una revolución en la manera de abordar el tratamiento de las enfermedades genéticas, puesto que ha abierto un nuevo horizonte para curar enfermedades para las que hasta el momento solo existían tratamientos orientados a paliar sus síntomas. La terapia génica implica el uso de técnicas que permiten editar o modificar la información genética del paciente para prevenir o curar enfermedades genéticas. A través de la terapia génica se puede conseguir restablecer la función del gen mutado causante de la enfermedad, y la estrategia más común es la introducción de una copia normal de éste en las células. También se puede inhibir o bloquear el funcionamiento de aquellos genes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Para llevar a cabo una terapia génica efectiva, es necesario el uso de vectores adecuados. De todos los vectores virales y no virales que pueden emplearse en terapia génica, los lentivirus son los vectores más utilizados. Son virus de ARN que tienen la capacidad de infectar células independientemente de que estén o no en división, y por tanto poseen una gama más amplia de aplicaciones terapéuticas. Se han realizado esfuerzos considerables para aumentar la seguridad y la eficacia de los lentivirus en el campo de la terapia génica [104]

1.4.4. Aspectos éticos relacionados con la investigación de hPSC

El uso de embriones humanos para la obtención de hESC conlleva un cuidadoso examen de las cuestiones éticas relacionados con la investigación biomédica. El uso de hESC en investigación a veces se ve reducido a causa de estas implicaciones legales. Por el contrario, investigadores y científicos opinan sobre la necesidad de su uso en investigación y el gran potencial médico que ofrecen como terapia génica y su traslado a investigación clínica. Actualmente, se dispone de un mayor acceso a determinados tipos de células madre (mesenquimales, del líquido amniótico, de cordón umbilical, de tejido adiposo o de orina) gracias a la existencia de biobancos que contienen células madre para su uso en clínica o investigación. Actualmente, la generación de iPSC derivadas de células

somáticas de pacientes o donantes sanos minimiza el uso de hESC, pero aun así continua habiendo problemas con el uso de iPSC en investigación y ensayos clínicos. Para minimizar el riesgo de su uso en investigación, se debe obtener el correspondiente consentimiento informado de los donantes y la aprobación del comité ético. No obstante, todos los ensayos clínicos deben ser cuidadosamente diseñados, justificados rigurosamente y llevados a cabo de forma adecuada para proteger los derechos, los intereses y el bienestar de los sujetos del ensayo clínico.

Los ensayos clínicos predominantes con hPSC son para tratar degeneración de la retina, enfermedades neurales, cardíacas y pancreáticas. A finales de enero de 2009, la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) aprobó el primer ensayo clínico de una intervención experimental basada en hESC para lesión de la médula espinal. Las células progenitoras de oligodendrocitos derivadas de hESC remielinizarían los axones de la médula espinal de sujetos con recientes lesiones severas de médula espinal, pero tras intervenir a cuatro pacientes el ensayo fue cancelado por razones de coste. Actualmente, hay una gran variedad de ensayos clínicos que usan hPSC para tratar la degeneración macular, y todos ellos consiguen resultados prometedores con el uso de hESC para el tratamiento de esta enfermedad.

En la actualidad, todos los ensayos clínicos se registran en la web *clinicaltrials.gov*, una práctica común para transmitir legitimidad. La Sociedad Internacional para la Investigación de Células Madre (ISSCR, del inglés *The International Society for Stem Cell Research*) presenta una guía sobre las pautas a seguir en el uso de hPSC en investigación y su traslado a clínica. Estas pautas exigen rigor, supervisión y transparencia en todos los aspectos de la práctica [105].

Por tanto, debe haber un compromiso entre la ética y la finalidad del uso de hPSC para investigación, ya que el progreso técnico-científico debe basarse en la defensa y protección del ser humano.

1.5. RESPUESTAS EVOCADAS AUDITIVAS

La vía auditiva transmite y procesa señales de sonido desde el oído hasta la corteza cerebral. Esta vía se puede explorar utilizando las respuestas evocadas auditivas (REA), también denominadas potenciales evocados auditivos. Se definen como respuestas fisiológicas que representan la actividad dentro del sistema auditivo que es estimulada o evocada por sonidos. Su base consiste en provocar, mediante señales acústicas externas, una activación neural sincronizada de la vía auditiva obteniendo como consecuencia unas respuestas electrofisiológicas objetivas [106]. Sus principales ventajas son su sencillez, objetividad y reproducibilidad.

Los registros representan cambios de voltaje de la actividad cerebral en una fracción de tiempo antes, durante o después de la presentación de un estímulo acústico. Podemos establecer dos categorías principales de este tipo de respuestas electrofisiológicas (Figura 9):

- a) **Potenciales exógenos** u obligatorios: sus componentes van a depender de las características del estímulo como la intensidad, la frecuencia o duración. Entre ellos encontramos la electrococleografía, los Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral (PEATC), los Potenciales Evocados Auditivos de Latencia Media (PEALM) y los potenciales corticales, concretamente las ondas P1-N1-P2. Estos componentes dependen principalmente de las características físicas del estímulo que los ha evocado, teniendo presente que estos últimos componentes también se influyen por la atención que preste el sujeto al estímulo.
- b) **Potenciales endógenos**: sus componentes surgen por procesos psicológicos llevados a cabo por el propio paciente, es decir, reflejan fundamentalmente los aspectos cognitivos del procesamiento de la información [107]. Entre ellos podemos distinguir dentro de los potenciales corticales las ondas N2 y P3 y el potencial negativo de disparidad conocido como (Mismatch Negativity, MMN). No están directamente relacionados con las características físicas del estímulo, puesto que dependen más de la percepción psicológica del sujeto hacia el estímulo y del contexto en el cual esta estimulación es presentada [108].

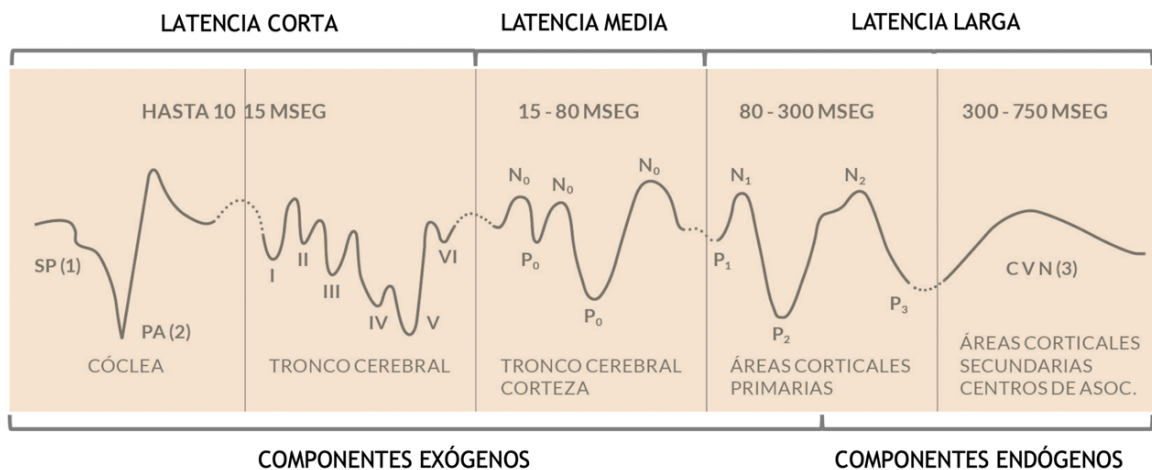


Figura 9. Representación esquemática de las diversas respuestas evocadas auditivas descritas según las diferentes latencias y la endo o exogenicidad de las mismas. Adaptado de *Ciges J et al* [109].

Cada una de las respuestas consta de una serie de picos y/o deflexiones reproducibles, conocidas como ondas, a partir de los cuales se calculan las latencias y las amplitudes. Precisamente estos dos factores van a ser fundamentales para definir las respuestas evocadas auditivas.

a) **Latencia:**

La latencia representa el tiempo transcurrido, en milisegundos (ms) entre la presentación del estímulo y la amplitud máxima de un determinado componente.

Todas estas respuestas tienen una correlación anatómica, cuándo más periférica es la zona estimulada, menor latencia de respuesta, y viceversa (Figura 10). Dependiendo de las latencias, las REA se pueden clasificar en:

- **Electrococleografía (ECOG):** representa la promediación de la actividad electroencefalográfica durante los primeros 2 ms, que corresponde a la respuesta del oído interno y el nervio auditivo. Se compone por el Potencial de Sumación coclear (PS) y el Potencial de Acción del nervio auditivo (PA).

- **PEATC:** representan la actividad electrofisiológica desencadenada hasta los 10ms tras la presentación del estímulo acústico. Corresponde con la respuesta del tronco del encéfalo y colículo inferior en el mesencéfalo.
- **PEALM:** se registran en los 10-60 ms después del estímulo acústico y representan una respuesta cortical temprana caracterizada por una secuencia de ondas positivas y negativas generadas en el tálamo, radiaciones talamocorticales y el inicio del córtex auditivo primario.
- **Potenciales Corticales:** De 10 a 100mseg las respuestas se originan en las vías talamo corticales, corteza auditiva primaria hasta 300mseg y de ahí hasta los 1000mseg (o 1 seg) áreas corticales secundarias o áreas de asociación.

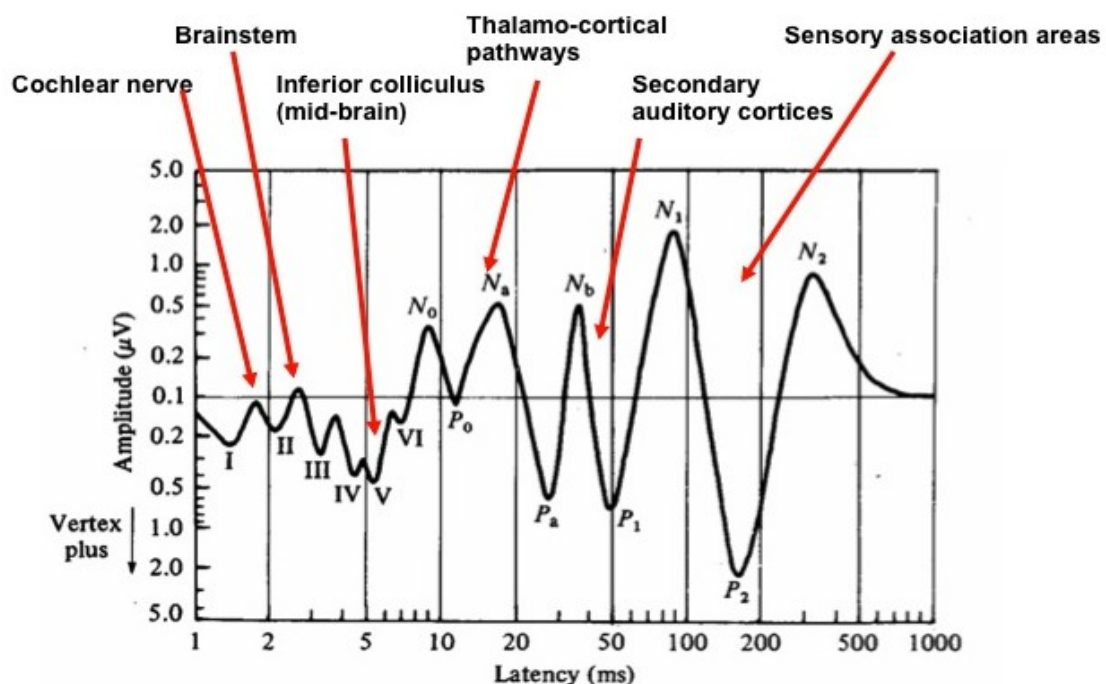


Figura 10. Representación esquemática del registro de REAs teniendo en cuenta las latencias de los diferentes componentes de las mismas. Tomado de *Gordon et al* [110].

b) Amplitud:

La amplitud es la diferencia de potencial registrada entre los diferentes electrodos expresada en microvoltios (μV).

En el estudio de los potenciales auditivos de media y larga latencia, las amplitudes de las respuestas aumentan puesto que la actividad que surge de las regiones superiores del sistema auditivo en la corteza cerebral involucra a millones de poblaciones neuronales y los electrodos también están relativamente cerca de las fuentes de esta actividad. Por lo tanto, estas respuestas tienden a ser algo más grandes en tamaño o amplitud, del orden de 5 a 10 μV . Por el contrario, las respuestas evocadas registradas por el nervio auditivo o el tronco encefálico son mucho más pequeñas, a menudo menos de 0,5 μV , porque surgen de menos neuronas y los electrodos de grabación suelen estar más lejos de los generadores de las respuestas [111] (Figura 11).

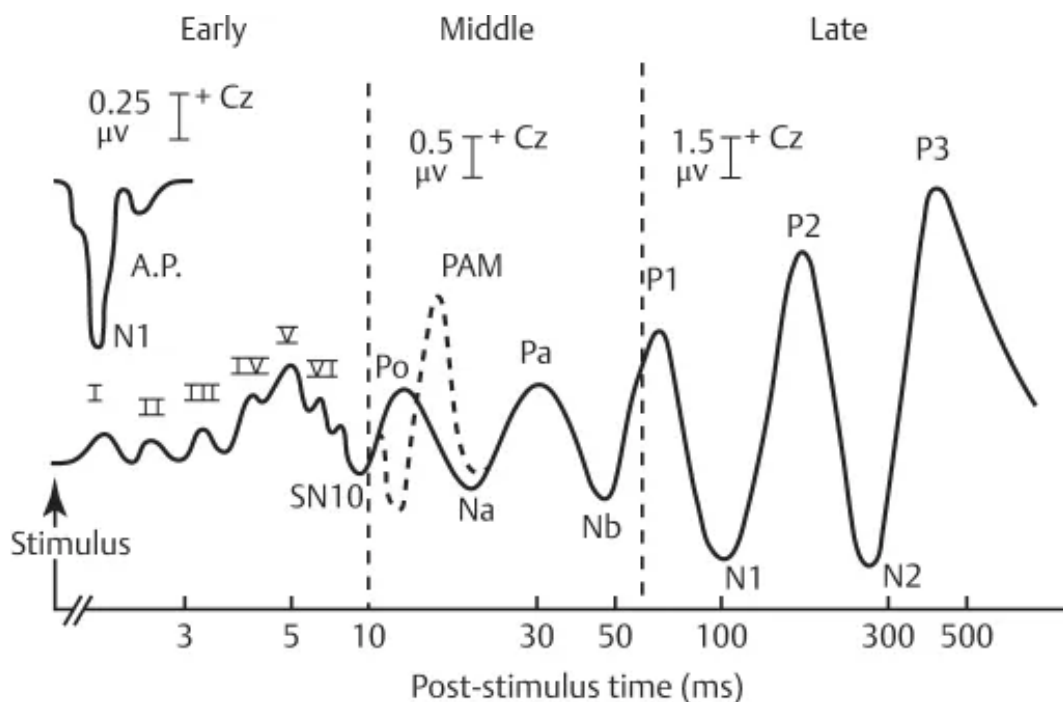


Figura 11. Representación esquemática de la amplitud de los diversos componentes de las REAs.

Tomado de Pérez-González y Malmierca [112].

1.5.1. Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral (PEATC)

Los PEATC constan de 5 ondas fundamentales que reflejan la sincronización de la vía auditiva en los 10 primeros milisegundos tras el estímulo sonoro [113]. La primera onda (I) refleja la actividad de las células ganglionares espirales en la parte distal del nervio auditivo; la onda II explora los núcleos cocleares, ventral y dorsal; la onda III es generada por las células neuronales del complejo olivar superior; y las ondas IV y V se generan por las proyecciones hacia los núcleos en el lemnisco lateral y el colículo inferior [114] (Figura 12). Como hemos comentado anteriormente, estas respuestas electrofisiológicas suelen tener una amplitud inferior a un microvoltio. El éxito a la hora de revelar respuestas verdaderas y fiables depende en gran medida de las técnicas de promediación empleadas para reducir la contaminación acústica, mejorando así la relación señal/ruido [115].

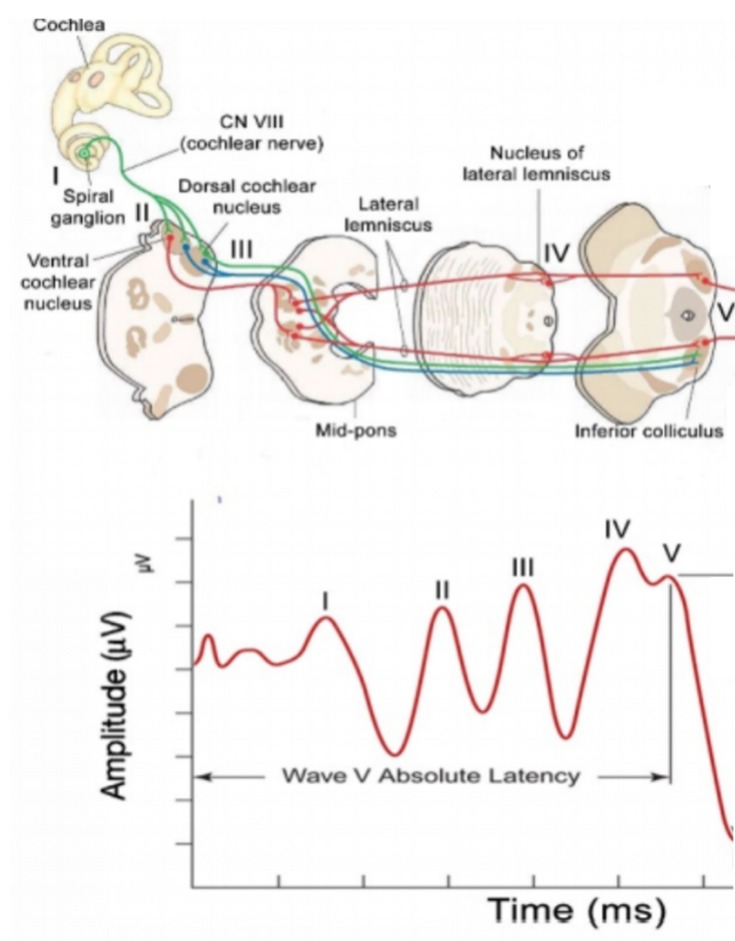


Figura 12. Representación esquemática de los PEATC y sus correspondientes correlaciones anatómicas. Veáanse sus principales componentes, las ondas I, II, III, IV y V.

1.5.1.1 Aplicaciones y relevancia clínica

Los PEATC se han utilizado clínicamente para dos propósitos principales: estimaciones del umbral de audición y neurodiagnóstico. De hecho, los PEATC son una prueba rentable que se utiliza de forma rutinaria en la práctica clínica como medida diagnóstica objetiva para determinar la presencia de pérdida auditiva en recién nacidos, niños pequeños y pacientes a los que resulta difícil realizar pruebas conductuales.

Con independencia de la edad y de las patologías concomitantes, otra de las indicaciones para la aplicación clínica de los PEATC es en aquellos pacientes que, tras sufrir patologías traumáticas laborales, accidentes de tráfico, etc., es necesario determinar un umbral real y objetivo.

También es útil su aplicación en patologías neurodegenerativas y psiquiátricas en que la colaboración en las pruebas subjetivas no va a ser adecuada. De hecho, en las evaluaciones de discapacidades se basan en este tipo de pruebas objetivas, junto a las subjetivas y su correlación, para evaluar el umbral real de audición. También en las evaluaciones de medicina legal y forense se nos pide una aproximación lo más objetiva posible al umbral de audición, aun con las dificultades que pueda imponer el paciente [109]

Por otro lado, es una herramienta clínica importante para identificar la presencia de lesiones retrococleares, neurinomas acústicos y schwannomas vestibulares [116]. Esto se consigue identificando los picos de las ondas I, III y V y comparando los valores absolutos de latencia con los rangos normativos para cada onda. Los valores de latencia de los PEATC normativos, para clics a 70 dB nHL, recogidos en las ondas I, III y V más fiables son, respectivamente, 1,66, 3,68 y 5,64 ms para el oído izquierdo, y 1,66, 3,65 y 5,59 ms para el oído derecho [117].

1.5.1.2 Parámetros dependientes del sujeto

Edad

Los PEATC del recién nacido (RN) difieren en morfología respecto a las ondas que se obtienen en el registro de los adultos. En el RN, la onda I es mayor en amplitud y algo más prolongada en latencia que la del adulto. Por su parte, la onda V del RN tiene aproximadamente la misma amplitud que en el adulto lo que conlleva que en el RN el cociente de la onda V/I sea menor que en el adulto. La latencia más prolongada de la onda I se interpreta como una maduración incompleta en la región de las frecuencias agudas de la cóclea y/o de la transmisión entre las células ciliadas y las fibras del nervio auditivo. La latencia de la onda V está más prolongada en el RN de lo que cabría esperar por el incremento de la latencia de la onda I. La disminución con la edad de la latencia de los intervalos interondas puede ser indicativo de la progresiva mielinización de los axones, del incremento de la sinaptogénesis y del aumento del diámetro de los axones.

Género

Cuando se comparan géneros de la misma edad, las latencias son más cortas y las amplitudes son mayores en las mujeres que en los hombres [118]. Sin embargo, entre diferentes estudios hay diferencias significativas en la latencia de la onda I mientras que en otros no se objetivan dichas diferencias [109].

Sedación

El sueño natural no influye en el registro de los PEATC y permite la realización de este tipo de prueba en recién nacidos y niños pequeños. La sedación farmacológica no suele producir cambios significativos en las latencias de la respuesta; no obstante, se ha demostrado que concentraciones elevadas de anestésicos inhalatorios puedan producir experimentalmente aumentos de la latencia [119]

Tipo de pérdida de audición

Según el tipo de pérdida de audición, la configuración de los distintos componentes de los PEATC puede variar. Las hipoacusias de alta frecuencia muestran un retraso de la onda V a bajas intensidades y un mayor grado de retraso de la onda I a todas

las intensidades; las pérdidas auditivas de baja frecuencia muestran una onda V más temprana a bajas intensidades [120]. Además, los umbrales de audición elevados también reducen la amplitud de las ondas I y V utilizando tonos tipo click y la onda V utilizando tone Burst cuando la frecuencia característica de este tipo estimulación cae dentro de la región de frecuencia de la pérdida auditiva [121].

1.5.1.3 Acúfenos y PEATC

En la investigación del acúfeno, los PEATC se han utilizado para identificar la pérdida de audición oculta inducida por el ruido. Kujawa y Liberman descubrieron que la amplitud de la onda I de ratones disminuía significativamente a niveles moderadamente altos (por encima de 70 dB) hasta 2 meses después de la exposición al ruido, incluso cuando los umbrales auditivos se habían recuperado a valores normales [122]. Además de la reducción de la amplitud, se objetivaron daños en las cintas sinápticas de las células ciliadas internas y las células ganglionares espirales, lo que sugiere que la reducción de la amplitud de la onda I puede ser indicativa de una desaferentación del nervio auditivo. El término “sinaptopatía coclear”, introducido por estos mismos autores, se propuso además para describir el daño en la sinapsis coclear sin pérdida de células ciliadas que determina una pérdida auditiva oculta, un déficit auditivo funcional sin una elevación de los umbrales audiométricos [123].

Los estudio en pacientes con acúfenos y audición normal, considerada como aquellos umbrales ≤ 20 dBHL en las frecuencias entre 0,25-8 kHz, se demostraron amplitudes de onda I reducidas en comparación con controles emparejados sin acúfenos [124, 125]. Sin embargo, en lo que respecta a la amplitud de la onda V, únicamente fue significativamente mayor en el trabajo de Gu et al. [125] mientras que muestran amplitudes normales en otros trabajos. Se ha sugerido que la amplitud normal de la onda V, a pesar de una reducción en la onda I, se debe a que el sistema auditivo central aumenta su capacidad de respuesta neural para compensar la actividad reducida del nervio auditivo. Por tanto, es posible que las personas que padecen acúfenos con normoacusia muestren cambios en la amplitud de componentes de los PEATC que pueden ser indicativos de sinaptopatía coclear (onda I reducida) y de las respuestas compensadas de las regiones centrales/corticales (onda V normal o elevada). Finalmente, este aumento de

la capacidad de respuesta de las regiones centrales generaría una mayor actividad espontánea que conduciría a la generación de acúfenos.

