



ULPGC
Universidad de
Las Palmas de
Gran Canaria



IUSA
Instituto Universitario
de Sanidad Animal

Tesis Doctoral

Avances metodológicos para el estudio microscópico del ganglio espiral de cetáceos

Tania Aurora Ramírez Herrera

Doctorado en Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

Las Palmas de Gran Canaria
Julio 2020

D. ANTONIO FERNÁNDEZ RODRIGUEZ, COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, INFORMA QUE:

La Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha / / tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada **“Avances metodológicos para el estudio microscópico del ganglio espiral de cetáceos”** presentada por la doctoranda **D^a Tania Aurora Ramírez Herrera** y dirigida por el **Antonio Fernández Rodríguez** y por la **Doctora Marisa Andrada Borzollino**.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 11 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 7/10/2016) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a de de .

Dedicada a Mateo y a Rubén, la luz de mi vida.

Agradecimientos

Siempre pensé que esta sería la parte de la tesis que más fácil me resultaría escribir, y nada más lejos de la realidad, ya que, con esta tesis doctoral, cierro una etapa de mi vida, la cual ya no es solo mía, y comienzo otro camino aún por descubrir.

Todo el que conoce mi paso por el Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), sabe o intuye la cantidad de experiencias y personas que me ha regalado. Ojalá pudiera agradecer a todas y cada una de ellas, pero la neurona que me queda aún no creo que sea capaz de recordarlos a todos y todas, espero sepan perdonarme.

En primer lugar, quiero agradecer a Antonio Fernández, Toño, por haberme dado la oportunidad de haberme formado dentro de este gran equipo todos estos años (que no han sido pocos). Gracias por el apoyo, comprensión y palabras de aliento cuando sabías que las necesitaba.

A Marisa Andrada, gracias por darle la oportunidad a esa niña que aún andaba un poco perdida. Por nunca rendirte conmigo, la formación, el apoyo, las charlas, los asados argentinos y esos detalles tan bonitos el día de nuestra boda que nunca olvidaré. Hoy no estaría escribiendo esta tesis si no hubiera sido por ti. Gracias.

A Manuel Arbelo, Manolo, por tantos buenos consejos laborales como personales, tanto de diagnóstico histopatológico como de virus estomacales infantiles.

A Antonio Espinosa, Pedro Herráez, María José Caballero, Miguel Rivero, Eva Sierra, Óscar Quesada y Alejandro Suárez por la formación y buenos consejos.

A Ana Sofía Ramírez, por ese congreso en Brasil y todo lo que vino después, gracias.

A Ani Afonso y Javier Ramos, por toda su labor y experiencias compartidas.

A Mercedes Santana, la gran Mer, gracias por ser uno de mis apoyos fundamentales en el IUSA, siempre dispuesta a darme un abrazo y consejos cuando más lo necesitaba.

A Yania Paz por todo, por acogerme desde el principio y hasta el día de hoy. Sencillamente, gracias cariño.

A Simona Sacchini, por todas las charlas interminables y tu apoyo siempre.

A mis niñas, Marina Arregui y Kita Câmara, gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado, y sacarme las castañas del fuego de vez en cuando. Gracias mis niñas.

A mis demás compañeros de trabajo, que, en algún punto de estos diez años, de alguna manera me han tocado el corazón: Cristian Suárez, Josué Díaz, Idaira Felipe, Marisa Tejedor, Yara Bernaldo y en especial a Jesús de la Fuente, Natalia García, Raquel Puig y Anna Maria Rambaldi, por tanto cariño.

Gracias a las instituciones científicas dedicadas al estudio de cetáceos en las Islas Canarias: Canarias Conservación y SECAC.

Gracias a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información de la Consejería de Economía, Industria, Comercio y Conocimiento y al Fondo Social Europeo (FSE) Programa Operativo Integrado de Canarias 2014-2020, Eje 3 Tema Prioritario 74 (85%) por cofinanciar la presente tesis doctoral.

Gracias a mis amigas y amigos, en concreto a Itahisa y Maite, por darme siempre un hombro sobre el que desahogar mis preocupaciones.

A mi familia biológica y política, por todo el apoyo que siempre me han dado durante esta etapa de mi vida y siempre.

A mis abuelos, en especial a mi abuelo Pepe, que tanto me acompañó y me escuchó, aunque a veces no entendiera muy bien lo que decía. Allá donde estés, sé que estás esperándome para tomarnos un café.

A mis padres, sobre todo a ti mamá, por luchar por mi futuro siempre, por los principios y valores que me inculcaste, gracias.

A mi marido, Rubén, por llegar a mi vida como un soplo de aire fresco y hacerme ver la vida con la sencillez que realmente tiene. Gracias por esta vida llena de amor y paz que me regalas día a día.

En último lugar, a mi hijo Mateo, eres ese ventanal que tanto esperé que se abriera para llenarlo todo de luz y color.

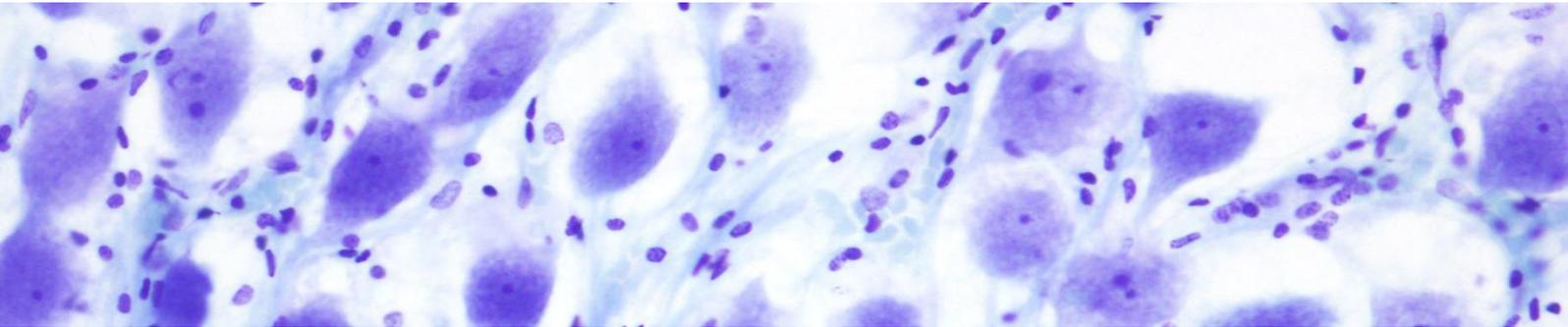
Y por supuesto, a Dios, por la fortuna de tener tantas personas maravillosas en mi vida. Gracias.