Precisamente, como se describió en el apartado de fisiopatología, este aumento de la sincronía neural se ha propuesto como uno de los mecanismos potenciales de generación del acúfeno [18]. Se postuló que el aumento de la sincronía de la frecuencia de disparo espontánea incluso a nivel periférico del sistema nervioso auditivo podría ser suficiente para producir la percepción de un sonido en ausencia de estimulación externa. La mayor amplitud de la onda V observada en los sujetos con acúfenos podría reflejar una mayor sincronización neuronal en los niveles superiores del sistema auditivo. En resumen, los cambios en la onda I podrían reflejar daños en la periferia y las siguientes modificaciones de la onda podrían reflejar mecanismos de compensación, como una mayor sincronía neural en el acúfeno. Aún así, las modificaciones de la amplitud de las ondas III y V podrían producirse sin estar relacionadas con alteraciones de la onda I. En un estudio reciente, las disminuciones en la amplitud de las ondas III y V no se explicaban adecuadamente por los cambios en la onda I en los participantes de más edad en comparación con los más jóvenes [126]. En este estudio, la reducción de las amplitudes máximas de las ondas III y V, parecía estar vinculada a los efectos del envejecimiento, en lugar de la reducción de la amplitud de la onda I (y el cambio de latencia), que se cree que es consecuencia de la reducción de las aferencias del nervio auditivo.

1.5.2. Potenciales Evocados Auditivos de latencia media (PEALM)

Los potenciales evocados auditivos de latencia media (PEALM) están formados por un conjunto de ondas positivas (ondas "P") y negativas (ondas "N"); la primera onda negativa se denomina Na, seguida de la onda positiva Pa y, por las ondas Nb y Pb, siendo la Pa la más constante y utilizada. Este potencial ocurre entre 10 y 80 milisegundos (ms) después del inicio del estímulo acústico. Parecen tener múltiples generadores, con una mayor contribución de las vías tálamo-corticales, y una menor contribución del colículo inferior y la formación reticular [115] (Figura 13). Dentro de las denominadas vías tálamo-corticales coexisten tanto las proyecciones neuronales de activación como de retroalimentación, lo que les convierte en unos potenciales más difíciles de interpretar que los PEATC y con múltiples variaciones de la normalidad.

En un adulto, las ondas Na, Pa y Nb muestran una excelente definición a intensidades de 10 dBnHL tanto con clicks como con tonos de corta duración. Estos últimos tienen la ventaja de facilitar el umbral auditivo en las frecuencias de 500, 1.000, 2.000 y 4.000 Hz, respectivamente. La utilidad respecto a los PEATC con clicks es su mejor especificidad frecuencia, por la menor dispersión de la energía acústica que se produce en la membrana basilar con el tono respecto a un click. Las latencias aumentan y las amplitudes son de menor voltaje, según disminuye la intensidad del estímulo.

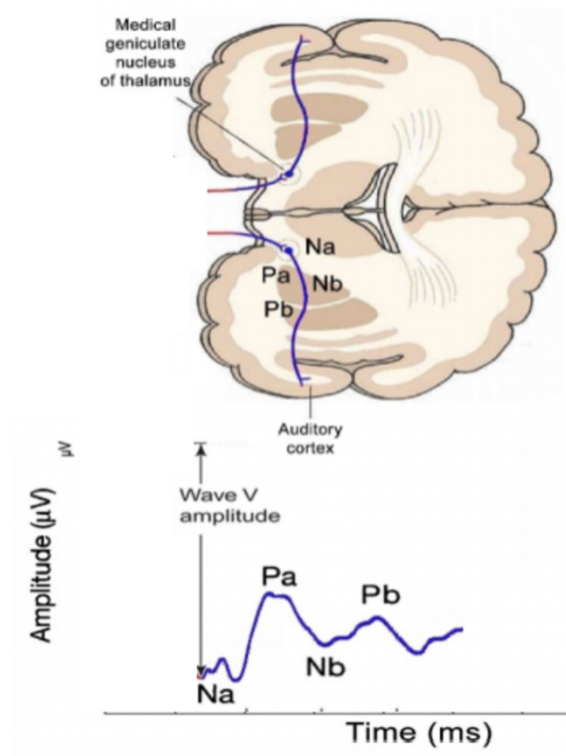


Figura 13. Representación esquemática de los PEALM y sus correspondientes correlaciones anatómicas. Se identifican los principales componentes de este tipo de respuestas evocadas auditivas, onda Na, Pa (la más constante y prominente), Nb y Pb.

1.5.2.1 Aplicaciones y relevancia clínica

Los PEALM sigue siendo una de las mejores opciones para la evaluación objetiva del funcionamiento auditivo de nivel superior y proporciona información valiosa para las funciones de la corteza auditiva primaria y talámica. Poseen sobretodo valor por su

capacidad para poder aportar información sobre las vías auditivas no lemniscales o no primarias, incluido el sistema de activación reticular, y por tanto, se les considera idóneos evaluar los mecanismos de activación sensoriales.

En comparación con los PEATC, estas respuestas evocadas de latencia media dependen menos del disparo sincrónico de fibras nerviosas aferentes en el sistema auditivo. Las señales de mayor duración son efectivas como señales en la medición de los PEALM, mientras que las señales transitorias siempre son necesarias para evocar PEATC. Por lo tanto, los pacientes con sincronía neural comprometida debido a una enfermedad neurológica pueden producir una respuestas neurales de latencia media incluso cuando las respuesta de los PEATC es muy anormal o está ausente [115].

Permiten la estimación electrofisiológica de los umbrales auditivos de pacientes que no producen resultados audiométricos conductuales válidos. Se considera una prueba objetiva en los adultos y niños mayores que estén despiertos. En los simuladores los PLM juegan un papel relevante puesto que se pueden obtener registros consistentes con normoacusia en ausencia de respuesta en sus audiometrías tonales y logaudiometrías. Un componente Pa fiable se detecta típicamente cuando el nivel de intensidad del estímulo está dentro de los 10 dB del umbral de tono puro para la misma región de frecuencia. Por ello, en pacientes seleccionados con ruido electrofisiológico y miogénico mínimo, los PEALM pueden ser más precisos para la estimación del umbral que los PEATC [127].

Desde hace años, los PEALM se consideran un índice electrofisiológico de la función auditiva cortical en poblaciones de pacientes seleccionadas con riesgo de anomalías del sistema nervioso central, incluidos en trastornos del procesamiento auditivo central.

Por último, los PEALM pueden ser utilizados en el diagnóstico de lesiones neurológicas que afecten a la vía auditiva en su recorrido tálamo cortical, como la esclerosis múltiple o las lesiones isquémicas y/o tumorales.

1.5.2.1 Parámetros dependientes del sujeto

Edad

Los PEALM pueden registrarse en recién nacidos con un ritmo de presentación del estímulo adecuadamente lento. El componente Na es inicialmente más prominente. Como reflejo de la maduración, la probabilidad de registrar estas respuestas aumenta sistemáticamente con la edad hasta los 10 años, con una disminución progresiva de la latencia y un aumento de la amplitud para el componente Pa. Los valores de latencia y amplitud de la onda Pa y la onda Pb de los PEALM aumentan con la edad en adultos de edad avanzada, debido probablemente a una pérdida de conexiones inhibitorias que se desencadena con el envejecimiento [128].

Género

Los estudios no han proporcionado pruebas consistentes de diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres para los componentes de los PEALM. Los valores de latencia de las ondas en estos registros parecen ser más largos en los hombres que en las mujeres, lo que concuerda con la influencia general del sexo en los PEATC y no específicamente en los PEALM [115].

Sedación

El sueño es un factor importante en el análisis de los PEALM registrados en niños y, hasta cierto punto, en adultos. Los diferentes componente de estas respuesta auditivas evocadas se registran de forma más consistente en la fase REM del sueño, y generalmente no se detectan en la fase 3 y 4 del sueño [129, 130]. Los agentes anestésicos suelen suprimir la actividad de la AMLR, aunque los efectos de la anestesia sobre la AMLR varían considerablemente según los distintos fármacos [131]. Dado que sueño y la anestesia alteran las latencias y amplitudes de las diferentes ondas, se recomienda la realización de este registro con el individuo despierto y relajado.

Variabilidad de la respuesta en individuos sanos

Una de las características específicas de los PEALM y que pueden condicionar el registro y la interpretación de los resultados son los diferentes tipos de morfologías

posibles para los valores de Na, Pa, Nb y Pb en individuos con umbrales de audición normales. Entre ellas, podemos encontrar las siguientes configuraciones [132]: Pa evidente sin Pb; Picos únicos para Pa y Pb, separados por una ligera pendiente entre ellos; Pa amplia con un pico doble y una pendiente corta entre ellos, y el segundo pico tiene una latencia más baja que la esperada para Pb; Pa y Pb, separados por Nb.

1.5.2.3 Acúfenos y PEALM

Se han descrito componentes de los PEALM de amplitud extremadamente grande en individuos con acúfeno crónico, un efecto que puede estar relacionado con alteraciones en los mecanismos inhibitorios [133]. Diesch et al. no observaron variaciones en la amplitud de los componentes en los grupos con audición normal y con pérdida auditiva. Aunque las amplitudes PEALM aumentan con la edad, las amplitudes muy grandes eran menos frecuentes en el grupo de ancianos que en el grupo de jóvenes con acúfeno severo. Dado que el aumento de la amplitud de los componentes de estas respuestas auditivas evocadas se ha asociado a personas mayores con deterioro cognitivo leve y a personas con acúfeno severo, es posible que los PEALM con mayores amplitudes no sean patognomónicos de ninguna disfunción en particular y que sean el resultado de diferentes mecanismos subyacentes [134].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

El acúfeno como trastorno es un rasgo complejo que se observa en el 1% de la población general. En la fisiopatología molecular del acúfeno severo podría tener un papel relevante la carga de variantes raras en algunos genes.

La hipótesis de este estudio es que los pacientes con acúfeno crónico y variantes raras asociadas al gen *ANK2* presentan unas características clínicas, audiológicas y psicométricas concretas que pueden ayudar a caracterizar el endofenotipo de pacientes con variantes genéticas raras y explicar las diferencias en la autopercepción del acúfeno en este tipo de perfil clínico.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo principal

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es caracterizar el fenotipo de pacientes con acúfeno crónico asociado a variantes raras en el gen *ANK2* mediante la descripción de sus características clínicas, audiológicas y psicométricas.

2.2.2. Objetivos específicos

- 1) Analizar las características clínicas y psicoacústicas de pacientes acúfeno crónico y variantes raras en el gen *ANK2*.
- 2) Evaluar el perfil psicométrico de estos pacientes mediante la utilización de cuestionarios estandarizados sobre calidad de vida, depresión, ansiedad y cognición.
- 3) Comparar la respuesta evocada auditiva de latencia corta y media en este perfil de pacientes teniendo en cuenta variables demográficas, psicométricas y psicoacústicas.

- 4) Generar una línea de células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenida de pacientes con acúfeno severo y mutaciones en el gen *ANK2* y conducirla a la generación de progenitores neuronales y células similares a neuronas para evaluar el efecto de la variante rara en el fenotipo celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COMITÉ DE ÉTICA

El estudio se llevó a cabo siguiendo los principios establecidos en la Declaración de Helsinki, la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, y los requisitos especificados en la legislación española sobre investigación biomédica, protección de datos personales y bioética [135–138]. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Granada (Código NCT04663828, UNification of Treatments and Interventions for Tinnitus Patients - Randomized Clinical Trial, UNITI-RCT). Todos los participantes recibieron información detallada sobre el propósito del estudio y los resultados esperados y firmaron un consentimiento informado específico (*Anexo I*).

3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se seleccionaron pacientes adultos con acúfeno crónico y variantes raras en el gen *ANK2* que fueron seleccionados de las bases de datos de secuenciación del exoma de la enfermedad de Meniere y acúfeno generadas por nuestro grupo [59, 139].

Los participantes fueron reclutados en los Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Clínico Universitario San Cecilio y del Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Se obtuvieron muestras de sangre o saliva para extraer ADN y realizar la secuenciación del exoma según lo descrito [140]. Los análisis bioinformáticos se llevaron a cabo siguiendo el proceso descrito para generar archivos FASTQ para cada participante; las secuencias paired-end fueron mapeadas al genoma de referencia humano GRCh38/hg38, generándose archivos BAM y a partir de estos, las variantes de nucleótido único fueron llamadas en archivos VCF. Todas las variantes raras $MAF < 0.05$ del gen *ANK2* fueron seleccionadas para su análisis mediante herramientas bioinformáticas para evaluar su patogénicidad como se ha descrito previamente [59].

3.2.1. Criterios de inclusión

- Individuos >18 años diagnosticados de acúfeno crónico y variantes raras en el gen *ANK2*.
- Origen étnico europeo.
- Que otorgaron el consentimiento informado para participar en este estudio.

3.2.2. Criterios de exclusión

- Enfermedad otológica asociada (otosclerosis, perforación timpánica).
- Individuos con un origen étnico no caucásico (para evitar la selección de variantes más frecuentes en otras poblaciones).

3.3. CARACTERIZACIÓN PSICOACÚSTICA

3.3.1. Audiometría Tonal Liminar (125-8000 Hz) y alta frecuencia (9000-20.000 Hz)

Se realizó un estudio audiológico exhaustivo de todos los sujetos participantes dentro de una cabina insonorizada (cabina de pruebas audiométricas S40-A, Sibelmed, Barcelona, España), que incluía audiometría de tonos puros (125-8000 Hz) y audiometría de tonos puros de alta frecuencia (9000-20.000 Hz) [141]. Para ello, se utilizó un audiómetro clínico AC40 (Interacoustics, Middelfart, Dinamarca) con auriculares supraaurales A P4493 (RadioEar, Middelfart, Dinamarca) para frecuencias convencionales y auriculares circumaurales DD450 (RadioEar, Middelfart, Dinamarca) para la evaluación de alta frecuencia. Todos los equipos audiológicos se calibraron siguiendo las recomendaciones del fabricante y las normas ISO 389-1 [142] e IEC 60645-1 [143]. Los transductores se calibraron según la norma ISO 389-1. Los umbrales auditivos se determinaron según el método ascendente establecido en la norma ISO 8253-1 (2020) [144].

Para evaluar el nivel medio de audición, se obtuvo la media de tonos puros (PTA) de ambos oídos en cada paciente. Todos los pacientes recibieron breves y concisas

instrucciones para comprender el procedimiento. Dado que todos los pacientes presentaban acúfenos, se les aconsejó que los ignoraran durante esta prueba, para responder únicamente a los tonos de prueba y establecer sus umbrales auditivos. La respuesta del sujeto al tono de prueba se grababa con un botón de respuesta conectado a una señal luminosa. Cada evaluación de frecuencia se iniciaba a un nivel claramente audible, de acuerdo con la edad del paciente. Tras una respuesta positiva satisfactoria, el evaluador redujo el nivel del tono en pasos de 10 dBHL hasta que no se observaran nuevas respuestas. En caso de que no hubiera respuesta, el evaluador aumentaba el nivel del tono en pasos de 5 dBHL hasta que se produjera una respuesta. Una vez registrada la primera respuesta de forma ascendente, se disminuía el estímulo en 10 dBHL comenzando otra serie ascendente de 5 dBHL hasta que el sujeto respondía. Por último, se repitió este procedimiento hasta que el sujeto respondiera al mismo nivel en dos de cada dos, tres o cuatro (es decir, el 50 % o más) respuestas en el ascenso, considerando éste como el nivel de umbral de audición. El umbral se define como el nivel más bajo en el que se producen respuestas en al menos la mitad de una serie de ensayos ascendentes con un mínimo de dos respuestas requeridas a esa intensidad.

3.3.2. Acufenometría

A diferencia de la prueba anterior, para evaluar la caracterización psicoacústica del acúfeno se animó a los individuos a centrarse en su acúfeno. El mismo examinador realizó todas las pruebas audiológicas y se utilizó la misma técnica de acufenometría en todos los pacientes [145].

Se presentaron diferentes frecuencias de tono y volumen. Los participantes debían decidir qué estímulo se acercaba más al tono de su acúfeno (ruido). De esta forma, se introdujeron inicialmente sonidos de banda estrecha comenzando en 1000Hz, y la escala de frecuencias fue ascendiendo/descendiendo según las indicaciones del paciente hasta alcanzar el tono correspondiente al acúfeno percibido, con un rango de 125-16000Hz. Si el paciente no reconocía su acúfeno como un ruido de banda estrecha, se procedió a presentar diferentes ruidos blancos abarcando diferentes grupos de frecuencias hasta que el paciente verificaba cuál de ellos era el sonido más similar a su acúfeno.

A continuación, se determinó la sonoridad comparando estímulos con diferentes niveles de sonoridad (pasos de 5 dB, a partir del umbral de audición). Una vez obtenida esta información, se presentó el sonido enmascarante a la frecuencia identificada en el procedimiento de ajuste del tono del acúfeno, partiendo del umbral de audición. Posteriormente se pidió a los pacientes que informaran del momento en que el sonido enmascarador, presentado en el oído examinado, era lo suficientemente alto como para que su acúfeno no fuera audible. La intensidad del sonido se aumentó de forma ascendente hasta alcanzar un nivel adecuado para enmascarar el acúfeno, definiendo así el nivel mínimo de enmascaramiento (MML). Por último, se examinó la inhibición residual (IR) en el oído afectado. Se consideró que la inhibición era positiva cuando la intensidad del acúfeno disminuía o desaparecía por completo durante un mínimo de 20 segundos.

En los pacientes que presentaban acúfenos bilaterales, se realizó la caracterización de ambos oídos, fueran o no similares ambos acúfenos.

3.4. CARACTERIZACIÓN PSICOMÉTRICA

Se utilizaron 6 cuestionarios para evaluar tres diferentes aspectos psicométricos relacionados con el acúfeno [141]:

a) Impacto del acúfeno en la calidad de vida:

Para ello se aplicaron tres cuestionarios: 1) la versión española del Tinnitus Handicap Inventory (THI), el cuestionario de discapacidad del acúfeno [146]; 2) una adaptación de la Escala Visual Analógica (EVA) [147]; y 3) la versión española del test de hipersensibilidad al sonido (THS-GÜF) [148].

b) Depresión y ansiedad relacionados con el acúfeno

Para ello se utilizaron dos cuestionarios estandarizados: 1) Cuestionario de Salud del Paciente adaptado al español (PHQ-9) [149] y 2) la versión española de la Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HADS) [150].

c) Deterioro Cognitivo asociado en pacientes con acúfeno

Se utilizó la versión española de la Evaluación Cognitiva de Montreal (MoCA) [151].

3.4.1. Cuestionarios de calidad de vida

3.3.1.1 Escala Visual Analógica (EVA) (Anexo 2)

La escala visual analógica (EVA) es una escala psicométrica que puede utilizarse como cuestionario y es un instrumento para medir características subjetivas que no pueden medirse directamente. Al responder a un ítem de la EVA, los encuestados especifican su nivel de acuerdo con una afirmación previa indicando una posición a lo largo de una línea recta entre dos puntos finales, normalmente de 0 a 10 (mínimo-máximo). Se ha aplicado ampliamente en distintos campos de la medicina, para la evaluación del dolor o la calidad de vida. En nuestro estudio, utilizamos esta escala para evaluar de forma subjetiva la intensidad, molestia y angustia percibidas relacionadas con el acúfeno.

3.3.1.2. Tinnitus Handicap Inventory (THI) (Anexo 3)

Se utilizó el Tinnitus Handicap Inventory (THI), en su versión estandarizada y adaptada al español en 2001 [146]. En este estudio de validación, la versión adaptada al español presentó una buena equivalencia con la versión original, con buenos niveles de consistencia interna y reproducibilidad. Este cuestionario se ha establecido como una de las mejores herramientas para la evaluación de la discapacidad provocada por el acúfeno en todos los pacientes con esta patología [152].

La forma de puntuación de este cuestionario permite obtener 5 grados de discapacidad relacionada con el acúfeno [153]:

- 1) 0-16 puntos (acúfeno ligero): Sólo se oye en ambiente tranquilo, y se enmascara muy fácilmente. No interfiere en el sueño ni en las actividades cotidianas.

- 2) 18-36 puntos (acúfeno leve): El acúfeno se enmascara fácilmente con los sonidos ambientales y se olvida fácilmente con las actividades. Puede interferir ocasionalmente con el sueño, pero no con las actividades cotidianas.
- 3) 38-56 puntos (acúfeno moderado): Puede notarse, incluso en presencia de ruido ambiental o de fondo, aunque pueden seguir realizándose las actividades cotidianas.
- 4) 58-76 puntos (acúfeno grave): Se oye casi siempre y rara vez, o nunca, se enmascara. Provoca alteraciones del patrón de sueño y puede interferir en la capacidad para realizar las actividades cotidianas normales. Las actividades tranquilas se ven afectadas negativamente.
- 5) 78-100 puntos (Acúfeno catastrófico): Se oye siempre, trastornos del sueño, dificultad para realizar cualquier actividad.

3.3.1.3. Test de Hipersensibilidad al sonido THS-GÜF (Anexo 4)

Para la evaluación de la hiperacusia se utilizó el test de hipersensibilidad al sonido (THS) o su nomenclatura alemana *Geräuschüberempfindlichkeit* (GÜF) de Nelting, que es un cuestionario que mide el grado de incapacidad de un individuo en relación al acúfeno [154]. La versión estandarizada y adaptada al castellano consiguió elevados niveles de consistencia y reproducibilidad [148]. Para su utilización se tienen en cuenta 15 preguntas que evalúan tres dimensiones o subescalas: 1) comportamiento cognitivo en relación con la hiperacusia; 2) comportamiento somático o reacciones ligadas a determinadas situaciones y por último, 3) reacciones emocionales.

Según la puntuación obtenida, se han definido cuatro grados de afectación:

- 1) 0-10 puntos: Incapacidad leve (grado I)
- 2) 11-17 puntos: Incapacidad moderada (grado II)
- 3) 18-25 puntos: Incapacidad severa (grado III)
- 4) 26-45 puntos: Incapacidad muy severa (grado IV)

3.4.2. Cuestionarios de ansiedad y depresión

3.3.2.1 Cuestionario de salud del paciente (*Patient Health Questionnaire, PHQ- 9*) (Anexo 5)

El *Patient Health Questionnaire* (PHQ-9) es uno de los cuestionarios que ha alcanzado mayor reconocimiento a nivel internacional gracias a su capacidad para identificar la gravedad de los síntomas en personas con trastorno depresivo [155].

Se trata de una encuesta de autoevaluación diseñada para ser aplicada en el campo de la atención primaria, que ha sido validada, y que no sólo permite realizar un cribado de pacientes con trastorno depresivo, sino que es útil, además, para definir la severidad de dicho cuadro y optimizar el seguimiento durante el tratamiento [156]. En nuestro estudio se utilizó la versión validada y adaptada al castellano para poder detectar casos de depresión entre los individuos de nuestra muestra [149].

Los resultados permiten al evaluador establecer si existe o no existen síntomas depresivos y, si los hay, clasificar el nivel de gravedad de la depresión:

- 1) 1-4 puntos: Ausencia de depresión
- 2) 5-9 puntos: depresión leve
- 3) 10-14 puntos: depresión moderada
- 4) 15-19 puntos: depresión moderadamente severa
- 5) 20-27 puntos: depresión severa

En general, se considera que puntuaciones a partir de 10 son paciente que van a requerir intervención, ya sea asesoramiento, seguimiento y/o tratamiento farmacológico.

3.3.2.2 Escala hospitalaria de ansiedad y depression (*Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS*) (Anexo 6)

Esta escala es una herramienta de cribado utilizada en pacientes no psiquiátricos; consiste en una autoevaluación de 14 ítems diseñada para medir la ansiedad, la depresión y el malestar emocional, y excluye los síntomas somáticos para evitar la confusión por este tipo de sintomatología [157]. Se utilizó la escala adaptada y validada al castellano

que previamente ya había mostrado buen grado de reproducibilidad y consistencia interna [150].

Consta de subescalas independientes para ansiedad y depresión. De esta manera, los 7 reactivos de ansiedad se dirigen a conocer si la persona ha estado tensa, preocupada o ha tenido sensaciones de temor. Por su parte, los 7 reactivos de la subescala de depresión indaga, básicamente, cuestiones como la pérdida de interés en las actividades cotidianas, tener pensamientos pesimistas o incapacidad de reír. Las puntuaciones en cada subescala se interpretan de la siguiente forma:

- a) 0-7 puntos: rango de normalidad.
- b) 8-10 puntos: consideración de posible caso de ansiedad o depresión.
- c) 11-21 puntos: sintomatología relevante; caso probable de ansiedad o depresión.

3.4.3. Herramienta de evaluación de deterioro cognitivo

3.3.3.1 Evaluación Cognitiva de Montreal (Montreal Cognitive Assessment, MoCA) (Anexo 7)

Este instrumento fue desarrollado como método de screening de deterioro cognitivo leve demostrando una alta fiabilidad test-retest, buena consistencia interna y equivalencia con una estrecha correlación entre las puntuaciones del MMSE (MiniMental State Examination) [158]. Se utilizó la versión adaptada y validada al castellano en nuestra serie de pacientes para la detección de disfunciones cognitivas leves en casos de acúfeno crónico [151].

El MoCA examina las siguientes habilidades: atención, concentración, funciones ejecutivas (incluyendo la capacidad de abstracción), memoria, lenguaje, capacidades visuoconstructivas, cálculo y orientación. La puntuación máxima es de 30; una puntuación igual o superior a 26 se considera normal, mientras que puntuaciones menores se consideran indicativas de probable caso de deterioro cognitivo leve.

3.5. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO

3.5.1. Metodología para el registro de las REA

3.4.1.1 Entorno

Las pruebas electrofisiológicas auditivas que se realizaron en nuestra serie de pacientes con acúfeno crónico y variantes raras en el gen *ANK2* fueron PEATC y PEALM. Debe tenerse en cuenta que para evaluar el umbral de audición es preferible disponer de un entorno acústicamente silencioso; para ello se utilizó una sala adecuada para pruebas electrofisiológicas, con interferencias eléctricas mínimas. Los pacientes se tumbaron en una camilla dispuesta para ello, que les permitiera estar relajados.

3.4.1.2 Electrodo

La piel se preparó con una pasta abrasiva delicada antes de la aplicación de los electrodos. Se utilizaron electrodos desechables tipo EEG con pasta conductora, de un solo uso para cada paciente. Por supuesto, se cumplieron estrictamente las políticas locales de desinfección y limpieza de la camilla y el cableado entre cada uno de los pacientes. En todos los casos, se aseguró que las impedancias entre electrodos fueran inferiores a $3K\Omega$ y estuvieran equilibradas en la medida de lo posible entre pares de electrodos. La configuración topográfica de los diferentes electrodos fue la siguiente: el electrodo rojo detrás de la oreja derecha, el electrodo azul detrás de la oreja izquierda, el electrodo blanco en la línea media de la frente, 1-2 cms a la derecha sobre las cejas y el electrodo negro 1-2 cms sobre el blanco (Figura 14).

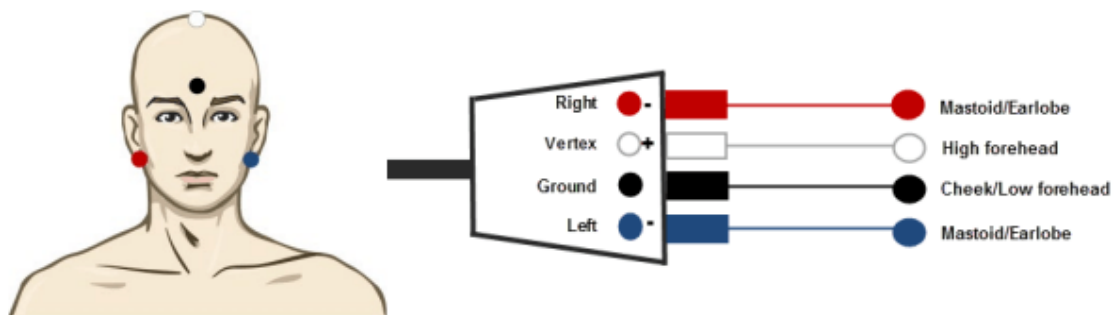


Figura 14. Protocolo de colocación de los electrodos para el registro de REAs. Tomado de *Schoisswohl et al* [40].

3.4.1.3 Dispositivo de registro

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando el equipo Eclipse EP25 (Interacoustics®) y auriculares de inserción IP30.

3.4.1.4 Procedimiento de registro

A cada uno de los pacientes se le explicó detenidamente y de forma comprensible los pasos que se iban a seguir: frotar la frente y las mastoides, aplicar un gel y unos electrodos adhesivos, e introducir unos cascos de inserción en cada oído. Además, a cada uno de los pacientes se les explicó que iban a oír una serie de sonidos tolerables y que no le iban a resultar perjudiciales. Únicamente tenían que permanecer relajados y sin moverse y, si por alguna circunstancia había algún problema, agitarían la mano y el procedimiento se detendría inmediatamente.

Las respuestas auditivas evocadas de tronco cerebral (PEATC) y las respuestas auditivas de latencia media (PEALM) se obtuvieron según los parámetros definidos en el Protocolo UNITI de estudio [159] y establecidos por Manta et al. [160] (Figura 15).

3.4.2 Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral

El tipo de estímulo utilizado para el registro de las ondas de los PEATC fue un click de 1000Hz de polaridad alternante, con una tasa de estimulación de 22 estímulos por segundo, a unos niveles de intensidad de 70 y 80 dBnHL. El número de estímulos totales considerados para cada onda evocada fue 4000. La señal registrada fue filtrada utilizando un filtro de paso alto ajustado a 33 Hz, 6 dB/octava, y un filtro de paso bajo ajustado a 1500 Hz. La frecuencia de muestreo fue de 30 kHz.

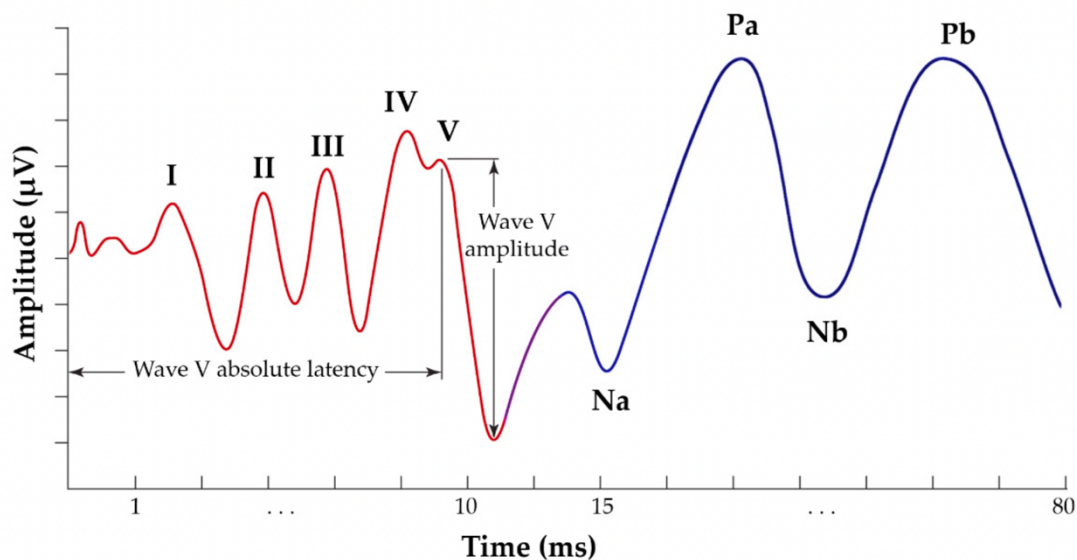


Figura 15. Esquema representativo del registro obtenido de cada uno de los pacientes de nuestra serie. Tomado de Manta et al [160].

3.4.3 Potenciales Evocados Auditivos de Latencia Media

Para el registro de las diferentes ondas de los PEALM, el estímulo utilizado fue un tone burst de 2 kHz, con polaridad de rarefacción, con una duración de 28 ondas sinusoidales, presentada a una frecuencia de 6,1 Hz/s y a un nivel de intensidad de 70 y 50 dBnHL. El número de estímulos totales considerados para cada onda evocada fue 500. La señal adquirida fue filtrada con un filtro de paso alto ajustado a 10 Hz, 12 dB/octava, y un filtro de paso bajo ajustado a 1500 Hz. La frecuencia de muestreo fue de 3 kHz.

3.6. DERIVACIÓN CELULAR Y CULTIVO

La generación de la línea celular sana PBMC1-iPS4F1 y posterior caracterización celular fue derivada de una mujer española y publicada previamente [161]. La línea iPSC de la paciente, ANK2-24, se obtuvo reprogramando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), transduciendo las células con vectores no integrativos del virus Sendai (SeV) que contenían los factores de reprogramación *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, y *c-MYC* (CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit, ThermoFisher Scientific). Ambas líneas de hiPSC se mantuvieron en medio mTeSR1 (STEMCELL Technologies) a 37 °C y 5% de CO₂ y se pasaron cuando fue necesario (Figura 16).

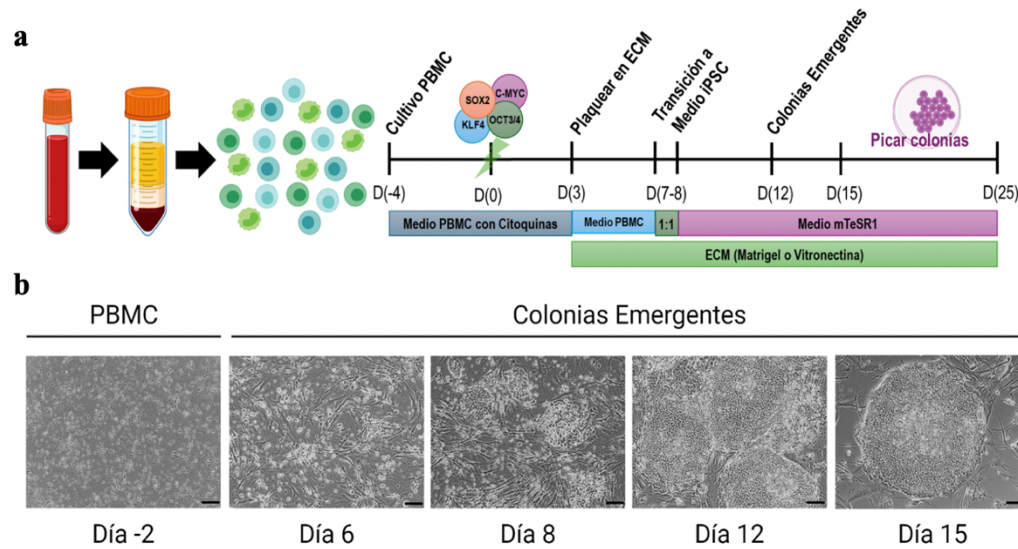


Figura 16. (a) Protocolo usado simplificado para obtener iPSC. (b) Imágenes de Microscopia del proceso de conversión de PBMCs a iPSC de la línea ANK-24 [162].

3.6.1. Diferenciación de iPSCs en neuronas del oído interno

Utilizamos un protocolo de diferenciación neuronal basado en Boddy et al., 2020 [163] para generar neuronas del oído interno (NOIs). El protocolo de diferenciación consta de 2 fases. La fase 1 consiste en la generación de progenitores neuronales óticos (PNO), y la fase 2 es la formación de NOIs.

3.5.1.1 Generación de Progenitores óticos Neurales derivados de hiPSCs (fase 1)

Para diferenciar las hiPSCs en progenitores óticos neurales (PON), se siembran a una densidad de 8000 células/cm² en medio DFNB (DMEM/F12 con Glutamax (Gibco, UK) suplementado con 1x N2 y 1x B27 (ambos Gibco, USA) suplementado con 50 ng/ml FGF3 (Palex Medical, Spain), 50 ng/ml FGF10 y 10uM IWR-1 (ambos R & D Systems, UK) en placas de cultivo de 6 pocillos recubiertas de laminina. El medio de cultivo celular se cambió cada dos días hasta el día 8. El día 9, el medio de cultivo se cambió a DFNB suplementado con 25ng/ml de FGF3, 25ng/ml de FGF10 y 2uM de BIO (Sigma Aldrich, EE.UU.) hasta el día 12 con un cambio de medio cada dos días.

Después de la fase 1, las PONs se cultivan en DFNB suplementado con 20ng/ml de bFGF, 50 ng/ml de IGF (ambos Peprotech, Reino Unido) y 20ng/ml de EGF (R & D Systems, Reino Unido) a una densidad de 20.000 células/cm².

3.5.1.2 Tiempo de duplicación celular y ensayos de viabilidad celular

Realizamos ensayos de tiempo de duplicación celular y de proliferación celular para diferenciar PON en NOI en un rango adecuado de pases de cultivo. El tiempo de duplicación celular se consigue sembrando 4000 células/cm² en el día 0 en placas de cultivo de 12 pocillos recubiertas de gelatina al 0,2%. El número de células se determina mediante recuento diario en una cámara de Neubauer durante 4 días. Además, se realizan ensayos de viabilidad celular utilizando el reactivo CellTiter96 Aqueous One Solution Reagent (Promega, EE.UU.), un método colorimétrico para determinar el número de células viables en proliferación. Para ello, los PNOs se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² el día 0 en una placa de cultivo de 96 pocillos previamente recubierta con gelatina. El día 4, se añadió el reactivo CellTiter96 al cultivo celular y, a las 3 horas, se determinó la viabilidad celular por absorbancia en un lector Infinite M200 Nanoquant (Tecan, Suiza).

3.5.1.3 Generación de neuronas sensoriales del oído interno a partir de progenitores neuronales óticos derivados de iPSC (fase 2)

Los cultivos de PON derivados de iPSCs se disociaron utilizando una solución de tripsina 1:10 (Sigma-Aldrich, Reino Unido) y se sembraron a una densidad de 4000 células/cm² en placas de cultivo de 6 pocillos recubiertas de gelatina en medio DFNB suplementado con 20 ng/ml de bFGF (PeproTech, Reino Unido) y 500 ng/ml de Shh-C24II humano (Miltenyi Biotec, España). A partir del séptimo día, el Shh-C24II y el bFGF se eliminan del medio de cultivo celular. Las células se lisaron para la extracción de ARN y proteínas en los días 0, 7, 14 y 21 y se fijaron para la tinción de inmunofluorescencia en los días 14 y 21.

3.6.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizamos el High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Suiza) para aislar el ARN total de los lisados celulares. A continuación, utilizamos el kit de síntesis de ADNc de primera cadena de Maxima para RT-qPCR con dsDNasa (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). La Q-PCR se realizó con Sybr Green (Quantabio, MA, EE.UU.) y 10ng/uL de ARN total por reacción en el termociclador de PCR en tiempo real QuantStudio 6 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La cuantificación relativa se realizó utilizando GAPDH como gen de referencia. Los cambios en los pliegues de cada gen se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ frente a la PNO indiferenciada del día 0. Todos los cebadores (Sigma Aldrich, EE.UU.) utilizados figuran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores utilizados en la RT-qPCR

CEBADOR	5' → 3' FORWARD	5' → 3' REVERSE
ANK2	CTGAGAAATGGTGCCCTTGTTG	ATGTTGTAGAAGCAGCTGGACA
PAX8	GAACCCTACCATGTTTGCTG	TAGGGAGGTTGAATGGTTGCTG
FOXG1	AAGAACTTCCCTTACTACCGCG	CTTCACGAAGCACTTGTTGAGG
B-III-TUBULIN	CATGGACGAGATGGAGTTCACC	CTTCGTACATCTCGCCCTCTTC
GAPDH	GACAACTTTGGTATCGTGGAAG	CAGTAGAGGCAGGGATGATGTT

3.6.3. Tinción de inmunofluorescencia

Las células se fijan con paraformaldehído al 4% (Sigma Aldrich, EE.UU.) en 1x solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizan y se bloquean con Triton-X al 0,3% (Sigma Aldrich, EE.UU.) y albúmina sérica bovina al 3% (BSA; Sigma Aldrich, EE.UU.) en PBS durante 30 minutos. Las células se incuban con anticuerpos primarios (Tabla 2) en BSA al 3% en PBS durante toda la noche a 4°C. Se añaden anticuerpos secundarios en BSA al 10% en PBS y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, los núcleos se tiñen con 1 µg/mL de Hoechst (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) durante 5

minutos. Los anticuerpos (todos Thermo Fisher Scientific) y las diluciones utilizadas en este estudio se indican en la Tabla suplementaria 2. Las células se visualizan en un microscopio confocal Zeiss LSM 710 (Zeiss, Alemania). Todas las imágenes se capturan utilizando ajustes idénticos para la cuantificación posterior. El software ImageJ (NIH) [164] se utiliza para el procesamiento de imágenes y análisis. Los controles negativos se determinan omitiendo los anticuerpos primarios durante la inmunofluorescencia. El software ImageJ se utiliza para determinar la cuantificación de ANK2 contando las células con las morfologías características en los días 14 y 21 de la diferenciación neuronal. Los resultados se presentan como intensidad media de fluorescencia/célula de 100 células totales $\pm$ SEM.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia y Western Blot

ANTICUERPO	HUÉSPED	DILUCIÓN	PROVEEDOR	REFERENCIA
ANK2	rabbit	1:50	Invitrogen (Sweden)	PA5-82326
PAX8	mouse	1:30	Sigma Aldrich (USA)	SAB1404559
FOXG1	rabbit	1:100	Invitrogen (Taiwan)	PA5-117404
POU4F1/BRNA3	rabbit	1:200	Bioss (USA)	BS-3669R
B-III-TUBULIN	mouse	1:100	Invitrogen (Czech Republic)	MA1-19187
ALEXA FLUOR 488 ANTI-RABBIT IGG	goat	1:700	Invitrogen (USA)	A11008
ALEXA FLUOR 555 ANTI-MOUSE IGG	donkey	1:700	Invitrogen (USA)	A31570
GAPDH	chicken	1:2000	Sigma Aldrich (USA)	SAB3500247
ANTI-CHICKEN IGY (IGG)	rabbit	1:2000	Sigma Aldrich (USA)	A9046

3.6.4. Análisis Western Blot

Para la extracción de proteínas totales, los cultivos de neuronas sensoriales del oído interno procedentes de PNO derivadas de hiPSCs del día 0 al día 21, se lisaron utilizando Cell Lysis Buffer 10X (Cell Signaling Technology, EE.UU.) que contenía un cóctel

inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich, EE.UU.). Los lisados celulares se separaron por peso molecular utilizando geles de poliacrilamida prefabricados (Bio-Rad, EE.UU.) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, EE.UU.). Las proteínas se detectaron utilizando el sistema ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, EE.UU.). Para detectar ANK2 se utilizó el anticuerpo policlonal Ankyrin B (PA5-82326, Invitrogen). Se utilizó un anticuerpo GAPDH (SAB3500247, Sigma Aldrich) como control de carga para las extracciones de proteínas totales. El Western blot se llevó a cabo mediante procedimientos estándar. El procesamiento de imágenes y la cuantificación de la intensidad de las bandas se realizaron con el software Image Lab (Bio-Rad, EE.UU.)

4. RESULTADOS

4.1. DATOS DEMOGRÁFICOS

Nuestra serie de casos estaba formada por 12 pacientes con acúfeno y variantes heterocigotas en el gen ANK2 (Tabla 3). Los individuos reclutados tenían más de 18 años, con edades comprendidas entre 46 y 72 años ($57 \pm 7,9$). La distribución por sexo fue de diez mujeres y dos hombres. Utilizando los criterios de hipoacusia descritos en el Protocolo de estudio UNITI [159], definida como umbrales tonales $\leq$ a 30dB en cualquier frecuencia comprendida entre 500 y 4000Hz, diez pacientes tenían hipoacusia bilateral y dos hipoacusia unilateral. Como era de esperar, en todos los casos ($n=12$) se pudo confirmar una hipoacusia de alta frecuencia al explorar las frecuencias comprendidas entre 9000 y 20000Hz (Figura 17). Por otra parte, se obtuvieron datos sobre el periodo de tiempo desde que el paciente refiere la aparición de su acúfeno. Habitualmente una vez instaurado el acúfeno este suele convertirse en un síntoma crónico; todos los pacientes de nuestra serie tenían acúfenos duraderos, diez pacientes de más de 20 años de evolución y dos sujetos con un periodo de evolución de entre 10 y 15 años.

4.2. EVALUACIÓN PSICOACÚSTICA

En nuestro estudio se realizó a todos los pacientes una acufenometría para caracterizar psicoacústicamente el acúfeno mediante la obtención del tipo y frecuencia fundamental, umbral, intensidad, MML e IR. Todos los individuos refirieron acúfenos persistentes, unilaterales y siempre ipsilaterales con la pérdida de audición (Tabla 4). Durante el procedimiento, ocho pacientes se refirieron a su acúfeno como un ruido blanco, y cuatro fueron capaces de definirlo como sonidos de banda estrecha centrados en varios espectros de frecuencia (125, 250, 3000 y 6000 Hz, respectivamente). La intensidad del mismo presentó una variación de 2-16 dB SL con una media de 5,92 dB SL, mientras que el MML varió entre 3 y 25 dB SL con una media de 9,67 dB SL. En cuanto a la inhibición residual, ninguno de los pacientes mostró una inhibición completa del acúfeno tras la exposición a ruido durante 1 minuto. Cuatro pacientes informaron de una reducción parcial del acúfeno, y el resto de los casos no informaron de ninguna inhibición residual.

Tabla 3. Variantes portadas por los individuos estudiados en el gen *ANK2*.

ID	Variant	Protein	Consequence	CADD score	Allelic frequency			Patient
					gnomAD	gnomAD NFE	CSVS	
rs3112980	NC_000004.12:g.113145983G>A	-	Intronic	7.637	1.02E-01	1.48E-01	1.49E-01	1, 8, 10, 11
rs7689214	NC_000004.12:g.113145989G>A	-	Intronic	18.330	2.13E-01	1.87E-01	1.52E-01	9, 11
rs29341	NC_000004.12:g.113292475C>T	NP_001139.3:p.Val779=	Synonymous	10.040	3.45E-02	3.87E-02	3.60E-02	4, 9
rs3736575	NC_000004.12:g.113336045C>T	NP_001139.3:p.Arg1193=	Synonymous	0.513	2.34E-01	1.01E-01	1.03E-01	1, 3, 4, 8
rs149678604	NC_000004.12:g.113353074G>C	NP_001139.3:p.(Val1486Leu)	Missense	18.120	6.63E-04	4.96E-04	1.00E-03	2, 11
rs33966911	NC_000004.12:g.113354087C>T	NP_001139.3:p.Pro1823=	Synonymous	1.474	7.55E-02	1.14E-01	1.15E-01	1, 5, 8
rs3796928	NC_000004.12:g.113354786C>G	NP_001139.3:p.Leu2056=	Synonymous	0.462	1.10E-01	2.32E-02	3.60E-02	4
rs28377576	NC_000004.12:g.113355724T>C	NP_001139.3:p.(Val2369Ala)	Missense	3.796	1.26E-01	1.18E-01	1.25E-01	1, 5, 8, 12
rs3733615	NC_000004.12:g.113355728A>G	NP_001139.3:p.Gln2370=	Synonymous	5.746	2.76E-01	1.58E-01	1.83E-01	1, 3, 4, 5, 8
-	NC_000004.12:g.113355946T>G	NP_001139.3:p.(Leu2443Arg)	Missense	28.100	-	-	-	1
rs3733617	NC_000004.12:g.113357121C>T	NP_001139.3:p.(Pro2835Ser)	Missense	0.634	1.43E-01	3.98E-02	5.80E-02	3, 4
rs10013743	NC_000004.12:g.113358266A>G	NP_001139.3:p.Glu3216=	Synonymous	0.677	1.26E-01	1.18E-01	1.24E-01	1, 5, 8
rs34270799	NC_000004.12:g.113358518C>A	NP_001139.3:p.(Ser3300Arg)	Missense	24.000	1.96E-02	2.93E-02	2.50E-02	5, 9, 10
rs66785829	NC_000004.12:g.113365051T>A	NP_001139.3:p.(Val3634Asp)	Missense	24.100	1.98E-03	2.57E-03	4.00E-03	12
rs2293324	NC_000004.12:g.113373152T>C	NP_001139.3:p.His3891=	Synonymous	0.014	2.99E-01	1.57E-01	1.85E-01	1, 3, 4, 5, 11
rs45454496	NC_000004.12:g.113373381G>A	NP_001139.3:p.(Glu3931Lys)	Missense	23.300	2.30E-03	3.44E-03	3.00E-03	7
rs35446871	NC_000004.12:g.113381478C>T	-	3' UTR	5.291	3.04E-02	3.33E-02	4.10E-02	3, 6, 8

ID: Identificador de polimorfismo de nucleótido único de referencia; gnomAD: Población global de Genome Aggregation Database; gnomAD NFE: Población europea no finlandesa de Genome Aggregation Database; CSVS: Población española de Collaborative Spanish Variant Server; UTR: Región no traducida.