Tabla de contenido

1. Introducción y objetivos	1
1.1. La importancia del sentido del oído.....	3
1.2. Cetáceos	4
1.2.1. Definición y especies en Canarias.....	4
1.2.2. Evolución y cambios adaptativos del oído en cetáceos	4
1.3. Avances en el conocimiento del oído de los cetáceos	5
1.4. La descalcificación.....	6
1.5. El valor de la muestra, su conservación.....	6
1.6. Objetivos.....	7
1.6.1. Objetivo general	7
1.6.2. Objetivos específicos.....	7
2. Revisión bibliográfica	9
2.1. Morfología y anatomía del oído.....	11
2.1.1. Oído externo	11
2.2.2. Oído medio.....	18
2.2.3. Oído interno	29
2.2. Audición.....	41
2.2.1. Mamíferos terrestres	41
2.2.2. Mamíferos marinos: cetáceos odontocetos	43
2.3. Descalcificación	46
2.3.1. Concepto, tipos y factores que influyen en la reacción	46
2.3.2. Historia de la descalcificación.....	48
3. Material y métodos	53
3.1. Material.....	55
3.2. Método.....	57
3.2.1 Extracción y fijación de los oídos.....	57
3.2.2 Protocolos de descalcificación.....	61

3.2.3. Estudio histológico	66
3.2.4. Estudio inmunohistoquímico	70
3.2.5. Criterios de valoración para los distintos protocolos de descalcificación	76
4. Resultados.....	79
4.1. Tiempo de descalcificación.....	81
4.1.1. Resultados grupales	81
4.1.2. Resultados individuales	82
4.2. Conservación de la morfología macroscópica	84
4.3. Conservación de la morfología tisular.....	85
4.3.1. Resultados generales	87
4.3.2. Resultados individuales	89
5. Discusión	118
5.1. Tiempo de descalcificación.....	120
5.1.1. Tiempo de descalcificación general	120
5.1.2. Tiempo de descalcificación individual	122
5.2. Conservación de la morfología macroscópica	124
5.3. Conservación de la morfología tisular.....	125
5.3.1. Conservación de la morfología tisular general	125
5.3.2. Conservación de la morfología tisular individual.....	127
5.4. Preservación de la antigenicidad.....	129
6. Conclusiones	133
7. Resumen/Summary	137
8. Abreviaturas.....	145
9. Referencias.....	151
10. Anexo (publicación científica): Comparison of Methods for the Histological Evaluation of Odontocete Spiral Ganglion Cells.....	175

1. Introducción y objetivos



1.1. La importancia del sentido del oído

Los seres humanos siempre hemos considerado los sentidos una puerta de acceso al mundo exterior, a través de los cuales exploramos nuestro entorno para obtener información sobre él y velar por nuestra supervivencia. Aristóteles clasificó esos radares naturales del organismo en cinco: vista, oído, gusto, tacto y olfato.

Al igual que otros órganos sensoriales que permiten a la humanidad experimentar el medio ambiente, los científicos han estado fascinados por el funcionamiento del oído, que se ha adaptado y desarrollado conforme a la complejidad que precisamos para establecer una conexión continuada con el entorno que nos rodea.

La tarea del órgano auditivo es analizar los sonidos ambientales y transmitir los resultados de ese análisis al cerebro. El cerebro interpreta el análisis del oído. Todos los órganos sensoriales tienen células sensoriales especializadas que convierten una señal ambiental en energía eléctrica. El cambio en la energía eléctrica se convierte entonces en un tipo de código digital que se transmite al cerebro.

Las características propias del sistema auditivo de mamíferos (amplificación y sintonización del sonido) se originaron hace aproximadamente 400 millones de años en los primeros vertebrados amniotas (Manley, 2000).

Los animales que viven en un hábitat común, son capaces de reconocer los sonidos “normales” que emiten las demás especies con las que conviven, identificando de esta manera, cualquier sonido distinto de lo habitual como una amenaza (Stocker, 2013).

Para los mamíferos marinos, en especial los cetáceos, el sentido del oído es uno de los recursos primarios, con el que reciben información del medio, tanto de forma activa como pasiva, presentando un sistema auditivo muy desarrollado (Mooney, Yamato, y Branstetter, 2012). El oído de los orígenes de estos mamíferos marinos se diseñó para escuchar en un medio aéreo, sin embargo, tras millones de años de evolución se adaptó al medio acuático donde el sonido viaja cinco veces más rápido y donde la luz se va atenuando y se ve limitada en las profundidades y en la noche. Por lo tanto, estos animales utilizan principalmente el sentido del oído para comunicarse, desplazarse, buscar alimento, detectar depredadores, localizar

congéneres, etc. (Council, 2005; Mooney y cols., 2012; Nummela, Thewissen, Bajpai, Hussain, y Kumar, 2007; Perrin, Würsig, y Thewissen, 2009).

1.2. Cetáceos

1.2.1. Definición y especies en Canarias

Los cetáceos son mamíferos marinos que surgieron hace más de cincuenta millones de años de antepasados terrestres. Dentro del grupo de mamíferos marinos, donde también se encuentran los pinnípedos y los sirénidos, los cetáceos predominan en lo que se refiere a diversidad taxonómica-ecológica y rango geográfico. Estos animales, que pertenecen al orden cetartiodactyla, se dividen en dos subórdenes: misticetos y odontocetos (Berta, Sumich, y Kovacs, 2015; Perrin y cols., 2009; Price, Bininda-Emonds, y Gittleman, 2005).

El archipiélago canario cuenta con una amplia biodiversidad de cetáceos, con un total de 30 especies descritas, que representa aproximadamente un 34,88% de todas las especies que existen descritas hasta la actualidad (Tejedor Fuentes, 2016; Tejedor y Martín, 2013).

1.2.2. Evolución y cambios adaptativos del oído en cetáceos

Con el objetivo de adaptarse a la vida acuática, la gran parte de la anatomía de los cetáceos se remodeló física y funcionalmente a través de los más de 50 millones de años de evolución (Ketten, 2000).

Una de las adaptaciones a las que se tuvieron que enfrentar estos mamíferos acuáticos, fueron las modificaciones necesarias de los sistemas sensoriales para conseguir detectar y procesar las señales en el agua (Reynolds y Rommel, 1999). Entre ellos, los oídos, en sus orígenes adaptados al aire, tuvieron que acoplarse a la transmisión del sonido en el agua, pero su evolución no ocurrió en solitario, sino en conjunto con otras modificaciones anatómicas asociadas. Así como las demandas físicas de movimiento en el agua afectó a la adaptación y modificación del aparato locomotor, la física de la natación entre otras, influyó en la reestructuración de la cabeza (Ketten, 2000; Nummela y cols., 2007).

Miller (1923), denominó a los reflejos evolutivos del rostro de los cetáceos como “telescoping”. A medida que las distintas estructuras del cráneo, localizadas anteriormente, se fueron desplazando dorso-caudalmente se fueron modificando las superficies ubicadas en la periferia del oído. De esta manera se perdieron el pabellón acústico externo y el conducto auditivo externo, se fusionaron el oído medio e interno formando un complejo óseo que pasó de localizarse a nivel intracraneal a estar ubicado en el seno peribullar (Ketten, 2000).