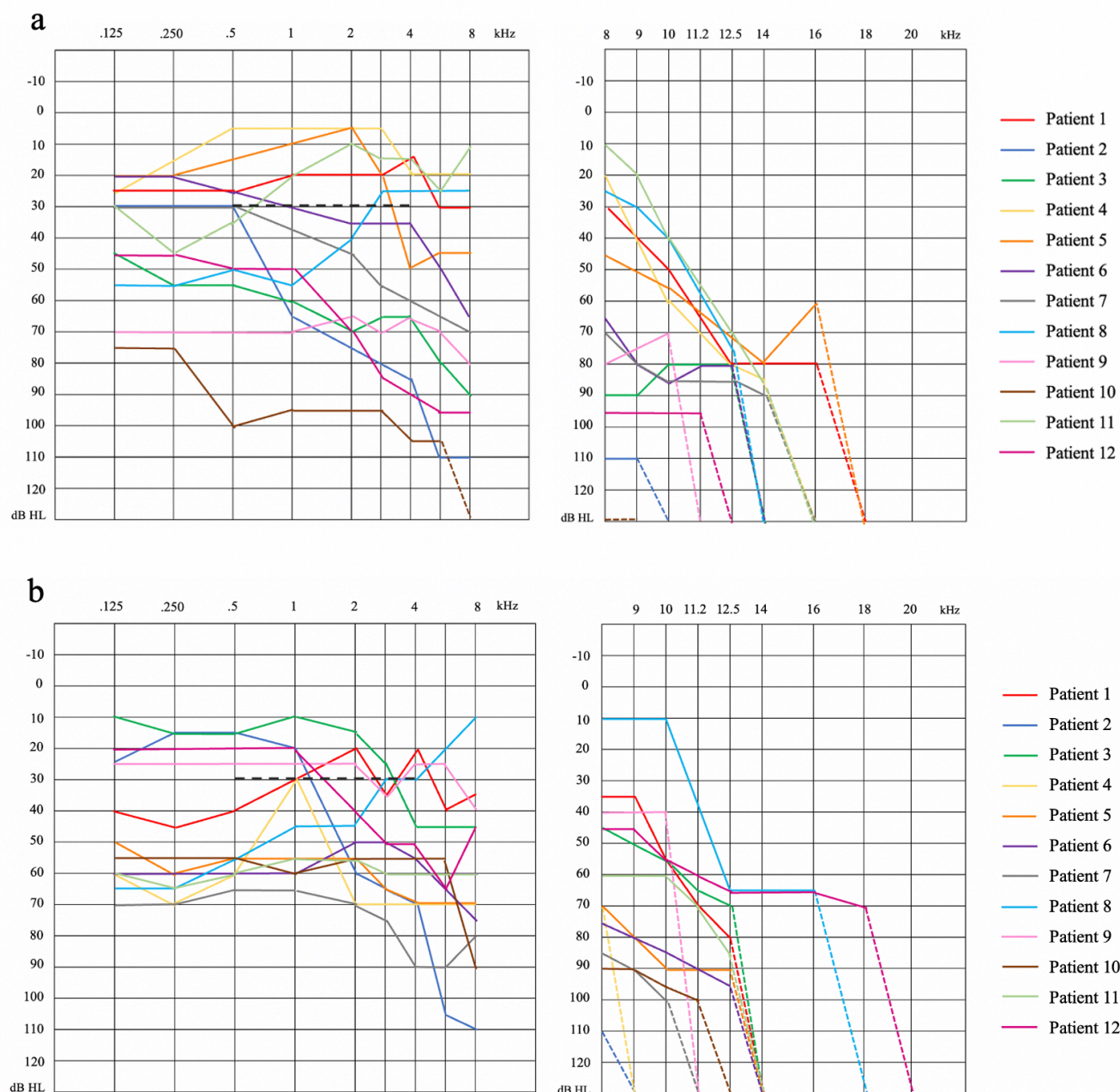


Figura 17. (a) Audiometría de tonos puros (izquierda) que muestra los umbrales auditivos (dB HL) de los oídos derechos en el espectro de frecuencias de 125 a 8000 Hz (0,125-8KHz). Audiometría de tonos puros de alta frecuencia (derecha) que muestra los umbrales auditivos (dB HL) para los oídos derechos en el espectro de frecuencias de 8000 a 20000Hz (8-20KHz). (b) Audiometría de tonos puros (izquierda) que muestra los umbrales auditivos (dB HL) para los oídos izquierdos en el espectro de frecuencias de 125 a 8000Hz (0,125-8KHz). Audiometría de tonos puros de alta frecuencia (derecha) que muestra los umbrales de audición (dB HL) para los oídos izquierdos en el espectro de frecuencias de 8000 a 20000Hz (8-20KHz). NOTA: La línea negra discontinua muestra el umbral para definir la pérdida auditiva [40].

Tabla 4. Evaluación psicoacústica de pacientes con acúfeno crónico y variantes missense en el gen *ANK2*.

Paciente	Lateralidad	Tipo y frecuencia	Umbral (dBHL)	Intensidad (dBSL)	MML (dBSL)	IR*
1	Izquierdo	WN	30	2	14	0
2	Derecho	NBN (125)	12	2	8	0
3	Derecho	WN	78	2	4	0
4	Izquierdo	NBN (6000)	58	4	8	0
5	Izquierdo	WN	66	5	8	0
6	Izquierdo	WN	52	16	25	0
7	Izquierdo	WN	75	3	9	1
8	Derecho	WN	26	10	14	0
9	Derecho	WN	69	1	3	1
10	Derecho	WN	92	10	8	0
11	Izquierdo	NBN (3000)	50	13	8	1
12	Derecho	NBN (250)	42	3	7	1

WN: *del inglés, White Noise*, Ruido blanco; NBN: *del inglés, Narrow Band Noise*, Ruido de banda estrecha; MML: *del inglés Minimum, Masking Level*, Nivel Mínimo de Enmascaramiento; *IR (Inhibición Residual): 0 = negativo; 1 = parcial.

4.3. EVALUACIÓN PSICOMÉTRICA

Las puntuaciones obtenidas en cada uno de los cuestionarios y tests administrados se muestran en la tabla 5.

Atendiendo a la puntuación del THI y la clasificación previamente descrita basándose en ella [59], 7 de los pacientes de nuestra serie (58%) presentaban un fenotipo extremo. Un paciente refirió una puntuación THI de 56 a 76 (Fenotipo casi extremo), y el resto (N=4) obtuvieron puntuaciones <56.

Los resultados arrojados por la EVA mostraron que diez pacientes obtuvieron una puntuación ≥ 5 , y cinco tuvieron valores entre 8 y 10, lo que representaría un grado de molestia extrema con un alto impacto en la calidad de vida del paciente.

Todos los pacientes refirieron hiperacusia asociada a su acúfeno. Nueve de los 12 pacientes (75%) presentaban puntuaciones en el THS-GÜF >18 , lo que significa que la mayoría de los sujetos tenían un grado de discapacidad grave o muy grave atribuido a la hiperacusia.

En relación con la sintomatología ansiosa y/o depresiva asociada al acúfeno, los resultados fueron los siguientes: Siete pacientes (58%) presentaban síntomas de depresión de moderada a grave, según el test PHQ-9; Únicamente dos de los pacientes no mostraban síntomas de depresión que potencialmente requirieran intervención terapéutica (PHQ-9 < 4). Según la subescala de ansiedad del HADS, el 67% de los sujetos estudiados (n=8) presentaban síntomas de ansiedad clínicamente relevantes (puntuación HADS-A ≥ 11). Sólo dos pacientes no presentaban características ansiosas. Por otro lado, la subescala de depresión mostró que el 42% de los pacientes (n=5) presentaban síntomas relevantes (puntuación HADS-D ≥ 11) y, por tanto, eran pacientes con diagnóstico probable de depresión. El resto de los pacientes no mostraron síntomas depresivos relevantes.

Por último, para estimar la posible disfunción cognitiva, utilizamos la prueba MoCA. Los resultados mostraron que más de la mitad de los pacientes (n=7) obtuvieron una puntuación <26, lo que indica un probable trastorno cognitivo leve. Curiosamente, en contra de lo que cabría pensar, la edad media de estos pacientes era inferior ($55,8 \pm 9,7$) a la edad media de los pacientes con puntuaciones ≥ 26 ($59,4 \pm 4,6$).

4.4. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA

4.4.1. Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral

Los PEATC o respuestas evocadas auditivas de corta latencia representan la actividad electrofisiológica desencadenada hasta los 10ms tras la presentación del estímulo acústico. Corresponden con la respuesta del tronco del encéfalo y colículo inferior en el mesencéfalo.

Las latencias de los diferentes componentes de este tipo de respuestas evocadas en los sujetos estudiados estaban retrasadas en aquellos oídos afectados por el acúfeno frente a aquellos oídos sin acúfeno (Tabla 6). Las medias obtenidas fueron de $1,67 \pm 0,3$ ms, $3,91 \pm 0,32$ ms, y $5,71 \pm 0,34$ ms respectivamente para las ondas I, III y V en oídos enfermos. Por su parte, en aquellos oídos sin acúfeno las latencias fueron $1,54 \pm 0,24$ ms, $3,69 \pm 0,23$ ms y $5,55 \pm 0,27$ ms para las mismas ondas. A pesar de esta diferencia generalizada entre ambos grupos de oídos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 5. Evaluación psicométrica de pacientes con acúfeno crónico y variantes missense en el gen *ANK2*.

Paciente	VAS	THI	THS-GÜF	PHQ-9	HADS-A	HADS-D	HADS-T	MoCA
1	8	84	36	22	11	11	22	27
2	5	84	29	17	12	14	26	23
3	2	24	18	9	9	5	14	24
4	9	70	41	14	11	10	21	27
5	5	42	9	3	1	2	3	21
6	6	40	7	8	7	7	14	26
7	9	96	22	14	19	13	32	22
8	7	92	33	23	16	15	31	19
9	8	84	20	19	12	12	24	21
10	8	88	29	22	12	10	22	26
11	6	82	29	7	11	9	20	22
12	4	34	10	2	8	6	14	27
$\bar{x} \pm DE$	6,42$\pm$2,15	68,33$\pm$25,72	23,58$\pm$11,09	13,33$\pm$7,46	10,75$\pm$4,47	9,5$\pm$3,90	20,25$\pm$8,10	23,75$\pm$2,80

EVA: Escala Visual Analógica; *THI*: Tinnitus Handicap Index; *THS-GÜF*: Versión Española del Test de Hiperacusia; *PHQ-9*: Cuestionario de Salud del Paciente; *HADS*: Escala de Depresión y Ansiedad (*A* Ansiedad, *D* Depresión, *T* Total); *MoCA*: Evaluación Cognitiva de Montreal. $\bar{x}$, media; DE, desviación estándar.

Tabla 6. Media y desviación estándar de las latencias de las ondas I, III y V de los PEATC en oídos con acúfeno y oídos sin acúfeno.

Onda	Latencia		<i>P</i> entre grupos
	<i>Media (DE) (ms)</i>		
	Acúfeno	Sin acúfeno	
	<i>(N=12)</i>	<i>(N=12)</i>	
I	1,67±0,31	1,54±0,24	0,266
III	3,91±0,32	3,69±0,23	0,101
V	5,71±0,34	5,55±0,27	0,178

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P < 0,05$).

En lo que respecta a la amplitud de los PEATC, nuestros resultados también mostraron diferencias en ambos grupos de oídos (Tabla 7). En el caso de oídos afectados por el acúfeno, las amplitudes resultantes fueron menores ($0,09 \pm 0,04 \mu V$ y $0,28 \pm 0,15 \mu V$ para las ondas I y V respectivamente) que en oídos sin acúfeno ($0,12 \pm 0,08 \mu V$ y $0,37 \pm 0,22 \mu V$ para las ondas I y V respectivamente). El análisis estadístico sin embargo no mostró diferencias significativas.

Tabla 7. Media y desviación estándar de las amplitudes de las ondas I y V de los PEATC en oídos con acúfeno y oídos sin acúfeno.

ONDA	Amplitud		<i>P</i> entre grupos
	<i>Media (DE) (μV)</i>		
	Acúfeno	Sin acúfeno	
	<i>(N=12)</i>	<i>(N=12)</i>	
I	0,09±0,04	0,12±0,08	0,378
V	0,28±0,15	0,37±0,22	0,514

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P < 0,05$).

4.4.2. Potenciales Evocados Auditivos de Latencia Media

Los PEALM son respuestas auditivas evocadas que se desencadenan entre 10 y 80 ms después del inicio del estímulo acústico. Representan a múltiples generadores neuronales, con una mayor contribución de las vías tálamo-corticales, y una menor contribución del colículo inferior y la formación reticular.

Como en el caso de las latencias de los PEATC, en nuestra serie de pacientes hemos objetivado un alargamiento de las mismas en los oídos afectados por el acúfeno en los componentes más reproducibles y representativos de los PEALM (Tabla 8). Así, hemos obtenido latencias de $30,58 \pm 4,16$ ms, $62,86 \pm 7,71$ ms y $10,22 \pm 4,20$ ms para las ondas Pa, Pb y el componente NaPa respectivamente en oídos con acúfeno frente a las latencias de $27,97 \pm 3,91$ ms, $59,63 \pm 7,93$ ms y $8,37 \pm 2,58$ ms respectivamente, en los oídos sin acúfeno. Al igual que en las respuestas de corta latencia, a pesar de las diferencias generalizadas entre ambos grupos, el análisis estadístico no mostró resultados estadísticamente significativos.

Tabla 8. Media y desviación estándar de las latencias de las ondas Pa, Pb y complejo NaPa de los PEALM en oídos con acúfeno y oídos sin acúfeno.

ONDA	Latencia		<i>P</i> entre grupos
	<i>Media (DE) (ms)</i>		
	Acúfeno	Sin acúfeno	
	<i>(N=12)</i>	<i>(N=12)</i>	
Pa	30,58±4,16	27,97±3,91	0,123
Pb	62,86±7,71	59,63±7,93	0,346
NaPa	10,22±4,20	8,37±2,58	0,314

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P < 0,05$).

En cuanto a la amplitud de los PEALM, se registraron las mediciones de la onda Pa y el componente NaPa. Los resultados del estudio de las amplitudes de las ondas Pa

en oídos con acúfeno fueron $0,61 \pm 0,20 \mu V$ frente a $0,37 \pm 0,23 \mu V$ de los oídos sin acúfeno. Esta mayor amplitud de la onda Pa en oídos enfermos fue estadísticamente significativa. Por otra parte, al comparar las latencias del complejo NaPa de ambos grupos ($0,83 \pm 0,29 \mu V$ en oídos con acúfeno frente a $0,92 \pm 0,40 \mu V$ en oídos sin acúfeno) el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas (Tabla 9).

Tabla 9 Media y desviación estándar de las amplitudes de las ondas Pa y el complejo NaPa de los PEALM en oídos con acúfeno y oídos sin acúfeno.

ONDA	Amplitud		<i>P</i> entre grupos
	<i>Media (DE) (μV)</i>		
	Acúfeno	Sin acúfeno	
	<i>(N=12)</i>	<i>(N=12)</i>	
Pa	0,61±0,20	0,37±0,23	<i>0,021*</i>
NaPa	0,83±0,29	0,92±0,40	0,674

Se observan diferencias estadísticamente significativas con un aumento de la amplitud de la onda Pa en aquellos oídos afectados por el acúfeno ($P < 0,05$)

4.5. GENERACIÓN DEL MODELO CELULAR

4.5.1. Selección de pacientes y caracterización audiológica

Para la generación del modelo celular se obtuvieron muestras del ***paciente n° 7*** de nuestra serie, una mujer española diagnosticada de EM definida. Desde hace más de 30 años presenta acúfenos severos en el oído izquierdo, y la secuenciación del exoma (publicada en otro lugar) identificó una mutación en el gen *ANK2* (variante missense en 4:114294537 G/A).

La audiometría de tonos puros mostró una hipoacusia neurosensorial bilateral, moderada en el oído derecho y severa en el izquierdo, con afectación bilateral profunda en la audiometría de altas frecuencias (Figura 17, paciente n° 7). La acufenometría mostró

acúfeno de tono coincidente con ruido blanco, con un umbral de 75dBHL, una sonoridad del acúfeno +3dBSL, y MML +9dBSL, con una inhibición residual parcial (Figura 17).

El perfil psicométrico fue el siguiente THI: 96 (discapacidad grave); VAS: 9 sobre 10; PHQ-9: 14 sobre 27 (depresión moderada); HADS-Ansiedad: 19 sobre 21 (caso de ansiedad); HADS-Depresión: 13 sobre 21 (caso de depresión); MoCA: 22 sobre 30 (indicios de deterioro cognitivo leve) (Figura 18).

El registro de las respuestas auditivas evocadas se muestra en la figura 19. Los resultados de las latencias y amplitudes de las diferentes ondas de PEATC y PEALM a 80dBnHL y 70dBnHL, respectivamente, se muestran en la tabla 10.

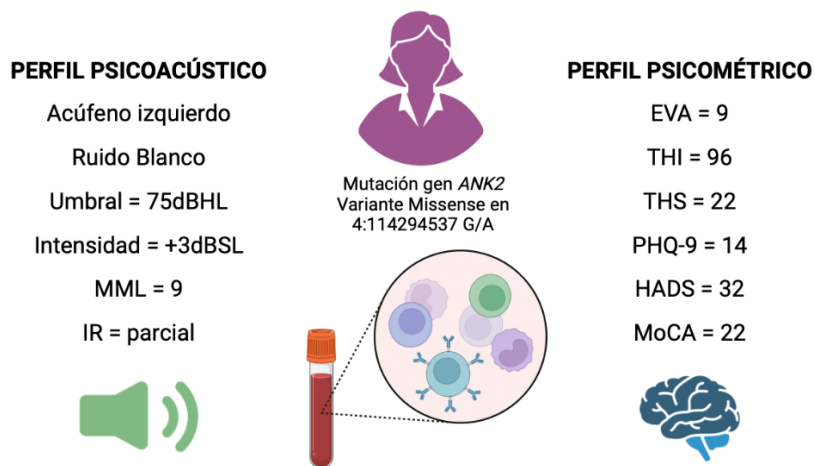


Figura 18. Perfil psicoacústico y psicométrico de la paciente con mutación en el gen *ANK2* (variante missense en 4:114294537 G/A).

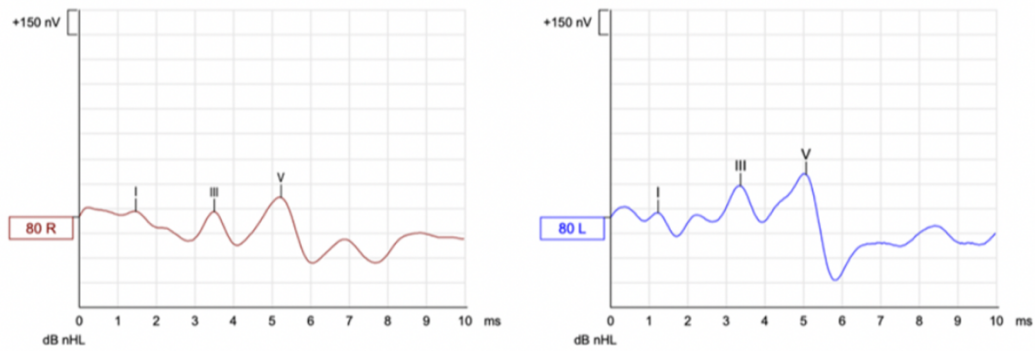
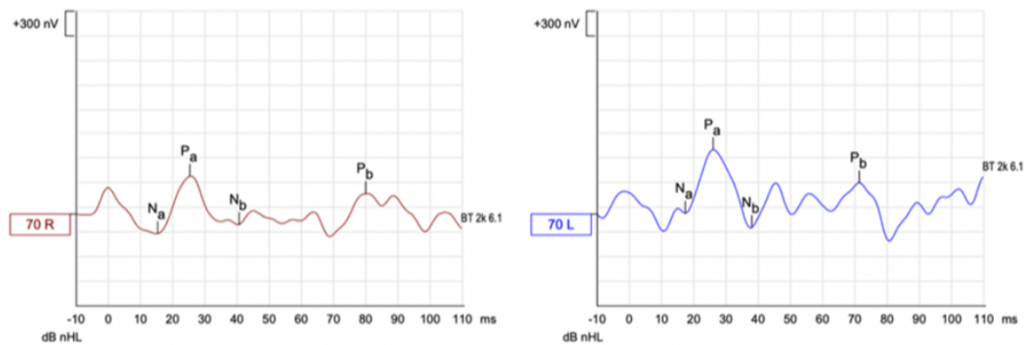
a**b**

Figura 19. (a) Registro de las respuestas auditivas del tronco encefálico (arriba) evocadas a 80 dB en ambos oídos (línea roja, oído derecho; línea azul, oído izquierdo) donde se pueden identificar los diferentes componentes (ondas I, III y V) con sus correspondientes latencias (ms) y amplitudes (nV) ($1\mu\text{V} = 1000\text{nV}$). (b) Registro de las respuestas auditivas de latencia media (AMRL) (abajo) evocadas a 70 dB en ambos oídos (línea roja, oído derecho; línea azul, oído izquierdo) donde pueden identificarse los diferentes componentes (ondas Na, Pa, Nb y Pb) con sus correspondientes latencias (ms) y amplitudes (nV) ($1\mu\text{V} = 1000\text{nV}$).

Tabla 10. Descripción de las latencias y amplitudes de las diferentes ondas de los PEATC y PEALM de la paciente con mutación en el gen *ANK2* (variante missense en 4:114294537 G/A) (nº 7).

Onda	<i>Latencia</i>		<i>Amplitud</i>	
	<i>(ms)</i>		<i>(μV)</i>	
PEATC	Derecho	Izquierdo	Derecho	Izquierdo
I	1,50	1,23	0,112	0,142
III	3,53	3,37	0,202	0,210
V	5,23	5,07	0,402	0,646
PEALM	Derecho	Izquierdo	Derecho	Izquierdo
Na	15,33	18,01	0,240	0,07
Pa	25,67	26,16	0,456	0,695
Nb	40,33	37,67	0,140	0,260
Pb	80,67	71,67	0,243	0,291

Nótese cómo las amplitudes de las ondas I, III y V de los PEATC son mayores en el oído afectado por el acúfeno (izquierdo), mientras que las latencias de los mismos componentes son menores en el otro oído. Por otro lado, las latencias de los componentes de los PEALM varían de un oído a otro sin una tendencia clara. En cuanto a las amplitudes, en el caso de las ondas positivas del PEALM (Pa y Pb), se observa una mayor amplitud en el oído izquierdo que en el oído contralateral.

4.5.2. Caracterización de la línea celular *ANK2-24*

La caracterización celular de la línea *ANK2-24* mostró una morfología típica de célula pluripotente y expresa marcadores de pluripotencia como SSEA4, SSEA3, TRA1-81, TRA1-60, y genes endógenos de pluripotencia como NANOG, SOX2 y OCT3/4. Presentaba un cariotipo normal (46, XX), y la pluripotencia se demostró por diferenciación en las 3 capas germinales de un embrión (Figura 20).

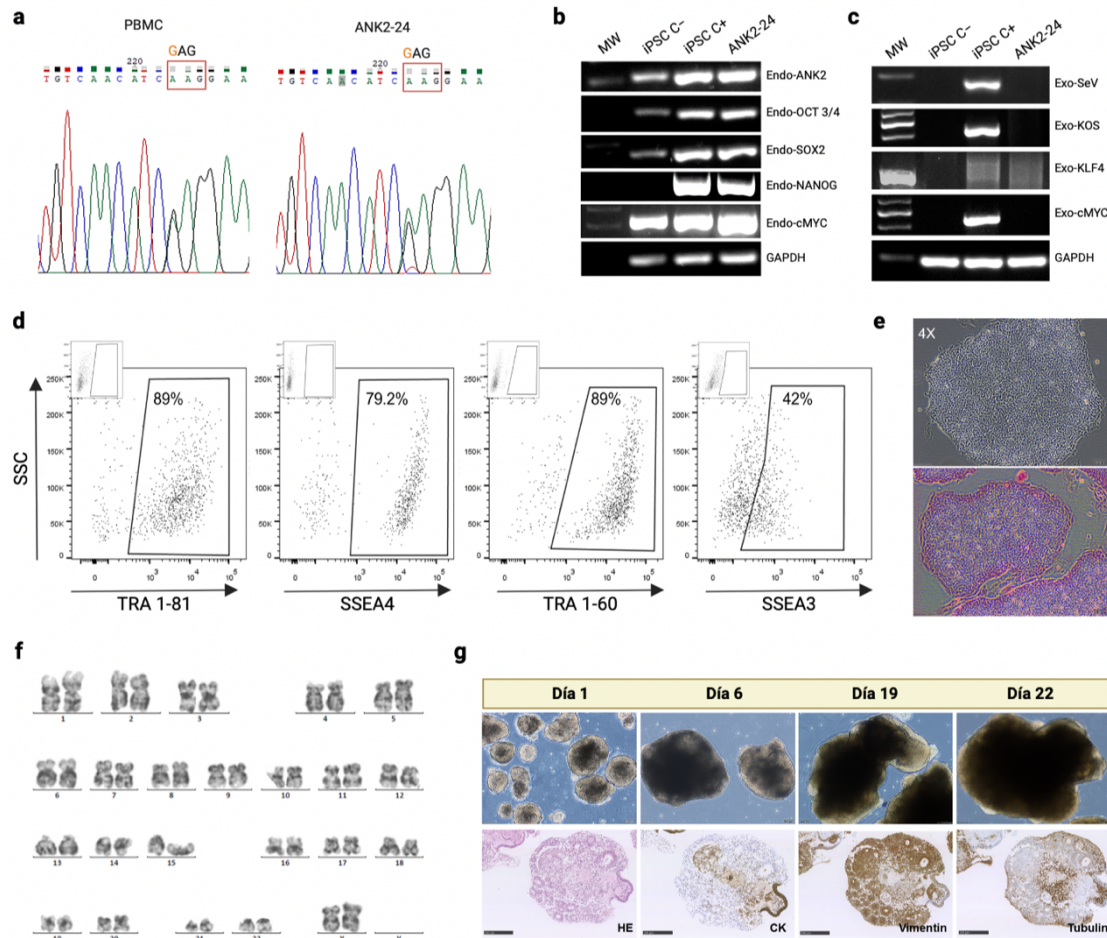


Figura 20. Caracterización celular de la línea hiPSC ANK2-24. (a) Análisis mutacional de la variante 4:114294537 G/A en el gen ANK2 a partir de PBMCs (panel izquierdo) y de la línea hiPSC, ANK2-24 (panel derecho). (b) RT-PCR de los genes endógenos de pluripotencia c-MYC, NANOG, SOX2 y OCT3/4. (c) El análisis por RT-PCR confirmó la silenciación de los factores de reprogramación exógenos y del vector SeV. PBMCs transducidas con SeV en el día 4 se utilizaron como control positivo. PBMCs no transducidas del mismo paciente se usaron como control negativo. (d) Expresión de los marcadores celulares de pluripotencia TRA1-81, SSEA4, TRA1-60 y SSEA3 mediante Citometría de Flujo. (e) Colonias representativas de la línea celular ANK2-24 capturadas con un microscopio óptico (imagen superior). Se realizó una tinción de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en las colonias ANK2-24 (imagen inferior). (f) El bandeo GTG muestra un cariotipo normal (46, XX) en la línea ANK2-24. (g) Ensayo de diferenciación en cuerpos embrionarios (EB) para la pluripotencia. Análisis por inmunohistoquímica para endodermo (CKAE1-AE3), mesodermo (Vimentina) y ectodermo (β -III-Tubulina) en el día 22 de la formación de EB.

4.5.3. Generación de neuronas del oído interno a partir de la línea celular ANK2-24

4.5.3.1 Diferenciación de ANK2-24 hacia neuronas del oído interno NOIs

La línea ANK2-24 se diferenció a NOIs utilizando un protocolo neuronal de 2 pasos. El primer paso fue la generación de PONs. El segundo paso fue la neuralización de estos en NOIs. La línea iPSC de control y la línea ANK2-24 se cultivaron durante 12 días en un medio de inducción ótico-neural. A continuación, las PONs generadas se diferenciaron en células sensoriales similares a las NOIs durante 21 días en un medio de neuralización. Las líneas iPSC de control y de pacientes desarrollaron NOIs derivadas de PONs tras 21 días de cultivo; las células mostraron proyecciones neuríticas extendidas y redes neuronales entre las células (Figura 21).

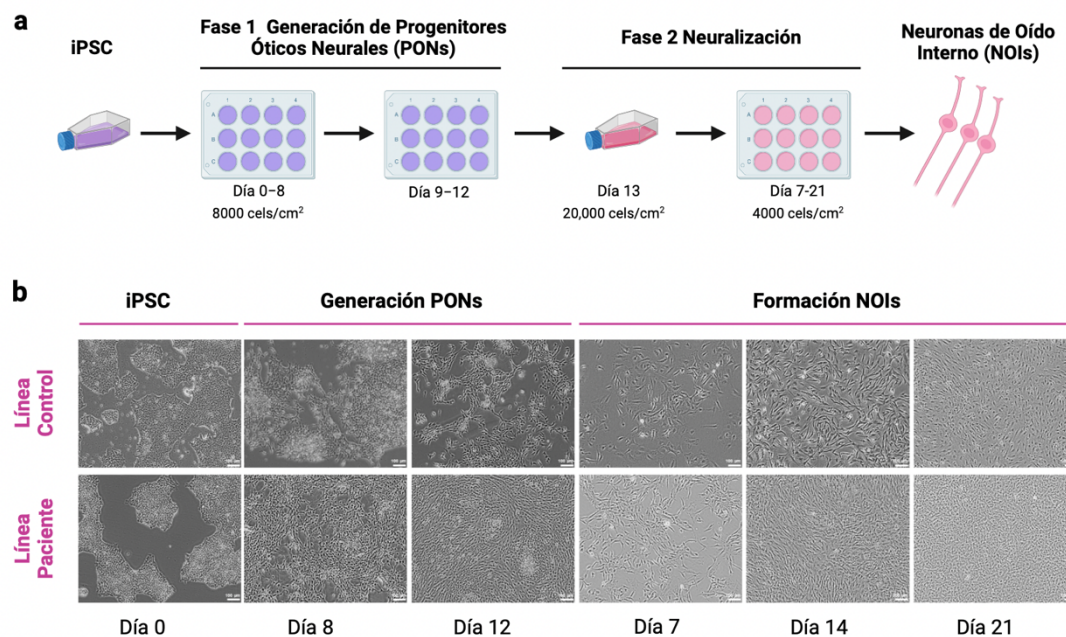


Figura 21. Generación de NOIs derivadas de iPSC. a) Representación esquemática del protocolo de diferenciación neural a partir de iPSC durante 21 días. b) Imágenes de la formación de NOIs obtenidas por microscopía óptica durante 21 días.

4.5.3.2 Expresión de progenitores ótico-neuronales

Durante la diferenciación neuronal, las líneas celulares PBMC1-iPS4F1 y ANK2-24 expresaron marcadores óticos como *PAX8* y *FOXG1* y marcadores neuronales como

TUBB3 y *POU4F1* (o *BRN3A*) implicados en la neurogénesis y el desarrollo de neuronas sensoriales ganglionares, respectivamente. La expresión de los genes *ANK2*, *PAX8*, *FOXG1* y *TUBB3* se validó mediante qPCR.

Los niveles de expresión de *PAX8* fueron mayores en la línea de control que en la línea de pacientes, disminuyendo su expresión en el día 21 (Fig. 22a). Como era de esperar, la expresión de *FOXG1* en la línea PBMC1-iPS4F1 disminuyó hasta el día 21. Sin embargo, la línea ANK2-24 mostró una mayor expresión de FOXG1 en el día 21 debido a un retraso en su diferenciación ótica (Fig. 22b). Por el contrario, la maduración de las NOIs se observó en ambas líneas celulares, mostrando un aumento de la expresión de TUBB3 en el día 22 (Fig. 21c). El nivel de expresión del gen mutado, *ANK2*, fue mayor en la línea control durante toda la diferenciación ótico-neural, especialmente en el día 7 (Fig. 21d).

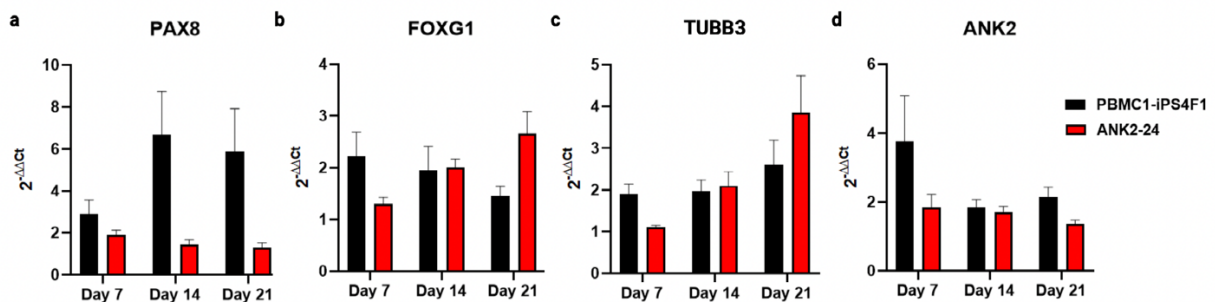


Figura 22. Expresión génica de los progenitores ótico-neurales. a) Expresión de *PAX8*. La expresión del gen *PAX8* es mayor en las líneas de control y paciente. b) Expresión de *FOXG1*. La expresión del gen *FOXG1* en la línea del paciente está retrasada en comparación con la línea de control. c) Expresión de β -3 TUBULINA. Ambas líneas celulares muestran un aumento de la expresión de TUBB3 en el día 21. d) Expresión del gen *ANK2*. La línea celular de control presenta una mayor expresión de *ANK2* en comparación con la línea paciente.

4.5.3.3 Expresión de marcadores celulares ótico-neuronales

La expresión de los marcadores celulares ankirina-2 (ANK2), Paired box protein Pax-8 (PAX8), Forkhead box protein G1 (FOXG1), POU domain, class 4, transcription

factor 1 (POU4F1) y beta-tubulina (TUBJ1) en el día 14 y en el día 21 durante la generación de NOI se validó mediante inmunotinción.

En el día 14, ambas líneas celulares expresaban los marcadores de progenitores FOXG1 y PAX8. Además, las células mostraban co-expresión entre los marcadores celulares ANK2 y PAX8 y FOXG1 y PAX8 (Fig. 23a). En el día 21, las células presentaban proyecciones neuronales y expresaban los marcadores neuronales POU4F1 y TUBJ1. Ambas líneas celulares mostraban una co-expresión de ANK2 y TUBJ1 y POU4F1 y TUBJ1 (Fig. 23b). El nivel de expresión de ANK2 observado en las imágenes de microscopia confocal mostró una mayor expresión del marcador ANK2 en la línea de control en comparación con la línea del paciente. En el día 21 de diferenciación neural, la expresión de ANK2 en las líneas PBMC1-iPS4F1 y ANK2-24 era mayor que en el día 14. La expresión de ANK2 fue mayor en la línea celular de control. Estos resultados mostraron diferencias significativas entre las líneas celulares de control y de pacientes tanto en el día 14 como en el día 21, con un valor $p < 0,05$ (Fig. 23c).

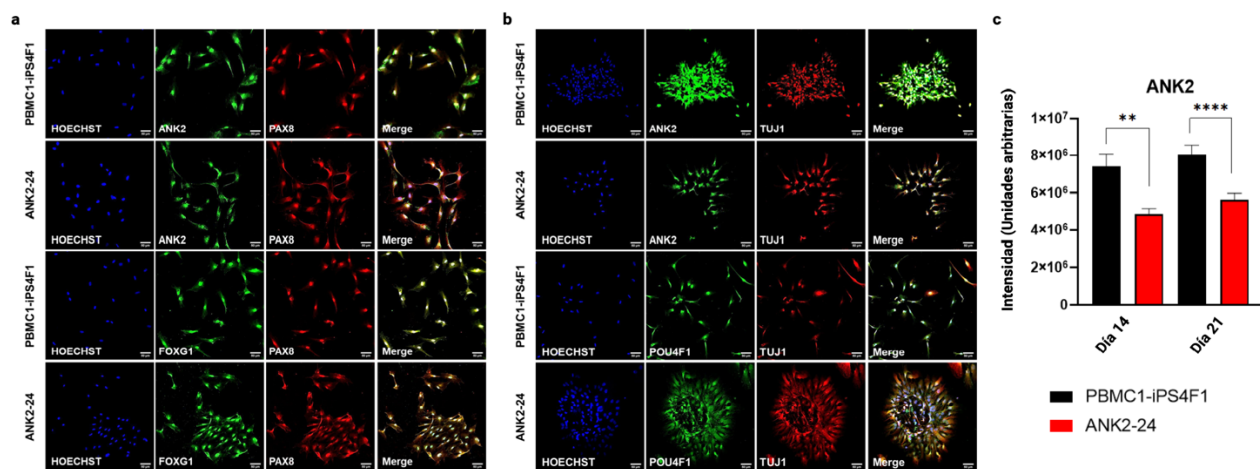


Figura 23. Expresión de marcadores de células ótico-neuronales mediante inmunotinción. (a) Imágenes de microscopia confocal de la expresión de marcadores óticos en el día 14 de la diferenciación ótico-neuronal. Ambas líneas celulares expresan los marcadores ANK2 (verde), PAX8 (rojo) y FOXG1 (verde). (b) Imágenes de microscopia confocal de la expresión de marcadores neuronales en el día 21 de la diferenciación ótico-neuronal. Ambas líneas celulares expresan los marcadores ANK2 (verde), POU4F1 (verde) y TUBJ1 (rojo). (c) Cuantificación de ANK2. La línea PBMC1-iPS4F1 muestra una mayor expresión del marcador ANK2 que la línea celular ANK2-24 (** valor $p < 0,003$, **** $p < 0,0001$).

La figura 23 muestra una vista ampliada de los marcadores NOI analizados mediante imágenes de microscopia confocal, mostrando la expresión de *ANK2*, *FOXG1* y *PAX8* en el día 14 para las líneas celulares de control y de pacientes (Fig. 24a). Por otro lado, la Fig. 24b muestra la expresión de los marcadores celulares *ANK2*, *POU4F1* y *TUJ1* en el día 21 para ambas líneas celulares. Esta figura apoya la descripción anterior de la expresión de marcadores celulares ótico-neurales. Además, la Fig. 24c proporciona una imagen de mayor dimensión de la expresión de *POU4F1*, un regulador transcripcional de la especificación de las neuronas sensoriales del oído interno y de las proyecciones de neuritas, para facilitar un estudio detallado de la morfología de las proyecciones neuronales de las líneas celulares control y paciente durante la diferenciación neuronal. Podemos observar neuronas multipolares en ambas líneas celulares con más de dos proyecciones neuronales y varias dendritas. Sin embargo, existe una diferencia notable entre las líneas de control y de pacientes. La línea celular ANK2-24 presenta varias neuronas agrupadas, mientras que la línea de control muestra neuronas individualizadas. Además, la línea celular ANK2-24 presenta más proyecciones neuronales y dendritas que la línea iPSC control.

4.5.3.4 Expresión de la proteína ANK2

Confirmamos la expresión de la proteína ANK2 mediante Western Blot utilizando un anticuerpo policlonal frente a Ankyrin B. Detectamos la expresión de la proteína ANK2 (135 KDa) en las líneas celulares PBMC1-iPS4F1 y ANK2-24 de acuerdo con su peso molecular esperado. Además, identificamos una banda de 75 KDa en las líneas de control y de pacientes correspondiente a una isoforma de ANK2 producida por splicing alternativo. De forma similar, ocurre en la línea celular humana U-251MG (línea celular de glioblastoma) analizada por el proveedor comercial del anticuerpo policlonal Ankyrin B utilizado en este estudio (Fig.25a). En el día 21 de diferenciación neuronal, detectamos una mayor expresión de la proteína ANK2 en ambas líneas celulares. La línea celular PBMC1-iPS4F1 mostró un mayor nivel de expresión de la proteína ANK2 que la línea celular ANK2-24, desde el día 7 hasta el día 21 de diferenciación neuronal, aunque sin diferencias significativas (Fig. 25b).

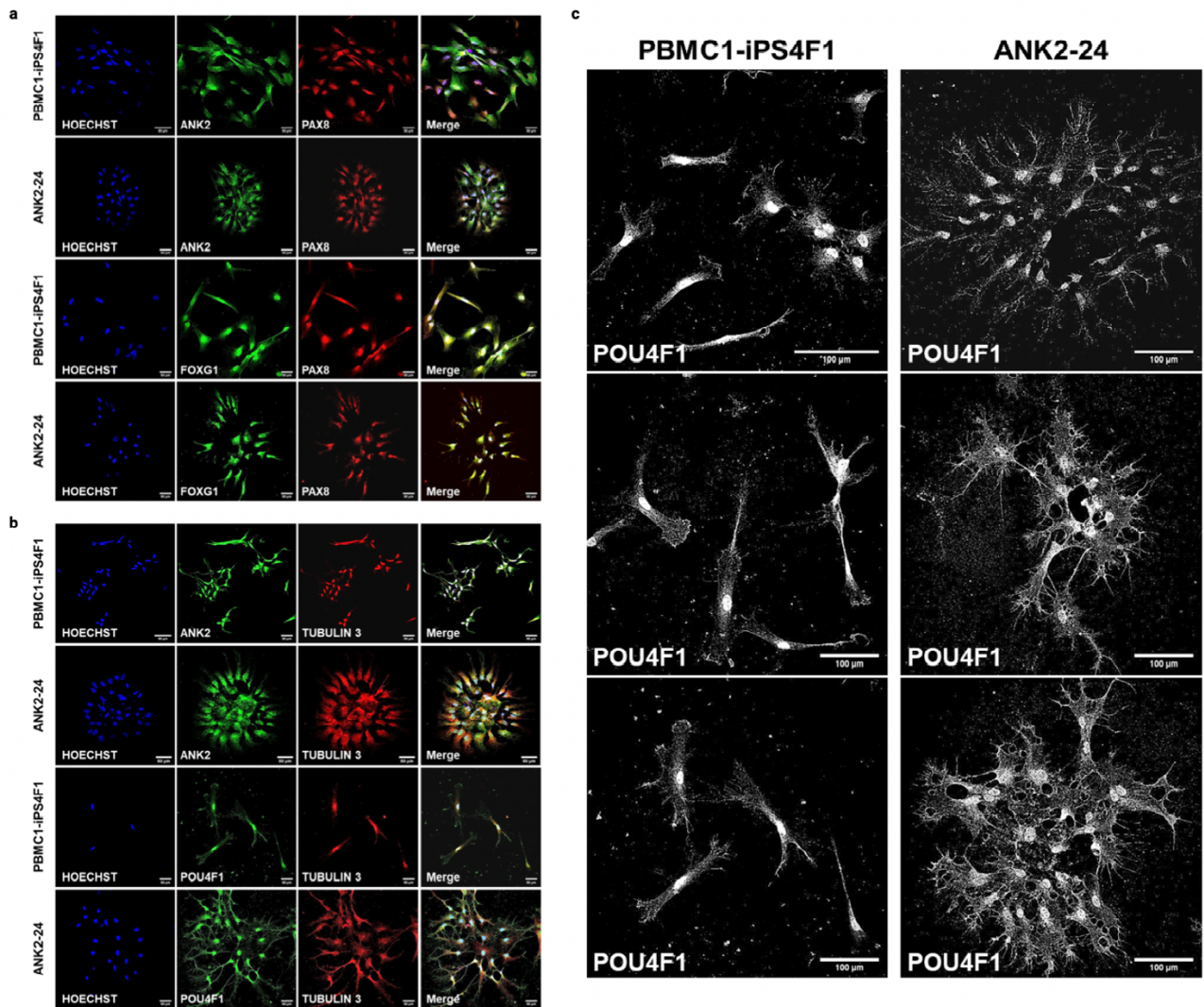


Figura 24. Imágenes de microscopia confocal de la diferenciación ótico-neural a mayor aumento (40X). (a) Expresión de marcadores óticos en el día 14 de la diferenciación a NOI. (b) Expresión de marcadores neurales en el día 21 de la diferenciación de NOI. (c) Expresión de POU4F1 (escala de grises) en el día 21 de la diferenciación neural. La línea celular del paciente muestra sus grupos de formación de NOI con mayores proyecciones neurales y dendritas que la línea celular de control.

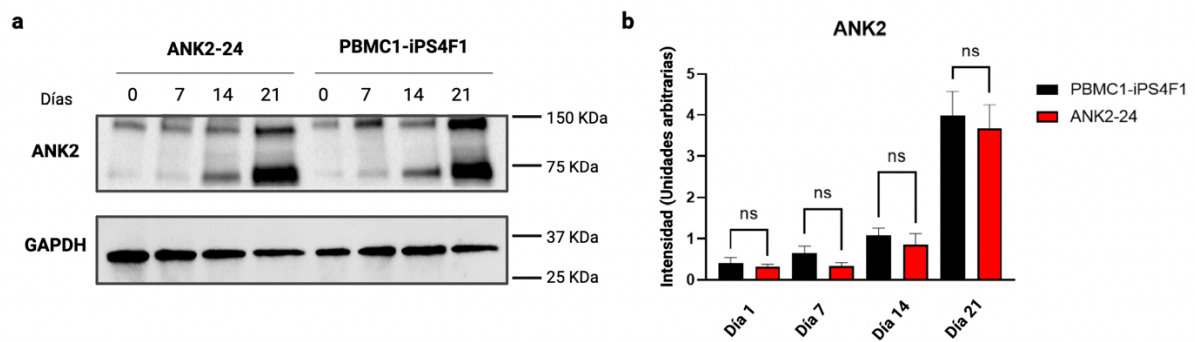


Figura 25. Expresión de la proteína codificada por el gen *ANK2*. (a) Análisis Western blot detectando la proteína ANK2 en las líneas PBMC1-iPS4F1 y ANK2-24. Se utiliza GAPDH como control de carga. Pesos moleculares: ANK2 (135 kDa y 75 KDa) y GAPDH (36 kDa). (b) Análisis del nivel de expresión de ANK2. La línea PBMC1-iPS4F1 muestra una mayor expresión de la proteína ANK2 que la línea celular ANK2-24. No hay diferencias significativas

5. DISCUSIÓN

Esta Tesis Doctoral describe el perfil audiológico y psicométrico de pacientes con acúfeno crónico y variantes raras en el gen *ANK2*. Este estudio incluye a 12 pacientes que refieren acúfenos graves persistentes ($\text{THI} > 56$) desde el inicio de la enfermedad; dado que los acúfenos pueden sufrir variaciones a lo largo del tiempo, no todas las puntuaciones obtenidas durante la duración de este estudio mostraron valores > 56 . Sin embargo, nuestros hallazgos han demostrado la persistencia de puntuaciones elevadas en el THI a lo largo del seguimiento de la mayoría de estos pacientes (83%) y consideramos que estos pacientes constituyen un endofenotipo de acufeno severo o “tinnitus disorder”.

Debido a que solo se han seleccionado participantes con variantes raras en el gen *ANK2*, este estudio de fenotipado contiene un bajo tamaño muestral, lo que constituye una evidente limitación.

El acúfeno es un síntoma común en algunas enfermedades, pero su relación más estrecha se establece sin duda con la hipoacusia, incluyendo la hipoacusia neurosensorial de alta frecuencia, la presbiacusia y la enfermedad de Meniere (EM) [165]. En relación a esta última comorbilidad, en nuestra serie, 10 de los 12 pacientes estaban diagnosticados con EM definida. Por ello, y aunque es necesario estudiar a más individuos con variantes en *ANK2*, no podemos descartar un efecto de *ANK2* en la hipoacusia o hipofunción vestibular, además del acúfeno.

Además de la hipoacusia, otras comorbilidades psicológicas comunes como la depresión, la ansiedad, el insomnio y el deterioro cognitivo están presentes en el 10-50% de los pacientes con acúfeno [12]. Por ello resulta fundamental realizar una evaluación de la gravedad del acúfeno y su impacto en la calidad de vida relacionada con la salud en el abordaje diagnóstico terapéutico de este perfil de pacientes.

5.1. ALTERACIONES EN CALIDAD DE VIDA

Nuestro estudio incluyó la escala EVA como herramienta fiable para medir la intensidad, las molestias y la angustia relacionada con el síntoma [147]. Además, se

utilizó el cuestionario THI para evaluar la gravedad del acúfeno y su impacto funcional en la vida diaria [152]. Las puntuaciones EVA y THI mostraron valores extremos de molestia y un impacto significativo en la calidad de vida del paciente en relación con el acúfeno en más de la mitad de los pacientes estudiados. La afectación cognitiva relacionada con la edad puede favorecer el malestar severo asociado al acúfeno. En nuestra serie, todos los pacientes tenían menos de 65 años salvo uno (72). La media de edad fue de 57, por lo que no podemos considerar este factor como un determinante fundamental para los valores extremadamente altos de afectación en calidad de vida en la mitad de los individuos. Todos los pacientes estudiados presentaban un acúfeno crónico de al menos 15 años de evolución. Es bien sabido que en este perfil de paciente con acúfeno persistente, las características de volumen o tono del acúfeno no están significativamente relacionadas con su gravedad, sino que es la propia interpretación del acúfeno que generen las vías no auditivas asociadas la que influya en la alteración de la calidad de vida más que el sonido en sí mismo [23, 166]. De esta forma puede entenderse que buena parte de los pacientes de nuestra serie muestren elevados o extremos niveles de alteración de calidad de vida en los cuestionarios respondidos.

5.2. DEPRESIÓN Y ANSIEDAD

La asociación entre depresión y acúfenos es elevada y puede ser diversa. El propio síntoma puede ser una comorbilidad de la depresión, un factor predisponente a ella o, la depresión puede actuar como factor contribuyente a la persistencia del acúfeno [26].

Para evaluar la ansiedad y la depresión, hemos utilizado la escala PHQ-9, aceptada como la mejor herramienta para identificar la gravedad de los síntomas en personas con trastorno depresivo, y la escala HADS, que incluye dos subescalas para los rasgos de ansiedad y depresión.

Nuestros resultados muestran que el 58% de los pacientes presentaban síntomas de depresión de moderada a grave a través del PHQ-9. Únicamente dos de los pacientes mostraron una ausencia de rasgos compatibles con trastorno depresivo relacionado con el síntoma (puntuación ≤ 4). Sin embargo, si correlacionamos estos resultados con la subescala de depresión del HADS, en este cuestionario encontramos un menor porcentaje

de pacientes con síntomas relevantes concordantes con depresión mayor (42%). Según esta misma subescala, 4 de los 12 pacientes presentaban ausencia de clínica compatible con depresión.