1.3. Avances en el conocimiento del oído de los cetáceos

Tanto el oído como el proceso de audición en cetáceos hace décadas que comenzó a estudiarse (F. C. Fraser y Purves, 1954, 1960a; Girdlestone, Piscitelli-Doshkov, Ostertag, Morell, y Shadwick, 2017; Ketten, 2000; Morell, 2012; Reysenbach de Hann, 1957; Sensor y cols., 2015; E.G. Wever, McCormick, Palin, y Ridgway, 1971) con grandes hallazgos, tanto a nivel morfológico como funcional, a pesar de las dificultades que presenta el estudio en animales de vida libre en su medio natural acuático.

También han sido muchos los autores que han realizado aproximaciones al estudio anatómico, fisiológico y patológico del sistema auditivo de estos animales marinos (André y cols., 2003; Camphuysen, Smeenk, Addink, van Grouw, y Jansen, 2008; Finneran y cols., 2005; Jepson, Prahl, Deaville, y Siebert, 2006; Mann y cols., 2010; Morell, Lehnert, y cols., 2017), así como el efecto adverso de la contaminación acústica de origen humano (Fernández y cols., 2005; Morell, Brownlow, y cols., 2017; National Research Council, 2003; Romano y cols., 2004).

A pesar de todos los avances logrados hasta ahora, en la actualidad aún existen muchos interrogantes en lo que respecta a morfología, fisiología y qué, cómo y por qué se producen daños en el sistema auditivo de cetáceos. Las dificultades para su estudio son numerosas, comenzando por el hecho de que la posibilidad de obtener muestras adecuadas de estructuras muy lábiles al tiempo post-mortem, así como el estar protegidas por una estructura ósea, que necesariamente hay que tratar para acceder al oído interno, en el que se encuentra nuestro objeto de estudio, el ganglio espiral (GE).

1.4. La descalcificación

En la presente tesis, hemos elegido objeto de estudio el ganglio espiral en cetáceos odontocetos, el cual se encuentra formando parte del oído interno. El oído interno se encuentra rodeado de un complejo fuertemente osificado llamado complejo tímpano-periótico (CTP) (Perrin y cols., 2009). Para poder acceder al GE es necesario descalcificar la porción timpánica de este complejo óseo a través de un protocolo de descalcificación.

La elección del protocolo de descalcificación para procesar las muestras es vital para alcanzar resultados morfológicos óptimos. Son, por lo tanto, muchos los factores que pueden afectar a una buena conservación de este órgano: fijador, tiempo de fijación, agente descalcificador, tiempo de descalcificación, etc. (Cunningham, Schulte, Bianchi, Weber, y Schmiedt, 2001; Wallingford, Frey, y Evering, 2018).

1.5. El valor de la muestra, su conservación

Llevar a cabo cualquier investigación que involucre animales de vida libre conlleva una serie de dificultades, las cuales, aumentan en el caso de los cetáceos debido a su entorno natural marino, la imposibilidad de experimentación y el acceso a animales muertos en condiciones adecuadas.

En primer lugar, para poder realizar estudios morfológicos adecuados de estos mamíferos marinos, sólo es posible teniendo un acceso a los mismos, una vez varan o son trasladados a la costa. En ocasiones varan en lugares inaccesibles o de difícil acceso, otras por razones logísticas se retrasa la posibilidad de realizar la necropsia y toma de muestras del animal. El tiempo post-mortem y el ambiente van a influir en la calidad de las muestras, ya que el cuerpo se va deteriorando por fenómenos de autólisis y putrefacción a medida que pasa el tiempo.

Por tanto, el estado de conservación del animal, en el momento de realizar la necropsia es fundamental para una obtención de resultados óptimos a la hora de realizar su estudio anatómico y anatomopatológico.

En Canarias, entre los años 1999-2005 se les realizó la necropsia a 71 animales en un buen estado de conservación (51,45% de los animales necropsiados en ese periodo de tiempo) (Arbelo Hernández, 2007). Y, entre los años 2006-2012 se les

realizó un estudio anatomopatológico en un buen estado de conservación a un total de 93 animales (39,4% de los animales necropsiados en ese periodo de tiempo) (Díaz-Delgado, 2015).

Estos datos indican que menos del 50% de los cetáceos necropsiados reúnen las condiciones aceptables para el estudio anatomopatológico. Siendo muchos menos los que reúnen unas condiciones de conservación buenas o aceptables para el estudio de órganos con una alta sensibilidad a la falta de oxígeno, como el oído interno. De aquí la necesidad de contribuir al avance de la metodología para la obtención de muestras para el estudio microscópico de este órgano fundamental para la vida y la conservación de los cetáceos.

1.6 Objetivos

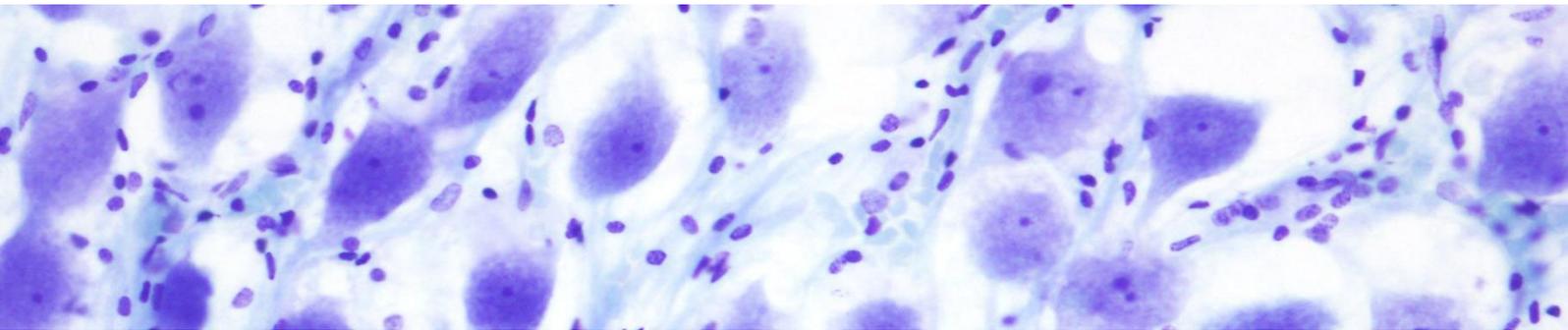
1.6.1. Objetivo general

Mejorar y estandarizar los protocolos de descalcificación de las estructuras óseas del oído interno en cetáceos odontocetos, que permitan avanzar en el estudio morfológico e inmunohistoquímico del ganglio espiral en cetáceos.

1.6.2. Objetivos específicos

1. Estandarizar un protocolo de descalcificación que permita un fácil manejo del CTP, así como obtener secciones tisulares adecuadas, una vez descalcificado el oído interno.
2. Estandarizar un protocolo de descalcificación que nos permita preservar la morfología adecuada del GE del oído interno para su adecuado estudio microscópico.
3. Estandarizar un protocolo de descalcificación que nos permita conservar la antigenicidad tisular y celular en el GE del oído interno.