En cuanto a la ansiedad relacionada con el acúfeno, el 67% de los pacientes (n=8) mostraron síntomas ansiosos según la subescala correspondiente del HADS (≥ 8). Dado que nuestra muestra incluye pacientes con fenotipos extremos, estas estrategias de selección suelen estar relacionadas con la obtención de puntuaciones elevadas en este tipo de pruebas psicométricas [165]. Además, es fundamental señalar que la subescala de ansiedad del HADS criba la sintomatología ansiosa con independencia de su asociación con el acúfeno. Sin embargo, estas preguntas pueden relacionarse fácilmente con sentimientos de tensión, preocupación o miedo asociados al acúfeno y no con el diagnóstico de un trastorno de ansiedad generalizada.

5.3. HIPERACUSIA

Otro síntoma relevante observado en pacientes con acúfenos asociados a variantes raras en el gen *ANK2* fue la reducción de la tolerancia a los sonidos ambientales, es decir, hiperacusia, en la que los sonidos son incómodamente altos o dolorosos, lo que en última instancia perjudica las actividades sociales, laborales y recreativas [167]. Más del 90% de las personas con hiperacusia presentan acúfenos concurrentes, lo que sugiere una fuerte relación [168], y esta relación aumenta con la gravedad del acúfeno [169, 170]. Como ya se explicó, existen varias teorías sobre el mecanismo de generación de la hiperacusia. En nuestra serie de casos, todos los pacientes presentaban hiperacusia relacionada con su acúfeno, y el 75% mostraba una elevada molestia según la puntuación THI lo que pone de relieve la estrecha relación entre los dos síntomas. Esta elevada correlación nos indica que la asociación de variantes raras en *ANK2*, podría en realidad deberse a la hiperacusia y no sería posible distinguir entre acufeno severo e hiperacusia.

5.4. DETERIORO COGNITIVO

Se han descrito alteraciones cognitivas en muestras de pacientes con acúfenos, y la gravedad de estos síntomas se ha correlacionado con la gravedad del mismo [32, 33, 171]. Wang et al. [172] demostraron que el deterioro cognitivo que se producía en pacientes con acúfeno grave era diferente del que se producía en pacientes con acúfeno leve, independientemente del grado de hipoacusia, y sugirieron que el deterioro cognitivo podría no ser secundario a las manifestaciones de la enfermedad, sino una característica primaria de la enfermedad subyacente. Malesci et al. [34] observaron que en pacientes ancianos con pérdida de audición, el ruido parecía empeorar la disfunción cognitiva, pero concluyeron que aún no estaba claro si el deterioro cognitivo era una respuesta a las manifestaciones del acúfeno o una característica del acúfeno en relación con la hipoacusia relacionada con la edad.

Nuestro estudio utilizó el test MoCA para detectar disfunciones cognitivas leves. Ya se ha comentado que la hipoacusia parece exacerbar los déficits cognitivos en la edad avanzada y puede servir como factor pronóstico del deterioro cognitivo leve. En relación a esto, todos los pacientes de nuestra serie presentaban hipoacusia bilateral en diferentes grados, excepto dos pacientes con hipoacusia unilateral leve y moderada. Más de la mitad de estos pacientes presentaban puntuaciones compatibles con deterioro cognitivo leve, pero los datos indican que en este subgrupo la media de edad era inferior en comparación con el subgrupo en el que se obtuvieron puntuaciones de normalidad en el test MoCA, es decir, en pacientes sin signos de deterioro cognitivo. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido al tamaño insuficiente de la muestra. Según algunas series, la prevalencia de depresión en pacientes con deterioro cognitivo grave asociado al acúfeno puede alcanzar el 80% [31]. Según los datos obtenidos en nuestro estudio, si tenemos en cuenta puntuaciones de PHQ-9 (≥ 10) y subescala de depresión del HADS (≥ 11), hasta un tercio de los pacientes presentaban sintomatología compatible con depresión moderada severa. De estos individuos, el 62,5% mostraron alteraciones en la prueba de cribado de deterioro cognitivo una cifra algo inferior a series previamente descritas.

5.5. RESPUESTAS EVOCADAS

Se han descrito datos de latencia media y amplitud para los distintos componentes de los PEATC [117]. Sin embargo, dependiendo del umbral de audición, estos valores podrían variar en pacientes con pérdida auditiva. La mayoría de los pacientes que presenta acúfenos llevan asociada una hipoacusia de diverso grado. Actualmente se sugiere que el acúfeno surge como una disfunción de la plasticidad central en respuesta a la disminución de la entrada sensorial auditiva tras una lesión auditiva. Esto conduce a cambios en el control homeostático de la ganancia en el tronco encefálico auditivo y el córtex auditivo y a una desregulación talamocortical [173]. La mayoría de los pacientes de nuestra serie presentaban hipoacusia neurosensorial bilateral. En todos los casos, el oído afectado por el acúfeno también presentaba distintos grados de pérdida auditiva. Edwall et al. [174] han descrito cambios en las latencias y amplitudes de la onda V en pacientes con acúfeno crónico como resultado del efecto centrífugo de la corteza auditiva y de estructuras cerebrales subcorticales más allá del tronco encefálico [175]. Según esta teoría, la información procedente del córtex sirve para afinar el procesamiento sensorial en las estructuras subcorticales potenciando las señales relevantes y suprimiendo las no deseadas.

En nuestro estudio, observamos un retraso en las latencias de las ondas I, III y V de los oídos afectados por acúfeno severo y una disminución de las amplitudes de las ondas I y V en comparación con los valores obtenidos en los oídos sin acúfenos. A pesar de no mostrar significación estadística, estos resultados concuerdan con el metaanálisis publicado por Milloy et al. [176], que describieron un retraso generalizado de la latencia y una disminución de la amplitud en los PEATC de los pacientes con acúfenos.

Aunque es necesario definir mejor el papel de las estructuras auditivas corticales y subcorticales en la fisiopatología del acúfeno, sólo algunos estudios han analizado el papel de las latencias y amplitudes de los PEALM en este perfil de pacientes. Estas respuestas evocadas poseen capacidad para poder aportar información sobre las vías auditivas no lemniscales o no primarias, incluido el sistema de activación reticular, y por tanto, se les considera idóneos evaluar los mecanismos de activación sensoriales. En ese contexto, el estudio de este tipo de respuesta neural de latencia media puede proporcionar información crucial sobre la conexión entre las vías auditivas a nivel talamocortical y los

mecanismos de disfunción corticolímbica relacionados con el grado de angustia percibido por el paciente con acúfeno crónico grave.

Quizás el problema de medición más grave encontrado al realizar un registro de PEALM es el artefacto que puede provocar la respuesta miogénica del músculo postauricular (MPA), que refleja la actividad de contráctil de este músculo evocada por estímulos. Esta actividad puede interferir gravemente con el registro de los PEALM en determinadas condiciones de medición, incluidos niveles de intensidad de estímulo elevados, sujetos tensos y cuando el electrodo inversor se encuentra en el mastoides o el lóbulo de la oreja cerca de este músculo. El arco reflejo está formado por el nervio coclear y el núcleo coclear que envía axones bilateralmente hacia la zona paralemniscal y desde ahí se conecta con el núcleo del facial, que a la vez envía conexiones hacia el MPA [177].

El artefacto lo forma un pico pronunciado en la región de 13 a 15 ms. La amplitud de la actividad del MPA es mucho mayor que la amplitud del componente Pa. Por tanto, van a ser dos las características del artefacto van a diferenciarlo de una onda Pa real. La latencia del artefacto del MPA es inferior a 20 ms, mientras que la onda Pa siempre tiene una latencia más larga; además, el artefacto muscular aparece como un pico agudo que a menudo es mucho más grande en amplitud que la onda Pa, que suele ser más redondeada [129].

La probabilidad de registrar este artefacto se reduce significativamente con las siguientes técnicas sencillas:

- Evitar niveles de intensidad de estímulo muy altos > 75 dB nHL.
- Facilitar un estado de relajación del paciente.
- Minimizar la tensión del cuello y la mandíbula del paciente.
- Utilizar un sitio no cefálico frente al oído para el electrodo inversor.

Se ha propuesto que las PEALM pueden ser un marcador de la gravedad del acúfeno ya que tanto las latencias retardadas como las amplitudes aumentadas en los oídos enfermos podrían reflejar un mal funcionamiento de la actividad sincronizada en regiones subcorticales y corticales [42]. Aunque los resultados no son estadísticamente significativos, nuestra serie muestra latencias retardadas en todos los componentes de la

PEALM (Pa, Pb y NaPa) de los oídos con acúfenos. Por otro lado, se han descrito componentes de los PEALM de amplitud extremadamente grande en individuos con acúfeno crónico, un efecto que puede estar relacionado con alteraciones en los mecanismos inhibitorios [178]. Precisamente, la amplitud del componente principal de estas respuestas auditivas, Pa, se encuentra en nuestra serie significativamente aumentada en los oídos enfermos, coincidiendo con descripciones previas [133, 178].

Con respecto a nuestra investigación, existen varios aspectos que constituyen limitaciones a tener en cuenta:

- Esta serie de casos se centra en el análisis de pacientes con fenotipo extremo de acúfeno y variantes raras en el gen *ANK2*. Esto significa que hemos descrito características de un subgrupo de población muy específico, de ahí que la muestra sea relativamente pequeña. Es por ello que estos resultados no pueden extenderse a otros pacientes con acufenos o hiperacusia de la población general.
- Como trabajo complementario, será necesario en un futuro obtener un grupo control para comparar nuestros resultados con un grupo de pacientes con EM definida para confirmar las características audiológicas, psicoacústicas y psicométricas del fenotipo.

5.6. MODELO CELULAR

El acúfeno es un rasgo complejo que afecta a la población humana en un amplio espectro. La base genética es probablemente multialélica, incluyendo variantes comunes y raras [173]. Se han desarrollado varios modelos de comportamiento animal para estudiar el desarrollo del acúfeno, incluidos los inducidos por ruido y los ototóxicos pero estos modelos se ven obstaculizados por su asociación con la hipoacusia inducida por el medio ambiente, lo que limita el análisis de la contribución genética al acúfeno.

En los últimos años los modelos celulares personalizados están emergiendo como herramientas esenciales para el análisis funcional de variantes genéticas en la neurobiología del acúfeno y para el cribado de fármacos para este trastorno [179]

Hemos generado una línea iPSC derivada de un paciente con acúfeno severo portador de una mutación con cambio de sentido *ANK2* en 4:114294537 G/A mediante reprogramación celular utilizando un método no integrativo. Además, hemos caracterizado la línea iPSC a nivel celular y funcional, demostrando su pluripotencia y capacidad para diferenciarse *in vitro* en las 3 capas germinales de un embrión. Estos resultados muestran el potencial del desarrollo de modelos celulares basados en iPSC para estudios funcionales y el potencial cribado de fármacos para restaurar el fenotipo celular del acúfeno.

El gen *ANK2* codifica un miembro de la familia de la proteína anquirina, que desempeña funciones cruciales en la motilidad celular, la activación, la proliferación y el mantenimiento de dominios de membrana especializados. Recientemente, el análisis de secuenciación del exoma utilizado en pacientes con EM que presentaban acúfenos ha identificado variantes raras del gen *ANK2* implicadas en el acúfeno grave [165]. En estos pacientes, *ANK2* desempeña un papel fundamental en el tráfico de membranas y se une a proteínas citoesqueléticas en la fisiopatología del acúfeno grave [59].

El papel de *ANK2* en el trauma acústico y la disfunción neuronal se ha estudiado en modelos animales [180–182]. Sin embargo, no existen modelos celulares humanos que hayan estudiado el papel de *ANK2* en las respuestas evocadas auditivas y el desarrollo neural. Por lo tanto, en este objetivo, hemos generado un modelo celular derivado de pacientes con EM y acúfeno para generar NOIs utilizando un protocolo de diferenciación neural y comparar las diferencias entre un individuo control y una línea celular derivada del paciente.

El modelo de acúfeno derivado de iPSC puede diferenciarse en PON y madurar hacia la formación de neuronas del oído interno durante 21 días utilizando un protocolo de diferenciación neuronal [163]. En este estudio, los genes que contribuyen a la formación de los PON analizados mediante qPCR muestran diferencias entre las líneas de control y de pacientes, probablemente atribuibles a la función alterada del gen *ANK2* en la línea de pacientes.

Diversos estudios en ratones han demostrado la importancia del gen *ANK2* en el neurodesarrollo mediante diferentes mecanismos de forma que una pérdida de función

del gen altera de expresión de genes implicados en este desarrollo y produce una disregulación en la diferenciación de las células madre neurales [180, 183].

Se ha descrito que Pax2 y Pax8 combinados son necesarios para la diferenciación y el mantenimiento del sistema neurosensorial en el oído interno de los ratones [184]. FOXG1 es un factor de transcripción nuclear crucial que desempeña un papel importante en la supervivencia y el desarrollo de las células cerebrales, las células del oído interno y otros tejidos. En concreto, en el desarrollo del oído interno, FOXG1 regula la formación y diferenciación de las células ciliadas (CC), las células de sostén y las neuronas cocleares espirales. Esto garantiza la conservación de la función y la morfología cocleares [185, 186]. Los factores de transcripción PAX8 y FOXG1 están implicados en el desarrollo del sistema auditivo y en la generación de NOI. En nuestro modelo celular, hemos observado que la disminución de la expresión de *ANK2* estaba asociada a la expresión de *PAX8* y *FOXG1* durante el proceso de diferenciación neuronal en el desarrollo de la NOI. Sin embargo, no podemos determinar una relación causal. Serán necesarios más estudios en líneas celulares derivadas de pacientes adicionales para confirmar los patrones de expresión de *PAX8* y *FOXG1* durante el desarrollo neuronal en la EM. Sin embargo, durante la diferenciación neuronal, la expresión de *TUBB3* permanece normal tanto en las líneas celulares del paciente como en las de control hasta el día 21. Como este paciente tiene una mutación benigna heterocigota, la maduración en neuronas puede no verse afectada por la menor expresión de *ANK2* en la línea celular ANK2-24 respecto a la línea control.

La formación y maduración de las NOI muestra diferencias entre las líneas de control y de los pacientes. Cuando examinamos su morfología a través de la expresión de POU4F1, un factor de transcripción implicado en la formación y el desarrollo de las neuronas sensoriales del oído interno y las proyecciones de neuritas, observamos un mayor número de proyecciones neuronales y dendritas en la línea celular ANK2-24 en comparación con la línea de control. El aumento de las proyecciones neuronales del paciente en el desarrollo y la maduración de las NOI debido a la pérdida de audición y el acúfeno puede tener implicaciones funcionales multifacéticas en comparación con una persona sana.

Algunas de estas implicaciones funcionales podrían ser:

1. El aumento de la sensibilidad a la entrada auditiva. La mayor actividad neuronal podría contribuir a la percepción del acúfeno y también influir en la forma en que el individuo procesa y percibe otros estímulos auditivos [187, 188].
2. Mecanismos compensatorios. El cerebro puede estar intentando adaptarse a la ausencia de ciertas señales auditivas específicas o a la naturaleza persistente del acúfeno mediante la reorganización de las conexiones neuronales [189, 190].
3. Percepción auditiva alterada. Los cambios en las proyecciones neuronales podrían alterar la forma en que los individuos con pérdida auditiva y acúfenos perciben el sonido. El acúfeno puede afectar por sí mismo a la percepción de los sonidos externos, y el aumento de la actividad neuronal puede provocar cambios en la calidad o intensidad de las experiencias auditivas [19, 187].
4. Generación y mantenimiento del acúfeno. Las proyecciones neuronales adicionales pueden estar relacionadas con la generación y el mantenimiento del acúfeno. Se cree que el acúfeno implica cambios neuroplásticos desfavorables en las vías auditivas centrales, y el aumento de la actividad neural podría estar contribuyendo a la percepción continua de los sonidos del acúfeno [19, 187, 191].
5. Efectos emocionales y cognitivos. El acúfeno suele tener componentes emocionales y cognitivos, y las proyecciones neuronales aumentadas pueden contribuir a estos aspectos. Las alteraciones de la actividad neural pueden afectar potencialmente a la respuesta emocional al acúfeno, provocando ansiedad o angustia, y también pueden repercutir en procesos cognitivos como la atención y la concentración. Dependiendo de las circunstancias, los acontecimientos traumáticos también pueden contribuir a la aparición de acúfenos, cefaleas postraumáticas y problemas de memoria. Todos estos acontecimientos influyen en la salud psicológica y física a través de la generación, exacerbación y mantenimiento de síntomas como la ansiedad y la hiperactivación [192].
6. Implicaciones para el tratamiento. Comprender el aumento de las proyecciones neuronales es esencial para desarrollar tratamientos específicos para las personas que sufren hipoacusia y acúfenos. Para tratar la afección con eficacia, es posible que las

intervenciones terapéuticas deban abordar tanto la pérdida de audición como los cambios neuronales asociados al acúfeno [193].

Es fundamental reconocer que los efectos funcionales de la hipoacusia neurosensorial y el acúfeno pueden variar de un individuo a otro y que la relación entre los cambios neuronales y la experiencia de estas afecciones es compleja. Se necesita más investigación para comprender plenamente estas implicaciones y desarrollar abordajes personalizados para los individuos con hipoacusia y acúfeno crónico.

No se sabe cómo contribuyen las variantes raras de *ANK2* al desarrollo de acúfenos graves o a la formación de neuronas del oído interno en pacientes con EM. Como resultado, la generación de este modelo celular de acúfeno basado en iPSC con una mutación en *ANK2* es un paso inicial crucial para crear un recurso que permita estudiar el impacto de la mutación en el modelo celular de la EM durante el neurodesarrollo.

6. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con acúfeno severo y variantes raras en el gen *ANK2* presentan un endofenotipo con características clínicas, audiológicas y psicométricas específicas.
2. Los pacientes con acúfeno severo y variantes raras en el gen *ANK2* presentan un perfil clínico y psicológico definido por síntomas de ansiedad y depresión, aunque no se encuentran de forma consistente en todos los individuos estudiados. Más de la mitad de los pacientes con mutaciones en *ANK2* presentaban signos de deterioro cognitivo leve independiente de la edad de los individuos.
3. El fenotipo audiológico está definido por hiperacusia, acúfenos persistentes, mayoritariamente tipo ruido blanco, e hipoacusia neurosensorial de alta frecuencia, que se asocia con una amplitud mayor de la onda Pa en los potenciales evocados de latencia media en aquellos oídos afectados por el acúfeno, lo que puede reflejar una alteración de la sincronización neural a nivel subcortical y cortical.
4. El modelo celular del *ANK2* basado en iPSC demuestra alteraciones en la expresión a nivel de RNA y proteína, así como alteraciones morfoestructurales específicas con aumento en las proyecciones neuronales y dendritas, y constituye un modelo pre-clínico para el desarrollo de terapias farmacológicas y génicas para el tratamiento del acúfeno severo en este perfil de pacientes.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bartolami S, Gaboyard S, Quentin J, et al (2011) Critical roles of transitional cells and Na/K-ATPase in the formation of vestibular endolymph. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:16541–16549. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2430-11.2011>
2. Suarez C. Anatomía aplicada al hueso temporal. Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. 2: Panamericana; 1999. p. 661- 9
3. Goutman JD, Elgoyhen AB, Gómez-Casati ME (2015) Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. *FEBS Lett* 589:3354–3361. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.030>
4. Salesa Batlle E, Perelló Scherdel E, Bonavida Estupiñá A. Tratado de audiolología. 2nd. ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2013
5. Basterra J. Anatomía y Fisiología Aplicadas de la Cóclea y de sus Vías Centrales. Tratado de Otorrinolaringología y Patología Cérvicofacial. Elsevier Masson; 2009.
6. Pickles JO (2015) Auditory pathways: anatomy and physiology. *Handb Clin Neurol* 129:3–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62630-1.00001-9>
7. Peterson DC, Reddy V, Launico MV, Hamel RN (2024) Neuroanatomy, Auditory Pathway. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
8. Woods DL, Alain C (2009) Functional imaging of human auditory cortex. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 17:407–411. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e3283303330>
9. Hackett TA (2008) Anatomical organization of the auditory cortex. *J Am Acad Audiol* 19:774–779. <https://doi.org/10.3766/jaaa.19.10.5>
10. Gil-Loyzaga P (2005) Neuroplasticity in the auditory system. *Rev Laryngol - Otol - Rhinol* 126:203–207
11. Vona B, Nanda I, Shehata-Dieler W, Haaf T (2017) Genetics of Tinnitus: Still in its Infancy. *Front Neurosci* 11:236. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00236>
12. Lopez-Escamez JA, Bibas T, Cima RFF, et al (2016) Genetics of Tinnitus: An Emerging Area for Molecular Diagnosis and Drug Development. *Front Neurosci* 10:377. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00377>
13. De Ridder D, Schlee W, Vanneste S, et al (2021) Tinnitus and tinnitus disorder: Theoretical and operational definitions (an international multidisciplinary proposal). *Prog Brain Res* 260:1–25. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2020.12.002>

14. Shargorodsky J, Curhan GC, Farwell WR (2010) Prevalence and characteristics of tinnitus among US adults. *Am J Med* 123:711–718.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.02.015>
15. Lopez-Escamez JA, Amanat S (2020) Heritability and Genetics Contribution to Tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am* 53:501–513.
<https://doi.org/10.1016/j.otc.2020.03.003>
16. Eggermont JJ, Roberts LE (2004) The neuroscience of tinnitus. *Trends Neurosci* 27:676–682. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.010>
17. Noreña AJ, Farley BJ (2013) Tinnitus-related neural activity: theories of generation, propagation, and centralization. *Hear Res* 295:161–171.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.09.010>
18. Eggermont JJ (2005) Tinnitus: neurobiological substrates. *Drug Discov Today* 10:1283–1290. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03542-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03542-7)
19. Eggermont JJ, Tass PA (2015) Maladaptive neural synchrony in tinnitus: origin and restoration. *Front Neurol* 6:29. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00029>
20. Eggermont JJ (2015) Tinnitus and neural plasticity (Tonndorf lecture at XIth International Tinnitus Seminar, Berlin, 2014). *Hear Res* 319:1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2014.10.002>
21. Paul BT, Bruce IC, Roberts LE (2017) Evidence that hidden hearing loss underlies amplitude modulation encoding deficits in individuals with and without tinnitus. *Hear Res* 344:170–182. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.11.010>
22. Lowe AS, Walton JP (2015) Alterations in peripheral and central components of the auditory brainstem response: a neural assay of tinnitus. *PloS One* 10:e0117228.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117228>
23. Jastreboff PJ, Hazell JW (1993) A neurophysiological approach to tinnitus: clinical implications. *Br J Audiol* 27:7–17. <https://doi.org/10.3109/03005369309077884>
24. Erlandsson SI, Hallberg LR (2000) Prediction of quality of life in patients with tinnitus. *Br J Audiol* 34:11–20. <https://doi.org/10.3109/03005364000000114>
25. Brüggemann P, Szczepek AJ, Rose M, et al (2016) Impact of Multiple Factors on the Degree of Tinnitus Distress. *Front Hum Neurosci* 10:341.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00341>
26. Geocze L, Mucci S, Abranches DC, et al (2013) Systematic review on the evidences of an association between tinnitus and depression. *Braz J Otorhinolaryngol* 79:106–111. <https://doi.org/10.5935/1808-8694.20130018>
27. Marciano E, Carrabba L, Giannini P, et al (2003) Psychiatric comorbidity in a population of outpatients affected by tinnitus. *Int J Audiol* 42:4–9.
<https://doi.org/10.3109/14992020309056079>

28. Andersson G, Carlbring P, Kaldö V, Ström L (2004) Screening of psychiatric disorders via the Internet. A pilot study with tinnitus patients. *Nord J Psychiatry* 58:287–291. <https://doi.org/10.1080/08039480410005792>
29. Perez-Carpena P, Martinez-Martinez M, Martínez Carranza RA, et al (2019) A tinnitus symphony in 100 patients with Meniere's disease. *Clin Otolaryngol Off J ENT-UK Off J Neth Soc Oto-Rhino-Laryngol Cervico-Facial Surg* 44:1176–1180. <https://doi.org/10.1111/coa.13438>
30. Belli S, Belli H, Bahcebasi T, et al (2008) Assessment of psychopathological aspects and psychiatric comorbidities in patients affected by tinnitus. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg* 265:279–285. <https://doi.org/10.1007/s00405-007-0440-8>
31. Bhatt JM, Bhattacharyya N, Lin HW (2017) Relationships between tinnitus and the prevalence of anxiety and depression. *The Laryngoscope* 127:466–469. <https://doi.org/10.1002/lary.26107>
32. Das SK, Wineland A, Kallogjeri D, Piccirillo JF (2012) Cognitive speed as an objective measure of tinnitus. *The Laryngoscope* 122:2533–2538. <https://doi.org/10.1002/lary.23555>
33. Pierce KJ, Kallogjeri D, Piccirillo JF, et al (2012) Effects of severe bothersome tinnitus on cognitive function measured with standardized tests. *J Clin Exp Neuropsychol* 34:126–134. <https://doi.org/10.1080/13803395.2011.623120>
34. Malesci R, Brigato F, Di Cesare T, et al (2021) Tinnitus and Neuropsychological Dysfunction in the Elderly: A Systematic Review on Possible Links. *J Clin Med* 10:1881. <https://doi.org/10.3390/jcm10091881>
35. Lin FR, Yaffe K, Xia J, et al (2013) Hearing loss and cognitive decline in older adults. *JAMA Intern Med* 173:293–299. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.1868>
36. Jafari Z, Kolb BE, Mohajerani MH (2019) Age-related hearing loss and tinnitus, dementia risk, and auditory amplification outcomes. *Ageing Res Rev* 56:100963. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100963>
37. Lin FR, Ferrucci L, Metter EJ, et al (2011) Hearing loss and cognition in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neuropsychology* 25:763–770. <https://doi.org/10.1037/a0024238>
38. Amieva H, Ouvrard C, Giulioli C, et al (2015) Self-Reported Hearing Loss, Hearing Aids, and Cognitive Decline in Elderly Adults: A 25-Year Study. *J Am Geriatr Soc* 63:2099–2104. <https://doi.org/10.1111/jgs.13649>
39. Bernal-Robledano A, Perez-Carpena P, Kikidis D, et al (2024) Cognitive Screening and Hearing Assessment in Patients With Chronic Tinnitus. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 17:15–25. <https://doi.org/10.21053/ceo.2023.00808>

40. Schoisswohl S, Langguth B, Schecklmann M, et al (2021) Unification of Treatments and Interventions for Tinnitus Patients (UNITI): a study protocol for a multi-center randomized clinical trial. *Trials* 22:875. <https://doi.org/10.1186/s13063-021-05835-z>
41. Shore SE, Roberts LE, Langguth B (2016) Maladaptive plasticity in tinnitus--triggers, mechanisms and treatment. *Nat Rev Neurol* 12:150–160. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.12>
42. Roberts LE, Eggermont JJ, Caspary DM, et al (2010) Ringing ears: the neuroscience of tinnitus. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:14972–14979. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4028-10.2010>
43. Marriage J, Barnes NM (1995) Is central hyperacusis a symptom of 5-hydroxytryptamine (5-HT) dysfunction? *J Laryngol Otol* 109:915–921. <https://doi.org/10.1017/s0022215100131676>
44. Sahley TL, Hammonds MD, Musiek FE (2013) Endogenous dynorphins, glutamate and N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors may participate in a stress-mediated Type-I auditory neural exacerbation of tinnitus. *Brain Res* 1499:80–108. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.006>
45. Schecklmann M, Landgrebe M, Langguth B, TRI Database Study Group (2014) Phenotypic characteristics of hyperacusis in tinnitus. *PloS One* 9:e86944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086944>
46. Cederroth CR, PirouziFard M, Trpchevska N, et al (2019) Association of Genetic vs Environmental Factors in Swedish Adoptees With Clinically Significant Tinnitus. *JAMA Otolaryngol-- Head Neck Surg* 145:222–229. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2018.3852>
47. Amanat S, Gallego-Martinez A, Lopez-Escamez JA (2021) Genetic Inheritance and Its Contribution to Tinnitus. *Curr Top Behav Neurosci* 51:29–47. https://doi.org/10.1007/7854_2020_155
48. Trpchevska N, Bulla J, Prada Hellberg M, et al (2020) Sex-Dependent Aggregation of Tinnitus in Swedish Families. *J Clin Med* 9:3812. <https://doi.org/10.3390/jcm9123812>
49. Sand PG, Luetlich A, Kleinjung T, et al (2010) An Examination of KCNE1 Mutations and Common Variants in Chronic Tinnitus. *Genes* 1:23–37. <https://doi.org/10.3390/genes1010023>
50. Deniz M, Bayazit YA, Celenk F, et al (2010) Significance of serotonin transporter gene polymorphism in tinnitus. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol* 31:19–24. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3181c2dcbc>
51. Sand PG, Langguth B, Kleinjung T (2011) Deep resequencing of the voltage-gated potassium channel subunit KCNE3 gene in chronic tinnitus. *Behav Brain Funct* BBF 7:39. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-7-39>

52. Pg S, B L, M S, T K (2012) GDNF and BDNF gene interplay in chronic tinnitus. *Int J Mol Epidemiol Genet* 3:245–251
53. Sand PG, Langguth B, Itzhacki J, et al (2012) Resequencing of the auxiliary GABA(B) receptor subunit gene KCTD12 in chronic tinnitus. *Front Syst Neurosci* 6:41. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2012.00041>
54. Orenay-Boyacioglu S, Coskunoglu A, Caki Z, Cam FS (2016) Relationship Between Chronic Tinnitus and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene rs3812047, rs1110149, and rs884344 Polymorphisms in a Turkish Population. *Biochem Genet* 54:552–563. <https://doi.org/10.1007/s10528-016-9741-1>
55. Gilles A, Van Camp G, Van de Heyning P, Fransen E (2017) A Pilot Genome-Wide Association Study Identifies Potential Metabolic Pathways Involved in Tinnitus. *Front Neurosci* 11:71. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00071>
56. Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V (2002) The ankyrin-B C-terminal domain determines activity of ankyrin-B/G chimeras in rescue of abnormal inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distribution in ankyrin-B (-/-) neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 277:10599–10607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110958200>
57. Yang R, Walder-Christensen KK, Kim N, et al (2019) ANK2 autism mutation targeting giant ankyrin-B promotes axon branching and ectopic connectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:15262–15271. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904348116>
58. Kuba H, Oichi Y, Ohmori H (2010) Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465:1075–1078. <https://doi.org/10.1038/nature09087>
59. Amanat S, Gallego-Martinez A, Sollini J, et al (2021) Burden of rare variants in synaptic genes in patients with severe tinnitus: An exome based extreme phenotype study. *EBioMedicine* 66:103309. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103309>
60. Salzer JL (2019) An unfolding role for ankyrin-G at the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:19228–19230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914002116>
61. Swayne LA, Murphy NP, Asuri S, et al (2017) Novel Variant in the ANK2 Membrane-Binding Domain Is Associated With Ankyrin-B Syndrome and Structural Heart Disease in a First Nations Population With a High Rate of Long QT Syndrome. *Circ Cardiovasc Genet* 10:e001537. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001537>
62. Khalfa S, Bruneau N, Rogé B, et al (2004) Increased perception of loudness in autism. *Hear Res* 198:87–92. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2004.07.006>
63. Vanneste S, Plazier M, der Loo E van, et al (2010) The neural correlates of tinnitus-related distress. *NeuroImage* 52:470–480. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.04.029>

64. Schlee W, Weisz N, Bertrand O, et al (2008) Using auditory steady state responses to outline the functional connectivity in the tinnitus brain. *PloS One* 3:e3720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003720>
65. Mennink LM, van Dijk JMC, van Dijk P (2020) The cerebellar (para)floculus: A review on its auditory function and a possible role in tinnitus. *Hear Res* 398:108081. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.108081>
66. Landgrebe M, Langguth B, Rosengarth K, et al (2009) Structural brain changes in tinnitus: grey matter decrease in auditory and non-auditory brain areas. *NeuroImage* 46:213–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.01.069>
67. He S, Nakada D, Morrison SJ (2009) Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:377–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>
68. Hammachi F, Morrison GM, Sharov AA, et al (2012) Transcriptional activation by Oct4 is sufficient for the maintenance and induction of pluripotency. *Cell Rep* 1:99–109. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2011.12.002>
69. Real PJ, Ligerio G, Ayllon V, et al (2012) SCL/TAL1 regulates hematopoietic specification from human embryonic stem cells. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 20:1443–1453. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.49>
70. Liu B, Ohishi K, Yamamura K, et al (2010) A potential activity of valproic acid in the stimulation of interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis. *Exp Hematol* 38:685–695. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.03.019>
71. Lu H-E, Tsai M-S, Yang Y-C, et al (2011) Selection of alkaline phosphatase-positive induced pluripotent stem cells from human amniotic fluid-derived cells by feeder-free system. *Exp Cell Res* 317:1895–1903. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.05.017>
72. Singh U, Quintanilla RH, Grecian S, et al (2012) Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 8:1021–1029. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9359-6>
73. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, et al (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061–1073. <https://doi.org/10.1038/nature09534>
74. Schell J (2012) Spontaneous Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells via Embryoid Body Formation. pp 363–373
75. Nelakanti RV, Kooreman NG, Wu JC (2015) Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 32:4A.8.1-4A.8.17. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc04a08s32>
76. Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al (2017) Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* 168:473–486.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.036>

77. Sánchez CG-S (2014) Sobre la aplicación extensiva de las funciones del Banco Nacional de Líneas Celulares Embrionarias y Adultas a las Líneas Celulares IPS. Una interpretación a la luz del art. 3.1 del Código Civil. *Rev Bioét Derecho* 3–20. <https://doi.org/10.1344/rbd2014.30.9903>
78. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
79. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324:797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>
80. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
81. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:348–362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
82. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
83. Zhou W, Freed CR (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 27:2667–2674. <https://doi.org/10.1002/stem.201>
84. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8:409–412. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1591>
85. Park HY, Noh EH, Chung H-M, et al (2012) Efficient generation of virus-free iPS cells using liposomal magnetofection. *PloS One* 7:e45812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045812>
86. Stadtfeld M, Hochedlinger K (2010) Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24:2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>
87. Smith ZD, Nachman I, Regev A, Meissner A (2010) Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat Biotechnol* 28:521–526. <https://doi.org/10.1038/nbt.1632>
88. de Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelos K (2014) Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? *J Control Release Off J Control Release Soc* 185:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.011>
89. Barad L, Schick R, Zeevi-Levin N, et al (2014) Human embryonic stem cells vs human induced pluripotent stem cells for cardiac repair. *Can J Cardiol* 30:1279–1287. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.06.023>

90. Fox JG. The Mouse in Biomedical Research. Academic Press, 2^a edition; 2006
91. Khanna R, Burrows SR (2011) Human immunology: a case for the ascent of non-furry immunology. *Immunol Cell Biol* 89:330–331. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.173>
92. Molecular Medicine: An Introduction | Wiley. In: Wiley.com. <https://www.wiley.com/en-us/Molecular+Medicine%3A+An+Introduction-p-9783527331895>. Accessed 5 Sep 2024
93. Del Álamo JC, Lemons D, Serrano R, et al (2016) High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development. *Biochim Biophys Acta* 1863:1717–1727. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.003>
94. Cayo MA, Mallanna SK, Di Furio F, et al (2017) A drug screen using human iPSC-derived hepatocyte-like cells identifies cardiac glycosides as a potential treatment for hypercholesterolemia. *Cell Stem Cell* 20:478–489.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.01.011>
95. Yahata N, Asai M, Kitaoka S, et al (2011) Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PloS One* 6:e25788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025788>
96. Brender JD, Shinde MU, Zhan FB, et al (2014) Maternal residential proximity to chlorinated solvent emissions and birth defects in offspring: a case-control study. *Environ Health Glob Access Sci Source* 13:96. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-96>
97. Palmer JA, Smith AM, Egnash LA, et al (2013) Establishment and assessment of a new human embryonic stem cell-based biomarker assay for developmental toxicity screening. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 98:343–363. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21078>
98. Kameoka S, Babiarz J, Kolaja K, Chiao E (2014) A high-throughput screen for teratogens using human pluripotent stem cells. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 137:76–90. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft239>
99. Sharma A, McKeithan WL, Serrano R, et al (2018) Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity. *Nat Protoc* 13:3018–3041. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0076-8>
100. Sirenko O, Hesley J, Rusyn I, Cromwell EF (2014) High-content assays for hepatotoxicity using induced pluripotent stem cell-derived cells. *Assay Drug Dev Technol* 12:43–54. <https://doi.org/10.1089/adt.2013.520>
101. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461:402–406. <https://doi.org/10.1038/nature08320>
102. Briggs JA, Sun J, Shepherd J, et al (2013) Integration-free induced pluripotent stem cells model genetic and neural developmental features of down syndrome etiology. *Stem Cells Dayt Ohio* 31:467–478. <https://doi.org/10.1002/stem.1297>

103. Tan Q, Lui PPY, Rui YF, Wong YM (2012) Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 18:840–851. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0362>
104. Tan PH, Xue S-A, Manunta M, et al (2006) Effect of vectors on human endothelial cell signal transduction: implications for cardiovascular gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:462–467. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000200083.95349.9e>
105. Daley GQ, Hyun I, Apperley JF, et al (2016) Setting Global Standards for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2016 ISSCR Guidelines. *Stem Cell Rep* 6:787–797. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.001>
106. Salesa Batlle E, Perelló Scherdel E, Bonavida Estupiñá A. *Tratado de audiología*. 2nd. ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2013.
107. Sutton S, Tueting P, Zubin J, John ER (1967) Information delivery and the sensory evoked potential. *Science* 155:1436–1439. <https://doi.org/10.1126/science.155.3768.1436>
108. Picton TW, Bentin S, Berg P, et al (2000) Guidelines for using human event-related potentials to study cognition: recording standards and publication criteria. *Psychophysiology* 37:127–152
109. Ciges M, Artieda J, Sáinz M. *Potenciales Evocados Somatosensoriales, Visuales y Auditivos*. Granada. Editora Regional del Sur; 1992.
110. Gordon KA, Papsin BC, Harrison RV (2007) Auditory brainstem activity and development evoked by apical versus basal cochlear implant electrode stimulation in children. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 118:1671–1684. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.04.030>
111. Hernández J, Zenker F, Barajas J (2003) Normalización de los Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral I: Resultados en una muestra de adultos normoyentes. *Audit Rev Electrónica Audiol* 2:13–18. <https://doi.org/10.51445/sja.auditio.vol2.2003.0020>
112. Pérez-González D, Malmierca MS (2014) Adaptation in the auditory system: an overview. *Front Integr Neurosci* 8:19. <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00019>
113. Jewett DL, Romano MN, Williston JS (1970) Human auditory evoked potentials: possible brain stem components detected on the scalp. *Science* 167:1517–1518. <https://doi.org/10.1126/science.167.3924.1517>
114. Melcher JR, Kiang NY (1996) Generators of the brainstem auditory evoked potential in cat. III: Identified cell populations. *Hear Res* 93:52–71. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(95\)00200-6](https://doi.org/10.1016/0378-5955(95)00200-6)
115. Katz J. *Handbook of Clinical Audiology*. Lippincott Williams and Wilkins; 7th International edition. 2014

116. Rupa V, Job A, George M, Rajshekhar V (2003) Cost-effective initial screening for vestibular schwannoma: auditory brainstem response or magnetic resonance imaging? *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 128:823–828. <https://doi.org/10.1016/S0194-59980300358-9>
117. Chalak S, Kale A, Deshpande VK, Biswas DA (2013) Establishment of Normative data for Monaural Recordings of Auditory Brainstem Response and its Application in Screening Patients with Hearing Loss: A Cohort Study. *J Clin Diagn Res JCDR* 7:2677–2679. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6768.3730>
118. Hultcrantz M, Simonoska R, Stenberg AE (2006) Estrogen and hearing: a summary of recent investigations. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 126:10–14. <https://doi.org/10.1080/00016480510038617>
119. Sainz M, Martinez F, Ciges M, et al (1987) Brainstem and middle latency auditory evoked responses in rabbits with halothane anaesthesia. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 103:613–619
120. Watson DR (1996) The effects of cochlear hearing loss, age and sex on the auditory brainstem response. *Audiol Off Organ Int Soc Audiol* 35:246–258. <https://doi.org/10.3109/00206099609071945>
121. Lewis JD, Kopun J, Neely ST, et al (2015) Tone-burst auditory brainstem response wave V latencies in normal-hearing and hearing-impaired ears. *J Acoust Soc Am* 138:3210–3219. <https://doi.org/10.1121/1.4935516>
122. Kujawa SG, Liberman MC (2009) Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:14077–14085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009>
123. Liberman MC, Kujawa SG (2017) Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear Res* 349:138–147. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.01.003>
124. Schaette R, McAlpine D (2011) Tinnitus with a normal audiogram: physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:13452–13457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2156-11.2011>
125. Gu JW, Herrmann BS, Levine RA, Melcher JR (2012) Brainstem auditory evoked potentials suggest a role for the ventral cochlear nucleus in tinnitus. *J Assoc Res Otolaryngol JARO* 13:819–833. <https://doi.org/10.1007/s10162-012-0344-1>
126. Konrad-Martin D, Dille MF, McMillan G, et al (2012) Age-related changes in the auditory brainstem response. *J Am Acad Audiol* 23:18–35; quiz 74–75. <https://doi.org/10.3766/jaaa.23.1.3>
127. Scherg M, Volk SA (1983) Frequency specificity of simultaneously recorded early and middle latency auditory evoked potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 56:443–452. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(83\)90227-4](https://doi.org/10.1016/0013-4694(83)90227-4)

128. Weihing J, Musiek F (2014) The influence of aging on interaural asymmetries in middle latency response amplitude. *J Am Acad Audiol* 25:324–334. <https://doi.org/10.3766/jaaa.25.4.4>
129. Hall JW. *eHandbook of Auditory Evoked Responses*; Pearson education. 2015.
130. McGee T, Kraus N (1996) Auditory development reflected by middle latency response. *Ear Hear* 17:419–429. <https://doi.org/10.1097/00003446-199610000-00008>
131. Musiek F, Nagle S (2018) The Middle Latency Response: A Review of Findings in Various Central Nervous System Lesions. *J Am Acad Audiol* 29:855–867. <https://doi.org/10.3766/jaaa.16141>
132. McGee T, Kraus N, Manfredi C (1988) Toward a strategy for analyzing the auditory middle-latency response waveform. *Audiol Off Organ Int Soc Audiol* 27:119–130. <https://doi.org/10.3109/00206098809081582>
133. Gerken GM (1996) Central tinnitus and lateral inhibition: an auditory brainstem model. *Hear Res* 97:75–83
134. Diesch E, Struve M, Rupp A, et al (2004) Enhancement of steady-state auditory evoked magnetic fields in tinnitus. *Eur J Neurosci* 19:1093–1104. <https://doi.org/10.1111/j.0953-816x.2004.03191.x>
135. WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.
136. Declaración Universal sobre el genoma humano y los derechos humanos. In: OHCHR.
137. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.
138. Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales
139. Escalera-Balsera A, Parra-Perez AM, Gallego-Martinez A, et al (2023) Rare Deletions or Large Duplications Contribute to Genetic Variation in Patients with Severe Tinnitus and Meniere Disease. *Genes* 15:22. <https://doi.org/10.3390/genes15010022>
140. Szczepek AJ, Frejo L, Vona B, et al (2019) Recommendations on Collecting and Storing Samples for Genetic Studies in Hearing and Tinnitus Research. *Ear Hear* 40:219–226. <https://doi.org/10.1097/AUD.0000000000000614>
141. Martin-Lagos J, Bernal-Robledano A, Perez-Carpena P, et al (2024) Phenotypic spectrum of tinnitus patients bearing rare ANK2 gene variants. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg*. <https://doi.org/10.1007/s00405-024-08561-9>
142. International Organization for Standardization. 1998. Acoustics. Reference zero for the calibration of audiometric equipment. Part 1: Reference equivalent threshold sound pressure levels for pure tones and supraaural earphones. ISO 389-1. Geneva: ISO.

143. International Electrotechnical Commission. 2001. Electroacoustics. Audiological equipment - Part 1: Pure-tone audiometers. IEC 60645-1. Geneva: IEC.
144. International Organization for Standardization. 2010. Acoustics. Audiometric test methods - Part 1: Pure-tone air and bone conduction audiometry. ISO 8253-1. Geneva: ISO.
145. Tunkel DE, Bauer CA, Sun GH, et al (2014) Clinical practice guideline: tinnitus. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg* 151:S1–S40. <https://doi.org/10.1177/0194599814545325>
146. Herráiz C, Hernández Calvín J, Plaza G, et al (2001) [Disability evaluation in patients with tinnitus]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 52:534–538. [https://doi.org/10.1016/s0001-6519\(01\)78247-7](https://doi.org/10.1016/s0001-6519(01)78247-7)
147. Raj-Koziak D, Gos E, Swierniak W, et al (2018) Visual Analogue Scales as a Tool for Initial Assessment of Tinnitus Severity: Psychometric Evaluation in a Clinical Population. *Audiol Neurotol* 23:229–237. <https://doi.org/10.1159/000494021>
148. Herráiz C, de los Santos G, Diges I, et al (2006) [Assessment of hyperacusis: the self-rating questionnaire on hypersensitivity to sound]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 57:303–306. [https://doi.org/10.1016/s0001-6519\(06\)78716-7](https://doi.org/10.1016/s0001-6519(06)78716-7)
149. Diez-Quevedo C, Rangil T, Sanchez-Planell L, et al (2001) Validation and utility of the patient health questionnaire in diagnosing mental disorders in 1003 general hospital Spanish inpatients. *Psychosom Med* 63:679–686. <https://doi.org/10.1097/00006842-200107000-00021>
150. Herrero MJ, Blanch J, Peri JM, et al (2003) A validation study of the hospital anxiety and depression scale (HADS) in a Spanish population. *Gen Hosp Psychiatry* 25:277–283. [https://doi.org/10.1016/s0163-8343\(03\)00043-4](https://doi.org/10.1016/s0163-8343(03)00043-4)
151. Aguilar-Navarro SG, Mimenza-Alvarado AJ, Palacios-García AA, et al (2018) Validity and Reliability of the Spanish Version of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) for the Detection of Cognitive Impairment in Mexico. *Rev Colomb Psiquiatr Engl Ed* 47:237–243. <https://doi.org/10.1016/j.rcp.2017.05.003>
152. Newman CW, Sandridge SA, Jacobson GP (1998) Psychometric adequacy of the Tinnitus Handicap Inventory (THI) for evaluating treatment outcome. *J Am Acad Audiol* 9:153–160
153. Newman CW, Jacobson GP, Spitzer JB (1996) Development of the Tinnitus Handicap Inventory. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:143–148. <https://doi.org/10.1001/archotol.1996.01890140029007>
154. Nelting M, Rienhoff NK, Hesse G, Lamparter U (2002) [The assessment of subjective distress related to hyperacusis with a self-rating questionnaire on hypersensitivity to sound]. *Laryngorhinootologie* 81:327–334. <https://doi.org/10.1055/s-2002-28342>

155. Löwe B, Schenkel I, Carney-Doebbeling C, Göbel C (2006) Responsiveness of the PHQ-9 to Psychopharmacological Depression Treatment. *Psychosomatics* 47:62–67. <https://doi.org/10.1176/appi.psy.47.1.62>
156. Spitzer RL, Kroenke K, Williams JB (1999) Validation and utility of a self-report version of PRIME-MD: the PHQ primary care study. *Primary Care Evaluation of Mental Disorders. Patient Health Questionnaire. JAMA* 282:1737–1744. <https://doi.org/10.1001/jama.282.18.1737>
157. Adoga AA, Kokong DD, Nimkur TL, Okwori ET (2015) The impact of tinnitus on adult Nigerians: health related Quality of Life assessment of sufferers using the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) and the RAND-36 item health survey 1.0 questionnaire. *Int Tinnitus J* 19:26–32. <https://doi.org/10.5935/0946-5448.20150005>
158. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, et al (2005) The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 53:695–699. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x>
159. Schlee W, Schoisswohl S, Staudinger S, et al (2021) Towards a unification of treatments and interventions for tinnitus patients: The EU research and innovation action UNITI. *Prog Brain Res* 260:441–451. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2020.12.005>
160. Manta O, Sarafidis M, Vasileiou N, et al (2022) Development and Evaluation of Automated Tools for Auditory-Brainstem and Middle-Auditory Evoked Potentials Waves Detection and Annotation. *Brain Sci* 12:1675. <https://doi.org/10.3390/brainsci12121675>
161. Montes R, Romero T, Cabrera S, et al (2015) Generation and characterization of the human iPSC line PBMC1-iPS4F1 from adult peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res* 15:614–617. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.10.009>
162. Lamolda M, Frejo L, Gallego-Martinez A, Lopez-Escamez JA (2023) Application of Human Stem Cells to Model Genetic Sensorineural Hearing Loss and Meniere Disease. *Cells* 12:988. <https://doi.org/10.3390/cells12070988>
163. Boddy SL, Romero-Guevara R, Ji A-R, et al (2020) Generation of Otic Lineages from Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells Reprogrammed by mRNAs. *Stem Cells Int* 2020:3692937. <https://doi.org/10.1155/2020/3692937>
164. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
165. Amanat S, Requena T, Lopez-Escamez JA (2020) A Systematic Review of Extreme Phenotype Strategies to Search for Rare Variants in Genetic Studies of Complex Disorders. *Genes* 11:987. <https://doi.org/10.3390/genes11090987>
166. Noble W, Tyler R (2007) Physiology and phenomenology of tinnitus: implications for treatment. *Int J Audiol* 46:569–574. <https://doi.org/10.1080/14992020701506296>