2. Revisión bibliográfica



2.1. Morfología y anatomía del oído

2.1.1. Oído externo

Ser humano

En el ser humano el oído externo recoge las vibraciones sonoras del medio externo a través del pabellón y posteriormente son conducidas por el conducto auditivo (Escolar y cols., 1978). El oído externo, en humanos, se compone del oído externo cartilaginoso o pabellón auricular compuesto por cartílago y por el meato acústico externo o conducto auditivo (Celesia, 2013; Escolar y cols., 1978; Treuting y Dintzis, 2012).

El meato acústico externo, el cual está formado por cartílago en su porción más próxima al pabellón auricular y por hueso en el área más cercana al tímpano o membrana timpánica, tiene forma de S y una longitud de aproximadamente 2-3 centímetros. Aunque en comparación con el resto de animales domésticos el oído externo en el hombre carece de una musculatura con un gran significado funcional, participa en la recepción del sonido (Celesia, 2013; Treuting y Dintzis, 2012).

El cerumen, que se produce solo en el tercio externo del meato acústico externo mediante una mezcla de secreciones de numerosas glándulas sudoríparas sebáceas y apocrinas más profundas (Alvord y Farmer, 1997; Celesia, 2013), se encargan de lubricar y prevenir la desecación de la piel (Polyak, McHugh, y Judd, 1946), posee propiedades antibacterianas y podrían prevenir la intrusión de insectos, protegiendo así la membrana timpánica (Alvord y Farmer, 1997; Celesia, 2013; Stone y Fulghum, 1984).

Animales domésticos

El oído externo en mamíferos terrestres capta del medio las ondas sonoras que posteriormente viajarán por el oído medio e interno para finalmente ser procesadas en el sistema nervioso central. Estas ondas son recogidas mediante el pabellón auricular y canalizadas por el meato acústico externo para llegar a la membrana del tímpano.

El pabellón auricular, también conocido como oreja, se compone principalmente por cartílago, anatómicamente llamado cartílago auricular, el cual se encuentra íntimamente revestido por piel. Observando las distintas especies de mamíferos terrestres, se puede observar que dicho cartílago adquiere una forma, dimensión y rigidez variable dependiendo de las adaptaciones de cada una de ellas. La oreja posee un grupo de músculos intrínsecos que apenas poseen significado morfofuncional y cuatro grupos neuromusculares activadores, los cuales facilitan el movimiento para la recepción del sonido y expresar el estado anímico de algunas especies como el perro y el caballo.

Entre la base del pabellón auricular y la membrana timpánica se encuentra el meato acústico interno, el cual está compuesto por una porción ósea y otra cartilaginosa. La parte ósea varía de longitud y grosor dependiendo de la especie, mientras que la parte compuesta por cartílago la envuelve y se corresponde en su mayor parte al cartílago anular. Morfológicamente, esta última es una lámina cartilaginosa incurvada y algo incompleta, presentando una escotadura en su porción más dorsal a nivel medial. En su interior se encuentra revestido por un tegumento que presenta glándulas ceruminosas tubulares sebáceas, las cuales están modificadas y producen cerumen (Sandoval, 2003).

Cetáceos odontocetos

En un proceso de adaptación a las condiciones físicas del medio marino, los cetáceos carecen de pabellón auricular, aunque en algunos ejemplares se han encontrado anillos vestigiales del mismo embebidos en la grasa subcutánea, próxima al meato acústico externo (MAE).

El MAE es rudimentario y se encuentra detrás de la articulación temporomandibular, presenta forma de S y es muy estrecho, aunque se ensancha antes del ligamento timpánico. Este conducto comienza como una apertura en forma de agujero pequeño y se adhiere a través de tejido conectivo al hueso escamoso (Cozzi, Huggenberger, y Oelschläger, 2017; Ketten, 2000; Perrin y cols., 2009). Acaba en forma de saco ciego, y a diferencia del ser humano y los mamíferos terrestres, no se ha observado que comunique con la membrana timpánica o con el oído medio (Ketten, 2000).

En la especie *Tursiops truncatus*, se ha observado que en la parte más superficial del cartílago se puede ensanchar formando una placa de forma redondeada. En los

planos más profundos se forma un tubo incompleto que viaja por el meato membranoso, que es más estrecho y se encuentra parcialmente obstruido por detritus celular y cerumen (Cozzi y cols., 2017; Ketten, 2000).

Existen cuatro músculos asociados al cartílago del canal acústico externo, de los cuales se desconoce si, como comentábamos anteriormente sobre los mamíferos terrestres, tienen la misma funcionalidad.

En la porción más proximal del MAE, depende de la especie nos podemos encontrar con una morfología glandular distinta: en ejemplares de *Tursiops truncatus* hallamos glándulas tubuloacinares con un epitelio más grueso, mientras que miembros de la especie *Delphinus delphis* presentan glándulas tubuloacinares simples más pequeñas (Cozzi y cols., 2017; Solntseva, 2007).

Los núcleos de la capa más superficial, a diferencia de la capa basal, son más pequeños y picnóticos. Presentan conductos, túbulos excretores y acinos. Los primeros tienen su apertura en los pliegues del epitelio del MEA y los túbulos excretores y los acinos están rodeados por células mioepiteliales y presentan en su interior una secreción eosinofílica con gránulos basófilos y núcleos degenerados (Cozzi y cols., 2017). Se ha descrito en delfines que el epitelio glandular lo forman células cilíndricas y su secreción es merocrina con elementos holocrinos (Solntseva, 2007).

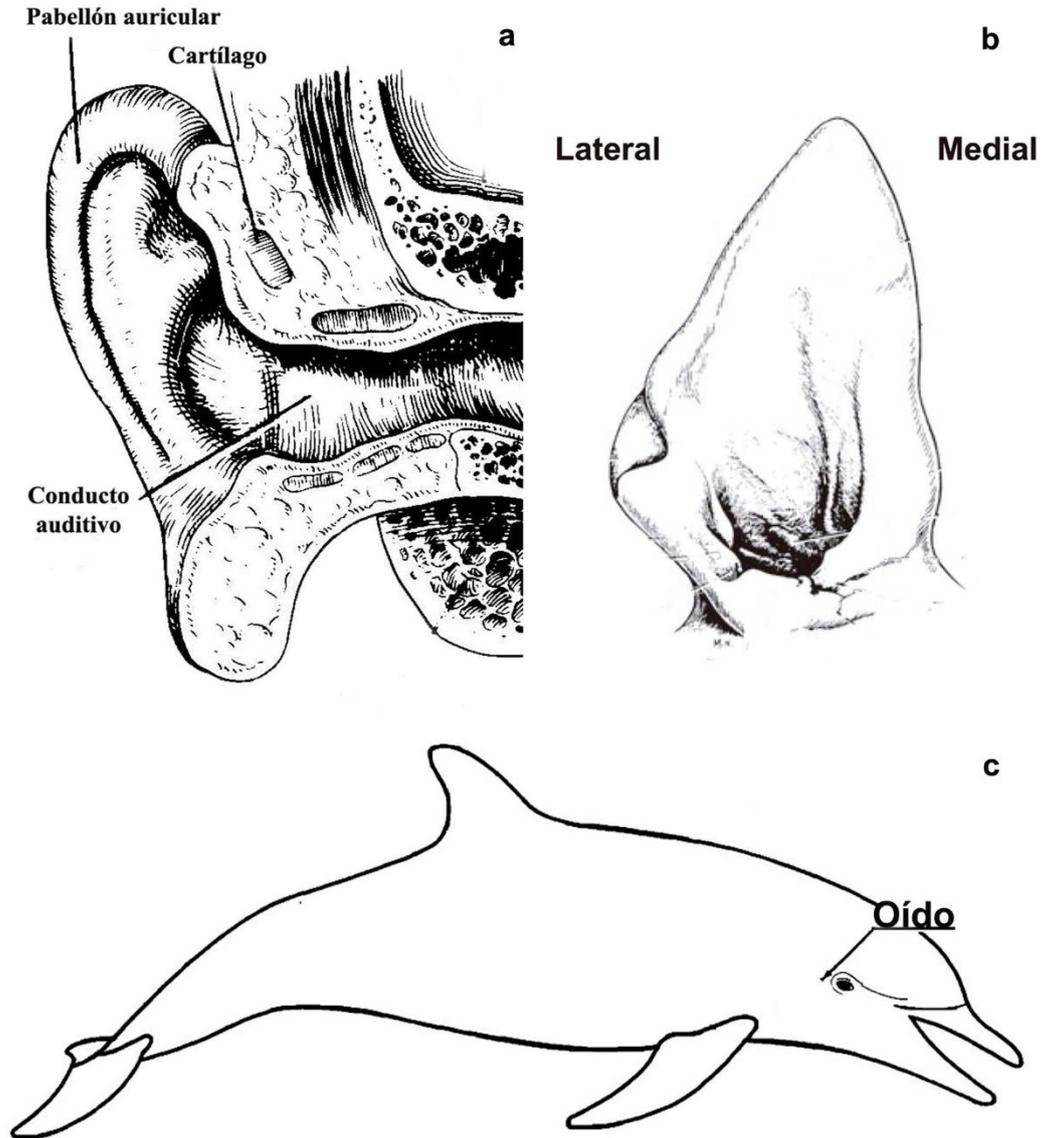


Fig. 2.1. Imágenes del oído externo en el ser humano (a) en el perro (b) y en cetáceos (c). **a.** (Imagen modificada de Alberti, 2001). **b.** (Imagen modificada de Cole, 2009). **c.** (Imagen modificada, Perrin, 2009).

Senos aéreos

A los senos aéreos presentes en cetáceos se le han atribuido distintas posibles funciones, algunas de ellas relacionadas con la audición, por esta razón incluiremos estas estructuras como parte del sistema auditivo de los mismos. Estos senos se describen como divertículos que conectan con las vías respiratorias y se localizan fuera del cráneo. Podemos encontrar tres tipos de senos o sacos aéreos distintos: senos nasales, senos pterigoideos y senos laríngeos (Reidenberg y Laitman, 2008).

En esta tesis nos centraremos en la descripción de los senos pterigoideos, ya que son los que aparentemente están involucrados en los procesos de audición de estos animales. Los senos pterigoideos aparecen como una extensión del tubo auditivo o trompa de Eustaquio (TE) (Rauschmann, Huggenberger, Kossatz, y Oelschläger, 2006; Reidenberg y Laitman, 2008). Están revestidos de mucosa y yuxtapuestos (al menos de un lado) a los huesos del basicráneo. Este sistema de senos es par, bilateral y compuesto por estructuras ciegas que podría extenderse para cubrir el área ventral del paladar, ciertas partes de la órbita, faringe, la región más caudal que rodea la bulla timpánica, la articulación temporomandibular y la articulación entre el cráneo y el aparato hioideo (A. Costidis y Rommel, 2012).

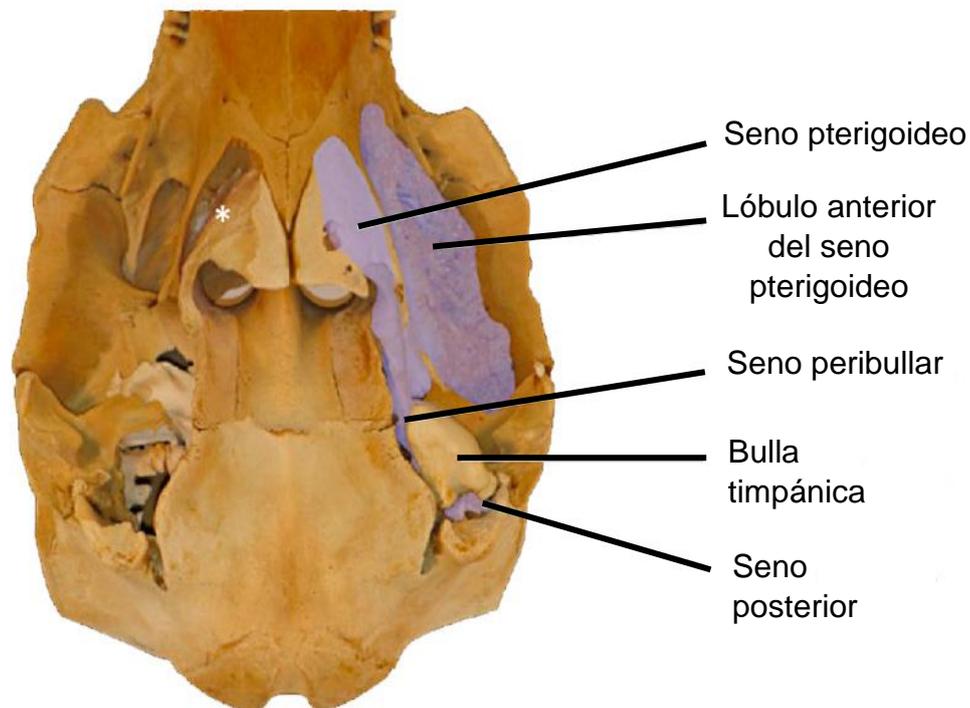


Fig. 2.2. Vista ventral de la base del cráneo de un delfín de hocico blanco (*Lagenorhynchus albirostris*); * se retiró el hueso pterigoideo del lado derecho para hacer visible la cavidad que alberga el seno pterigoideo (Imagen modificada, Cozzi, 2017).

Este sistema de senos, además del seno pterigoideo, presenta otras cámaras: seno anterior, seno peribullar, seno caudal o posterior y seno medio (Beauregard, 1894; Cozzi y cols., 2017; Cranford, Krysl, y Amundin, 2010; Cranford, McKenna, y cols., 2008; F. C. Fraser y Purves, 1960b; Mead y Fordyce, 2009).