167. Aazh H, Moore BCJ, Lammaing K, Cropley M (2016) Tinnitus and hyperacusis therapy in a UK National Health Service audiology department: Patients' evaluations of the effectiveness of treatments. *Int J Audiol* 55:514–522. <https://doi.org/10.1080/14992027.2016.1178400>
168. Aazh H, McFerran D, Salvi R, et al (2014) Insights from the First International Conference on Hyperacusis: causes, evaluation, diagnosis and treatment. *Noise Health* 16:123–126. <https://doi.org/10.4103/1463-1741.132100>
169. Cederroth CR, Lugo A, Edvall NK, et al (2020) Association between Hyperacusis and Tinnitus. *J Clin Med* 9:2412. <https://doi.org/10.3390/jcm9082412>
170. Zeng F-G (2020) Tinnitus and hyperacusis: Central noise, gain and variance. *Curr Opin Physiol* 18:123–129. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.10.009>
171. Andersson G, McKenna L (2006) The role of cognition in tinnitus. *Acta Otolaryngol Suppl* 39–43. <https://doi.org/10.1080/03655230600895226>
172. Wang Y, Zhang J-N, Hu W, et al (2018) The characteristics of cognitive impairment in subjective chronic tinnitus. *Brain Behav* 8:e00918. <https://doi.org/10.1002/brb3.918>
173. Henton A, Tzounopoulos T (2021) What's the buzz? The neuroscience and the treatment of tinnitus. *Physiol Rev* 101:1609–1632. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2020>
174. Edvall NK, Mehraei G, Claeson M, et al (2022) Alterations in auditory brain stem response distinguish occasional and constant tinnitus. *J Clin Invest* 132:e155094. <https://doi.org/10.1172/JCI155094>
175. Song JH, Banai K, Kraus N (2008) Brainstem timing deficits in children with learning impairment may result from corticofugal origins. *Audiol Neurotol* 13:335–344. <https://doi.org/10.1159/000132689>
176. Milloy V, Fournier P, Benoit D, et al (2017) Auditory Brainstem Responses in Tinnitus: A Review of Who, How, and What? *Front Aging Neurosci* 9:237. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00237>
177. Matas CG, Neves IF, Carvalho FM de, Leite RA (2009) Post-auricular muscle reflex in the Middle Latency Evoked Auditory Response. *Braz J Otorhinolaryngol* 75:579–585. [https://doi.org/10.1016/s1808-8694\(15\)30499-7](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)30499-7)
178. Gerken GM, Hesse PS, Wiorkowski JJ (2001) Auditory evoked responses in control subjects and in patients with problem-tinnitus. *Hear Res* 157:52–64. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(01\)00277-5](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(01)00277-5)
179. Doss MX, Sachinidis A (2019) Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells* 8:403. <https://doi.org/10.3390/cells8050403>

180. Kawano S, Baba M, Fukushima H, et al (2022) Autism-associated ANK2 regulates embryonic neurodevelopment. *Biochem Biophys Res Commun* 605:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.058>
181. Longenecker RJ, Galazyuk AV (2016) Variable Effects of Acoustic Trauma on Behavioral and Neural Correlates of Tinnitus In Individual Animals. *Front Behav Neurosci* 10:207. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00207>
182. Unda BK, Chalil L, Yoon S, et al (2023) Impaired OTUD7A-dependent Ankyrin regulation mediates neuronal dysfunction in mouse and human models of the 15q13.3 microdeletion syndrome. *Mol Psychiatry* 28:1747–1769. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01937-5>
183. Jin X, Simmons SK, Guo A, et al (2020) In vivo Perturb-Seq reveals neuronal and glial abnormalities associated with autism risk genes. *Science* 370:eaaz6063. <https://doi.org/10.1126/science.aaz6063>
184. Bouchard M, de Caprona D, Busslinger M, et al (2010) Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev Biol* 10:89. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-89>
185. Ding Y, Meng W, Kong W, et al (2020) The Role of FoxG1 in the Inner Ear. *Front Cell Dev Biol* 8:614954. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.614954>
186. Elliott KL, Pavlínková G, Chizhikov VV, et al (2021) Development in the Mammalian Auditory System Depends on Transcription Factors. *Int J Mol Sci* 22:4189. <https://doi.org/10.3390/ijms22084189>
187. Henry JA, Roberts LE, Caspary DM, et al (2014) Underlying mechanisms of tinnitus: review and clinical implications. *J Am Acad Audiol* 25:5–22; quiz 126. <https://doi.org/10.3766/jaaa.25.1.2>
188. Hébert S, Fournier P, Noreña A (2013) The auditory sensitivity is increased in tinnitus ears. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:2356–2364. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3461-12.2013>
189. Gentil A, Deverdun J, Menjot de Champfleury N, et al (2019) Alterations in Regional Homogeneity in Patients With Unilateral Chronic Tinnitus. *Trends Hear* 23:2331216519830237. <https://doi.org/10.1177/2331216519830237>
190. Joo JW, Jeong YJ, Han MS, et al (2020) Analysis of Auditory Brainstem Response Change, according to Tinnitus Duration, in Patients with Tinnitus with Normal Hearing. *J Int Adv Otol* 16:190–196. <https://doi.org/10.5152/iao.2020.7951>
191. Wang K, Tang D, Ma J, Sun S (2020) Auditory Neural Plasticity in Tinnitus Mechanisms and Management. *Neural Plast* 2020:7438461. <https://doi.org/10.1155/2020/7438461>
192. Fagelson M (2022) Tinnitus and Traumatic Memory. *Brain Sci* 12:1585. <https://doi.org/10.3390/brainsci12111585>

193. Singh A, Smith PF, Zheng Y (2023) Targeting the Limbic System: Insights into Its Involvement in Tinnitus. *Int J Mol Sci* 24:9889.
<https://doi.org/10.3390/ijms24129889>

8. ANEXOS

Anexo 1. Modelo de consentimiento informado y hoja de información al paciente.

Hoja informativa y consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE **Caracterización fenotípica de pacientes con acúfeno severo**

Antes de firmar este consentimiento informado, lea la información provista a lo largo del documento cuidadosamente y pregunte cualquier duda que tenga.

Naturaleza:

El acúfeno es un síntoma heterogéneo que se presenta en el 10% de la población general. Es considerado un síntoma molesto por el 10-20% de pacientes afectados, y puede correlacionarse con una disminución significativa de la calidad de vida. A pesar del gran impacto, no existe una terapia universalmente aceptada frente a todos los casos de acúfenos.

Se ha demostrado una elevada carga de variantes raras en el gen *ANK-2* en pacientes con acúfeno severo. Este gen participa en mecanismos de conectividad en las regiones cerebrales auditivas y no auditivas que finalmente provocan este síntoma.

Un obstáculo importante en el desarrollo de estrategias efectivas para tratar el acúfeno es la falta de medidas objetivas que puedan usarse para evaluar los resultados del tratamiento. Esto ha llevado al establecimiento de cuestionarios de autoevaluación como la mejor alternativa para determinar el grado de afectación de la calidad de vida de un individuo. Por otra parte, sabemos que la vía auditiva transmite y procesa señales de sonido desde el oído hasta la corteza del cerebro. El estudio de estas señales neurofisiológicas, denominadas Potenciales Evocados Auditivos de corta y media latencia, pueden proporcionar medios para detectar alteraciones neurológicas que ocurran en pacientes con acúfeno severo.

Nuestra hipótesis sugiere que aquellos pacientes con acúfeno severo y variantes raras en el gen *ANK2* presentan características específicas que pueden permitir la orientación del tratamiento y seguimiento de pacientes con estos perfiles clínicos específicos.

Para nuestro estudio necesitamos realizar 3 baterías de pruebas para la caracterización psicoacústica, psicométrica y neurofisiológica del paciente:

- Audiometría Tonal Liminar, Audiometría Tonal de Alta Frecuencia (HF) y Acufenometría (duración aproximada de 15-20 minutos).
- 6 cuestionarios estandarizados y validados en castellano para su contestación por parte del paciente (duración aproximada de 20-30 minutos).
- Estudio neurofisiológico mediante Potenciales Evocados Auditivos del Tronco Cerebral (PEATC) y Potenciales Evocados Auditivos de Latencia Media (PEALM) (duración aproximada de 30 minutos).

La duración total de la evaluación será de aproximadamente de 1h y 15 minutos. Será realizada en una o dos sesiones diferentes, dependiendo de la disponibilidad del laboratorio de audiología. Este estudio no contempla el uso de ningún tipo de medicación ni fármacos experimentales en estudio.

Importancia:

Le ofrecemos la posibilidad de participar **voluntariamente** en un estudio de investigación que nos permita determinar el perfil psicoacústico, psicométrico y neurofisiológico de pacientes con acúfeno severo asociado a variantes raras en el gen *ANK2* a fin de orientar el tratamiento, seguimiento clínico y el pronóstico.

Implicaciones para el paciente:

- La participación es totalmente voluntaria.
- El paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto afecte a su atención médica.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.
- La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

Riesgos de la investigación para el paciente

No existe ningún riesgo asociado a la realización de estudio psicoacústico, psicométrico y neurofisiológico en pacientes con acúfeno crónico.

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE
Caracterización fenotípica de pacientes con acúfeno severo

Yo (Nombre y Apellidos)

con DNI.....

1. Confirmando que he leído la hoja informativa, con fecha _____ para el presente estudio. He tenido la oportunidad de considerar la información, hacer preguntas y haber resuelto mis dudas satisfactoriamente.
2. Entiendo que mi participación es voluntaria y que soy libre de retirarme en cualquier momento sin dar ninguna razón, sin que se vean afectados mi atención médica o mis derechos legales.
3. Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica 3/2018 de Protección de Datos Personales.
4. Entiendo que la información relevante de mi historia médica y los datos recopilados durante el estudio, pueden ser consultados por _____, y doy permiso para que esta/s persona/s o entidad/es tenga/n acceso a mis registros.
5. Entiendo que la información recopilada sobre mí se utilizará para apoyar otras investigaciones en el futuro, y se puede compartir de forma anónima con otros investigadores.
6. Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto **“Caracterización fenotípica de pacientes con acúfeno severo”**.

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Nombre y apellidos:
DNI
Fecha:

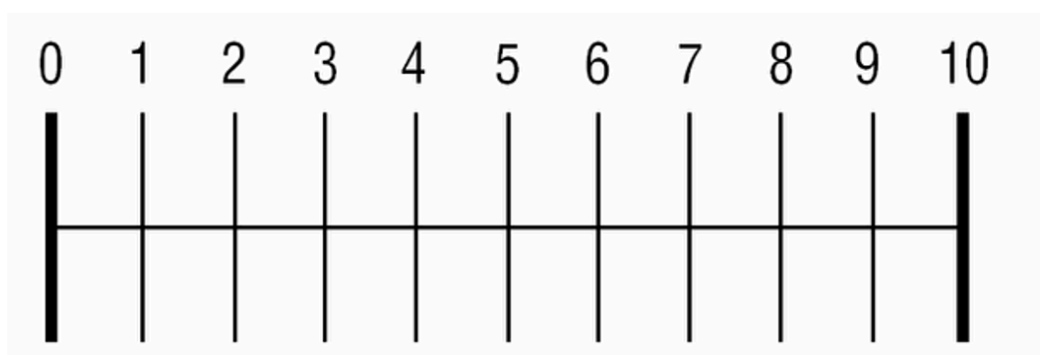
Firma del profesional sanitario informador

Nombre y apellidos:
DNI.....
Fecha:

Anexo 2. Adaptación de la Escala Visual Analógica (EVA)

ESCALA VISUAL ANALÓGICA

Por favor, marque en la escala de puntuación de abajo la intensidad que tiene hoy su acúfeno. Considere que el extremo izquierdo (0) sería nada y el extremo derecho (10) lo máximo que usted pueda imaginar.



Anexo 3. Versión española del Tinnitus Handicap Inventory (THI)

THI ADAPTADO				
Conteste a las preguntas en función de su propia valoración				
1F	¿Le resulta difícil concentrarse por culpa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
2F	Debido a la intensidad del acúfeno ¿le cuesta oír a los demás?	Sí	A veces	No
3F	¿Se enoja a causa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
4F	¿Le produce confusión su acúfeno?	Sí	A veces	No
5C	¿Se encuentra desesperado por tener el acúfeno?	Sí	A veces	No
6E	¿Se queja mucho por tener su acúfeno?	Sí	A veces	No
7F	¿Tiene problemas para conciliar el sueño por su acúfeno?	Sí	A veces	No
8C	¿Cree que su problema de acúfenos es insolucionable?	Sí	A veces	No
9F	¿Interfiere su acúfeno en su vida social (salir a cenar, al cine)?	Sí	A veces	No
10E	¿Se siente frustrado por su acúfeno?	Sí	A veces	No
11C	¿Cree que tiene una enfermedad incurable?	Sí	A veces	No
12F	¿Su acúfeno le impide disfrutar de la vida?	Sí	A veces	No
13F	¿Interfiere su acúfeno en su trabajo o tareas del hogar?	Sí	A veces	No
14F	¿Se siente a menudo irritable por culpa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
15F	¿Tiene dificultades para leer por culpa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
16E	¿Se encuentra usted triste debido a su acúfeno?	Sí	A veces	No
17E	¿Cree que su acúfeno le crea tensiones o interfiere en su relación con la familia o amigos?	Sí	A veces	No
18F	¿Es difícil, para usted, fijar su atención en cosas distintas a su acúfeno?	Sí	A veces	No
19C	¿Cree que su acúfeno es incontrolable?	Sí	A veces	No
20F	¿Se siente a menudo cansado por culpa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
21E	¿Se siente deprimido por culpa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
22E	¿Se siente ansioso por culpa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
23C	¿Cree que su problema de acúfenos le desborda?	Sí	A veces	No
24F	¿Empeora su acúfeno cuando tiene estrés?	Sí	A veces	No
25E	¿Se siente usted inseguro por culpa de su acúfeno?	Sí	A veces	No
TOTAL THI				

Anexo 4. Versión española del test de hipersensibilidad al sonido (THS-GÜF)

Test de hipersensibilidad al sonido de Nelting

Conteste a las siguientes afirmaciones poniendo una X en la casilla que corresponda.

	Nunca	En ocasiones	Frecuentemente	Siempre
Ciertos ruidos, que antes no me molestaban, ahora me provocan miedo				
Me preocupa la idea de que nunca voy a ser capaz de acostumbrarme a estos sonidos fuertes y desagradables				
Cuando tengo alrededor ruidos fuertes o desagradables no puedo escuchar o prestar atención				
Tengo problemas con mi pareja o familia por mi mayor sensibilidad a los sonidos				
Ante la presencia de ciertos sonidos, tengo la necesidad de manifestarlo o decírselo a los demás				
Tengo miedo a los ruidos intensos				
Pienso que la hipersensibilidad a los sonidos que tengo me ha arruinado la vida				
Cuanto tengo muchos ruidos alrededor no oigo ni entiendo nada				
Algunas personas me evitan porque no soporto ruidos fuertes o desagradables				
Los sonidos fuertes o desagradables me provocan enfado				
Tengo dolor de oídos cuando hay ruidos intensos o desagradables				
Pienso que voy a ser incapaz de enfrentarme a la vida diaria si persiste mi hipersensibilidad a los ruidos				
Cuando hay ruidos o sonidos intensos y desagradables me retiro o me retraigo inmediatamente				
Tengo miedo porque los ruidos fuertes o desagradables deterioren mi audición				
Desde que tengo esta hipersensibilidad a los sonidos ya no disfruto de la música				

Anexo 5. Cuestionario de Salud del Paciente adaptado al español (PHQ-9)

Cuestionario sobre la salud mental del paciente-9 (PHQ-9)

Durante las últimas 2 semanas, ¿qué tan seguido ha tenido molestias debido a los siguientes problemas? (Marque con un "□" para indicar su respuesta)	Ningún día	Varios días	Más de la mitad de los días	Casi todos los días
1. Poco interés o placer en hacer cosas	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
2. Se ha sentido decaído(a), deprimido(a) o sin esperanzas.	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
3. Ha tenido dificultad para quedarse o permanecer dormido(a), o ha dormido demasiado	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
4. Se ha sentido cansado(a) o con poca energía	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
5. Sin apetito o ha comido en exceso	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
6. Se ha sentido mal con usted mismo(a) – o que es un fracaso o que ha quedado mal con usted mismo(a) o con su familia	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
7. Ha tenido dificultad para concentrarse en ciertas actividades, tales como leer el periódico o ver la televisión	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
8. ¿Se ha movido o hablado tan lento que otras personas podrían haberlo notado? o lo contrario – muy inquieto(a) o agitado(a) que ha estado moviéndose mucho más de lo normal ?	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3
9. Pensamientos de que estaría mejor muerto(a) o de lastimarse de alguna manera	☐ 0	☐ 1	☐ 2	☐ 3

Anexo 6. Versión española de la Escala Hospitalaria de Ansiedad y Depresión (HADS)

ESCALA HOSPITALARIA DE ANSIEDAD Y DEPRESIÓN			
El siguiente cuestionario ha sido confeccionado para ayudar a saber cómo se siente usted afectiva y emocionalmente. No es preciso que preste atención a los números que aparecen a la izquierda. Lea cada pregunta y marque la que usted considere que coincide con su propio estado emocional en la última semana. No es necesario que piense mucho tiempo cada respuesta; en este cuestionario las respuestas espontáneas tienen más valor que las que se piensan mucho.			
A.1. Me siento tenso/a o nervioso/a:			
3) Casi todo el día ☐	2) Gran parte del día ☐	1) De vez en cuando ☐	0) Nunca ☐
D.1. Sigo disfrutando de las cosas como siempre:			
0) Ciertamente igual que antes ☐	1) No tanto como antes ☐	2) Solamente un poco ☐	3) Ya no disfruto con nada ☐
A.2. Siento una especie de temor como si algo malo fuera a suceder:			
3) Sí, y muy intenso ☐	2) Sí, pero no muy intenso ☐	1) Sí, pero no me preocupa ☐	0) No siento nada de eso ☐
D.2. Soy capaz de reírme y ver el lado gracioso de las cosas:			
0) Igual que siempre ☐	1) Actualmente algo menos ☐	2) Actualmente mucho menos ☐	3) Actualmente en absoluto ☐
A.3. Tengo la cabeza llena de preocupaciones:			
3) Casi todo el día ☐	2) Gran parte del día ☐	1) De vez en cuando ☐	0) Nunca ☐
D.3. Me siento alegre:			
0) Nunca ☐	1) Muy pocas veces ☐	2) En algunas ocasiones ☐	3) Gran parte del día ☐
A.4. Soy capaz de permanecer sentado/a, tranquilo/a y relajado/a:			
0) Siempre ☐	1) A menudo ☐	2) A veces ☐	3) Nunca ☐
D.4. Me siento lento/a y torpe:			
3) Gran parte del día ☐	2) A menudo ☐	1) A veces ☐	0) Nunca ☐
A.5. Experimento una desagradable sensación de "nervios y hormigueos" en el estómago:			
0) Nunca ☐	1) Sólo en algunas ocasiones ☐	2) A menudo ☐	3) Muy a menudo ☐
D.5. He perdido el interés por mi aspecto personal:			
3) Completamente ☐		2) No me cuido como debería hacerlo ☐	
1) Es posible que no me cuido como debiera ☐		0) Me cuido como siempre lo he hecho ☐	
A.6. Me siento inquieto/a como si no pudiera parar de moverme:			
3) Realmente mucho ☐	2) Bastante ☐	1) No mucho ☐	0) En absoluto ☐
D.6. Espero las cosas con ilusión:			
0) Como siempre ☐	1) Algo menos que antes ☐	2) Mucho menos que antes ☐	3) En absoluto ☐
A.7. Experimento de repente sensaciones de gran angustia o temor:			
3) Muy a menudo ☐	2) Con cierta frecuencia ☐	1) Raramente ☐	0) Nunca ☐
D.7. Soy capaz de disfrutar con un buen libro o con un buen programa de radio o televisión:			
0) A menudo ☐	1) Algunas veces ☐	2) Pocas veces ☐	3) Casi nunca ☐
Puntuación HAD-A: 1) < 7 ☐ 2) 8-10 ☐ 3) > 11 ☐ Puntuación HAD-D: 1) < 7 ☐ 2) 8-10 ☐ 3) > 11 ☐			

Anexo 7. Versión española de la Evaluación Cognitiva de Montreal (MoCA)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA®) (EVALUACIÓN COGNITIVA MONTREAL)

Versión 8.1 Spanis(Spain)

Nombre:

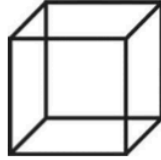
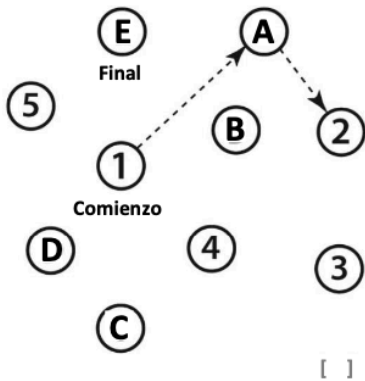
Nivel de estudios:

Sexo:

Fecha de nacimiento:

FECHA:

VISUOESPACIAL / EJECUTIVA



Copiar
el cubo

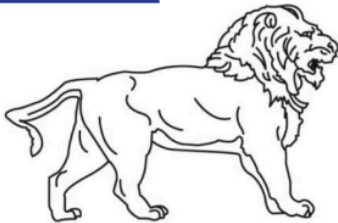
Dibujar un RELOJ (Once y diez)
(3 puntos)

PUNTOS

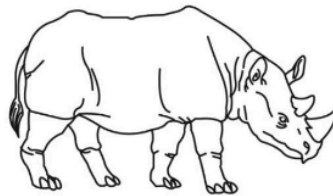
[] [] []
Contorno Números Agujas

___/5

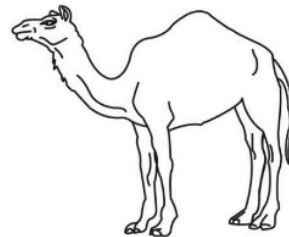
IDENTIFICACIÓN



[]



[]



[]

___/3

MEMORIA

Lea la lista de palabras, el paciente debe repetirlas. Haga dos intentos. Recuerdeselas 5 minutos más tarde.

	ROSTRO	SEDA	TEMPLO	CLAVEL	ROJO
1 ^{er} INTENTO					
2 ^a INTENTO					

NINGÚN PUNTO

ATENCIÓN

Lea la serie de números (1 número/seg.)

El paciente debe repetirlos en el mismo orden.

[] 2 1 8 5 4

El paciente debe repetirlos en orden inverso.

[] 7 4 2

___/2

Lea la serie de letras. El paciente debe dar un golpecito con la mano cada vez que se diga la letra A. No se asignan puntos si ≥ 2 errores.

[] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B

___/1

Restar de 7 en 7 empezando desde 100.

[] 93

[] 86

[] 79

[] 72

[] 65

4 o 5 restas correctas: 3 puntos, 2 o 3 restas correctas: 2 puntos, 1 resta correcta: 1 punto, 0 restas correctas: 0 puntos

___/3

LENGUAJE

Repetir: Solo sé que le toca a Juan ayudar hoy. []

El gato siempre se esconde debajo del sofá cuando hay perros en la habitación. []

___/2

Fluidez del lenguaje. Decir el mayor número posible de palabras que comiencen por la letra "F" en 1 minuto. [] ____ (N ≥ 11 palabras)

___/1

ABSTRACCIÓN

Semejanza entre p. ej. plátano-naranja = fruta

[] tren-bicicleta

[] reloj-regla

___/2

RECUERDO DIFERIDO

(MIS)	Debe recordar las palabras SIN DARLE PISTAS	ROSTRO	SEDA	TEMPLO	CLAVEL	ROJO	Puntos por recuerdos SIN PISTAS únicamente
X3		[]	[]	[]	[]	[]	
X2	Pista de categoría						
X1	Pista de elección múltiple						

MIS = ____ / 15

___/5

ORIENTACIÓN

[] Fecha

[] Mes

[] Año

[] Día de la semana

[] Lugar

[] Localidad

___/6

© Z. Nasreddine MD

www.mocatest.org

MIS: ____ /15

Administrado por: _____

(Normal ≥ 26/30)

Se requiere formación y certificado para garantizar la exactitud.

Añadir 1 punto si tiene ≤ 12 años de estudios

TOTAL

___/30