En su porción caudodorsal forman el espacio peribullar o seno peribullar que rodea al oído y está limitado por la duramadre, a nivel medial se encuentran delimitados por las placas pterigoideas del hueso esfenoides y conectan con los huesos pterigoideos, palatinos, basiesfenoides y aliesfenoides (F. C. Fraser y Purves, 1960b; Mead y Fordyce, 2009; Reidenberg y Laitman, 2008). En cuanto a los límites laterales de los senos pterigoideos, pueden aparecer osificados a nivel del esfenoides (F. C. Fraser y Purves, 1960b; Geisler y Luo, 1998; Rommel y cols., 2006).

El seno pterigoideo propiamente dicho posee varios divertículos o lóbulos: los lóbulos pre y postorbitales, ubicados rostral y caudalmente respectivamente en el área orbitaria del cráneo y el lóbulo hamular, que está ubicado entre las láminas lateral y medial del hamulus pterigoideo del hueso pterigoideo (Cranford, McKenna, y cols., 2008; F. C. Fraser y Purves, 1960b; Mead y Fordyce, 2009; Reidenberg y Laitman, 2008). En *Tursiops*, los lóbulos pre y postorbitales se expanden y podrían encontrarse dorsal al globo ocular como un lóbulo supraorbital (A. Costidis y Rommel, 2012). En focénidos, el lóbulo preorbitario del seno pterigoideo se extiende a nivel dorsal entre la porción rostral del hueso frontal y la región facial de los huesos maxilares (Fajardo-Mellor, Berta, Brownell, Boy, y Natalie, 2006; F. C. Fraser y Purves, 1960b; Mead y Fordyce, 2009). Los senos presentan un gran tamaño, de manera especial en especies de buceo profundo como los zifios, cachalotes, cachalote enano y el cachalote pigmeo, los cuales parecen estar revestidos o delimitados ventrolateralmente por una compleja red de vasos o senos sanguíneos, plexos fibrovenosos que, a medida que la presión ambiental aumenta podrían llenarse de sangre para así dar cabida a la disminución del volumen en el seno aéreo (A. Costidis y Rommel, 2012; Cranford, McKenna, y cols., 2008; Reidenberg y Laitman, 2008).

Estos plexos son drenados principalmente por las venas faciales, yugular externa y yugular interna. El seno pterigoideo se asocia al plexo venoso más extenso y el plexo pterigoideo, el cual es drenado en su mayoría por la vena maxilar, proviene de la vena yugular externa. La vena maxilar se ramifica en numerosas venas pterigoideas, las cuales componen dicho plexo (A. Costidis y Rommel, 2012).

En zifios, Costidis y Rommel (2016b), describieron los “lagos venosos pterigoideos”, a los cuales se refieren como estructuras, diferentes a los plexos que ellos mismos habían descrito anteriormente (A. Costidis y Rommel, 2012) en otros odontocetos. Estos “lagos” forman un espacio más amplio, cuya luz se divide por delicadas trabéculas. A través de muchas de estas trabéculas venosas se encuentran pequeñas arterias trabeculares tributarias de las arterias pterigoideas (A. M. Costidis y Rommel, 2016b). En cuanto a las arterias, Costidis y Rommel (2016a) describieron en zifios que las arterias principales que dan origen al plexo arterial pterigoideo son la arteria maxilar y pterigoidea.

Ya que es la trompa de Eustaquio (TE) la que conecta parte del sistema de senos aéreos y el oído medio ipsilateral al sistema respiratorio, cabe describir brevemente esta estructura. Este conducto auditivo es un tubo de tejido blando, revestido por mucosa y ubicado principalmente en la luz del seno pterigoideo unido a su mucosa ventral. La abertura dorsal de la TE se encuentra en el interior de la cavidad nasal por encima del músculo palatofaríngeo, el cual actúa como esfínter que aísla la cavidad nasal del resto del aparato respiratorio superior durante las inmersiones. La TE entra en el sistema de senos aéreos en la superficie lateral de la muesca de Eustaquio. En el interior del seno pterigoideo, la TE se abre rostralmente a la apertura de la cavidad del oído medio. En *Tursiops*, la TE está rodeada por parte del plexo venoso peribullar y pterigoideo adyacente (A. Costidis y Rommel, 2012).

Se han propuesto distintas funciones tanto para los senos pterigoideos como para el resto de los senos aéreos:

1. Reflejar el sonido producido por los labios fónicos antes de que viaje a través del melón (Aroyan y cols., 2000; Norris, 1964, 1968; Rauschmann y cols., 2006).
2. Actuar como barrera aislante entre las estructuras generadoras y conductoras de sonido (Cranford, Krysl, y Hildebrand, 2008a; Cranford, McKenna, y cols., 2008; Reidenberg y Laitman, 2008).
3. Aislar acústicamente los oídos durante la producción y recepción de “clicks” durante la ecolocalización.

4. Regular la presión alrededor de los huesos del oído durante el buceo rápido o profundo y así mantener el aislamiento acústico en mayores profundidades (F. C. Fraser y Purves, 1954, 1960b; Houser y cols., 2004).

2.2.2. Oído medio

Ser humano

La cavidad timpánica alberga al oído medio y se encuentra delimitada por el hueso temporal a modo de paredes. Es un espacio lleno de aire con un volumen aproximado de 2cm³ (Alberti, 2001; Celesia, 2013; Maroonroge, Emanuel, y Letowski, 2000; Treuting y Dintzis, 2012), cuya pared lateral la forma la membrana timpánica y la pared medial está compuesta por las ventanas membranosas oval y redonda que conectan el oído medio con el interno (Maroonroge y cols., 2000).

La cavidad timpánica conecta con la parte posterior de la nariz o nasofaringe a través de un conducto estrecho llamado la trompa de Eustaquio que permite igualar la presión entre la cavidad del oído medio y el meato acústico externo (Alberti, 2001; Celesia, 2013). Este tubo auditivo se compone de una porción ósea y una porción cartilaginosa a medida que se acerca a la faringe, donde también se ensancha, presenta una longitud de 35-45 mm de manera aproximada (Maroonroge y cols., 2000; Treuting y Dintzis, 2012).

Como parte del oído medio encontramos tres huesos pequeños llamados martillo, yunque y estribo (*malleus*, *incus*, y *stapes*). Juntos forman una cadena de huesecillos que conducen el sonido desde la membrana timpánica hasta la ventana oval. Esta cadena se encuentra suspendida en la cavidad timpánica por ligamentos y los músculos tensor del tímpano y estapedio (Alberti, 2001; Maroonroge y cols., 2000).

El martillo es el más grande de los tres, con una longitud de 8-9 mm y un peso de 25 mg aproximadamente, el yunque mide 5-7 mm de longitud y 28 mg de peso aproximadamente, y en último lugar, el estribo mide unos 3 mm de longitud y 3 mg de peso de manera aproximada.

El extremo más próximo a la membrana timpánica del martillo se llama manubrio y está íntimamente unido a ella, el otro extremo conecta con el yunque y se llama cabeza. El yunque posee cuerpo, que comunica con la cabeza del martillo, y dos

procesos: el más largo, llamado lenticular, se une al estribo y el más pequeño conecta con la parte posterior de la cavidad a través de un ligamento.

Finalmente, el estribo se compone por cabeza, cuello, dos brazos y la base, esta última se une firmemente a la pared membranosa que cubre la ventana oval (Maroonroge y cols., 2000).



Fig. 2.3. Esquema del oído medio de humano donde se aprecia el desplazamiento de la cadena de huesecillos tras la contracción del músculo asociado al martillo; a. conducto auditivo externo; b. cavidad timpánica; c. vestíbulo del oído interno; d. ventana oval. 1. membrana timpánica; 2. mango del martillo; 3. cabeza del martillo; 4. inserción del músculo del martillo; 5. Proceso lenticular del yunque; 6. cuerpo del yunque; 7. estribo (Imagen modificada, Testut y Latarjet, 1986).

La membrana timpánica o tímpano es delgada, semitransparente y ovalada donde termina el canal auditivo. Su forma es cónica y tiene poca profundidad, aproximadamente 1,5-2 mm hacia el oído medio (Alvord y Farmer, 1997; Sundberg, 2008). La porción de la membrana timpánica que se une al manubrio del martillo se llama umbo (Pickles, 1988). La mayor parte de la membrana se encuentra unida al hueso temporal que rodea el canal auditivo excepto de una porción muy estrecha denominada muesca de Rivinus o incisura timpánica.

A nivel de sus dos ejes principales perpendiculares las dimensiones son de 9-10 mm y de 8-9 mm (Gelfand, 1998; Gray y Lewis, 1918; Maroonroge y cols., 2000). El área total de superficie varía entre 55-90 mm², con una media de 64 mm² (Harris, 1986; Maroonroge y cols., 2000; Zemlin, 1997). La membrana timpánica en su parte central es más delgada, mientras que sus bordes son más gruesos presentando un grosor variable entre 30-120 µm (Donaldson y Miller, 1980; Kojo, 1954; Lim, 1970; Maroonroge y cols., 2000; E. G. Wever y Lawrence, 1954).

En cuanto a la composición del tímpano, consta de cuatro capas: capa epitelial externa, que es inervada por el nervio auriculotemporal, y se continua con el tejido cutáneo del meato acústico externo; dos capas compuestas por fibras con una disposición radial y concéntricas, cuyo papel es dar rigidez a la membrana del tímpano; por último, encontramos una capa interna mucosa que se continua con el revestimiento de la cavidad timpánica.

El peso de esta membrana es de unos 14 mg (Lee, 2009; Maroonroge y cols., 2000; 6,137,889., 2000). La superficie del tímpano se divide en una zona más rígida y amplia, denominada *pars tensa*, y otra zona más pequeña y laxa, llamada *pars flaccida*, o membrana de Shrapnell. Esta última se encarga de compensar los cambios de presión entre el oído medio y el oído externo permitiendo que la membrana del tímpano funcione como un pistón y no que permanezca inmóvil (Gray y Lewis, 1918; Maroonroge y cols., 2000). Es la *pars tensa*, la más pequeña, la que se encarga de transmitir la energía acústica desde el oído externo hasta el oído medio (Békésy, 1949; Maroonroge y cols., 2000).

Animales domésticos

El oído medio está constituido por una cavidad, cavidad del tímpano, que se localiza en el hueso temporal, exactamente en la porción petrosa y timpánica, lateral al

laberinto óseo. La túnica mucosa está revestida por un epitelio simple cuboideo y tapiza el interior de las paredes óseas de la cavidad timpánica, así como la superficie correspondiente de la cadena de huesecillos y músculos, y fibras de las membranas timpánicas principal y secundaria.

La cavidad del tímpano se encuentra delimitada por seis paredes desiguales y con superficie irregular. La pared lateral o membranácea se llama membrana timpánica y se localiza contiguamente al oído externo. El resto de las paredes se presentan revestidas por mucoperiostio. A continuación, se describirán brevemente cada una de ellas:

- Pared tegmental o techo: contacta con parte del martillo y el yunque.
- Pared mastoidea: limita la cavidad caudodorsalmente. En la vaca y el cerdo existen anejos mastoideos que comunican con las celdas timpánicas en la porción timpánica del temporal. Estas celdas en carnívoros se sustituyen por la bulla timpánica que comunica con la cavidad del tímpano.
- Pared yugular: limita la cavidad timpánica caudoventralmente.
- Pared carotídea: es el límite rostral y presenta la terminación o desembocadura del canal musculotubárico, que a su vez aloja parte del trayecto de la trompa auditiva. Este orificio es la abertura timpánica de la trompa que comunica con la nasofaringe.
- Pared laberíntica o pared medial: en su superficie ventral encontramos el promontorio, y dorsal a este la ventana del vestíbulo y la ventana coclear. Estas ventanas comunican con el oído interno, con los espacios perilinfáticos en concreto. La ventana del vestíbulo es la más caudal y se localiza próxima al origen basal de la escala vestibular de la cóclea, estando cegada por el estribo y por el ligamento anular que la circunda. Ventralmente, sobre el origen basal de la escala timpánica, encontramos la ventana coclear obturada por la membrana secundaria del tímpano.
- Membrana del tímpano: es el fondo del MAE (Sandoval, 2003). La cara externa de dicha membrana es levemente cóncava, al igual que su cara interna debido a la presión que ejerce el músculo tensor del tímpano en

sentido dorsomedial (Climent Peris, Sarasa Barrio, Muniesa Lorda, y Terrado Vicente, 1998). Su contorno es casi oval, se dispone ventromedialmente en la cavidad y es casi transparente. En la porción tensa de la membrana, sus bordes forman un anillo fibrocartilaginoso que se fija al anillo timpánico óseo que la rodea. En esta parte de la membrana podemos encontrar los pliegues maleares rostral y caudal, donde se va a fijar el cuello del martillo. Estos pliegues con sus ramas forman una V, entre las cuales queda comprendida la parte flácida de la membrana timpánica. Esta parte flácida se dispone en la porción más dorsal y se encarga de cerrar la escotadura del anillo óseo, que aparece incompleto a este nivel.

La membrana timpánica es fibrosa y se compone por una capa de fibras superficiales (estrato radiado) y otra de fibras más profundas y periféricas (estrato circular). Exteriormente, la reviste un estrato de naturaleza cutánea con epitelio estratificado, e interiormente un estrato mucoso de epitelio simple cuboideo (Sandoval, 2003).

La trompa auditiva es un tubo o conducto que comunica la nasofaringe con la cavidad del tímpano (Climent Peris y cols., 1998; Sandoval, 2003). La luz de la trompa aparece aplanada lateralmente y de manera natural se encuentra colapsada (Climent Peris y cols., 1998). Se inicia con el orificio faríngeo de la trompa auditiva en la pared dorsolateral de la nasofaringe, y llega a la porción timpánica del hueso temporal, para desembocar en la cavidad timpánica (Sandoval, 2003). Este orificio posee una forma variable: en caballos tiene una morfología alargada y plana, mientras que en carnívoros desemboca en la pared lateral de la nasofaringe, en el vértice de una papila pequeña (Climent Peris y cols., 1998).

La trompa auditiva posee una parte ósea y otra cartilaginosa (Climent Peris y cols., 1998; Sandoval, 2003). Esta última se ve protegida medial y dorsalmente por cartílago y lateralmente por una lámina membranácea desprovista de cartílago. En équidos esta lámina se extiende en un saco de gran tamaño o divertículo de la trompa. La porción cartilaginosa se estrecha (a esta transición se le llama istmo) para continuar como porción ósea, la cual no se encuentra presente en caballos.

La parte ósea de la trompa auditiva se localiza en el canal musculotubárico de la porción timpánica del hueso temporal, exactamente en el semicanal de la trompa auditiva. Esta porción ósea acaba como abertura timpánica de la trompa en la pared

carotídea de la cavidad del tímpano. La trompa auditiva está revestida por una túnica mucosa con un epitelio pseudoestratificado ciliado, en la que podemos encontrar glándulas tubáricas con secreción mucosa o seromucosa (Sandoval, 2003). Próximo al orificio faríngeo de la trompa auditiva, presenta tejido linfático que forma la tonsila tubárica, la cual se presenta más desarrollada en cerdos y rumiantes (Climent Peris y cols., 1998).

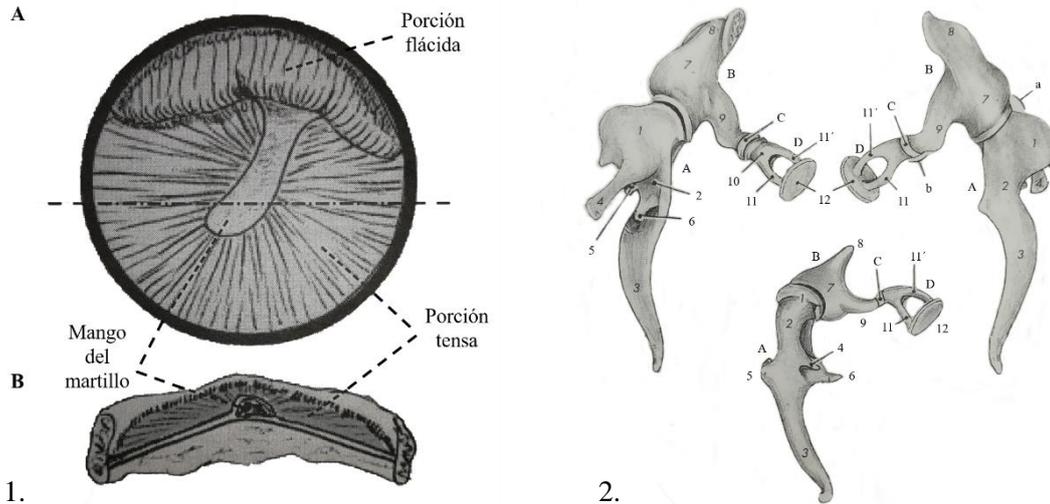


Fig. 2.4. 1. A. Imagen de la membrana del tímpano izquierda a través de un otoscopio. 1.B. Sección transversal de la misma por la línea de puntos para mostrar su concavidad (imagen modificada, Climent Peris, 1998). 2. Ilustración de la cadena de huesecillos del oído derecho de un caballo en visión rostral (superior izquierda) y en visión caudal (superior derecha) y del perro en visión rostral (debajo).

A. martillo, 1. cabeza, 2. cuello, 3. mango, 4. apófisis rostral, 5. apófisis lateral, 6. apófisis muscular. B. yunque, 7. cuerpo, 8. pilar corto, 9. pilar largo. C. hueso lenticular. D. estribo, 10. cabeza, 11. pilar rostral, 11'. pilar caudal, 12. base del estribo. a. articulación incudomalear. b. articulación incudoestapedia (imagen modificada, Sandoval, 2003).

En la cavidad timpánica existe una cadena de huesecillos compuesta por cuatro eslabones que van desde la membrana timpánica hasta la escala vestibular de la cóclea. Estos huesecillos de los que hablamos se denominan martillo (*malleus*), yunque (*incus*), lenticular y estribo (*stapes*), que describimos a continuación:

- Martillo: se encuentra en la porción más lateral de la cavidad del tímpano, siendo este el huesecillo más desarrollado de los cuatro. Se compone de una cabeza que se articula con el cuerpo del yunque (articulación incudomalear), mientras que, en su superficie opuesta, con ayuda de un ligamento, se fija en el receso epitimpánico. Esta estructura ósea consta de un cuello que continúa como mango del martillo que se encuentra adherido a las dos terceras partes

de la porción fibrosa de la membrana timpánica a nivel dorsal. Próximo al anillo timpánico, queda adherida en su mayor parte la apófisis rostral, que aparece más desarrollada que la apófisis lateral y la apófisis muscular localizadas en la base del mango.

- Yunque: como comentábamos en el párrafo anterior, este posee un cuerpo con el que articula con la cabeza del martillo, un pilar corto que se adhiere a la pared del receso epitimpánico y un pilar largo que al finalizar es ligeramente curvado formando la apófisis lenticular. El yunque articula con el estribo a través de esta apófisis y entre ambos podemos encontrar hueso lenticular de muy pequeño tamaño (articulación incudoestapedia).
- Estribo: este huesecillo se compone de una cabeza, un pilar rostral, un pilar caudal y la base del estribo que comunica con la ventana vestibular (sindesmosis timpanoestapedia) fijándose a través del ligamento anular del estribo.

En la cavidad del tímpano, relacionados con la cadena de huesecillos, encontramos seis ligamentos encargados de fijarlos a dicha cavidad, así como dos músculos modifican la posición de estos en el proceso de audición. Estos músculos son el músculo tensor del tímpano y el músculo estapedio.

El primero de ellos se origina caudalmente, donde desemboca el canal musculotubárico, en la pared yugular de la cavidad timpánica y se inserta en la apófisis muscular de la base del mango del martillo a través de un fino tendón. Por el canal musculotubárico viaja el nervio tensor del tímpano para inervar al músculo del mismo nombre. El músculo estapedio se origina en la pared mastoidea y se inserta en la cabeza del estribo haciéndolo rotar. El encargado de inervar este músculo es el nervio estapedio (Sandoval, 2003).

Cetáceos odontocetos

En cetáceos odontocetos el oído lo encontramos fuera del cráneo, ventralmente con respecto a este, a nivel de la articulación temporo-mandibular (Ketten, 1997, 2000). El oído en estos mamíferos lo forman dos bullas óseas las cuales forman una unidad separada, el complejo tímpano-periótico (Hemilä, Nummela, y Reuter, 2010; Ketten, 2000).

El CTP alberga tanto al oído medio como al interno. Este complejo está compuesto, como comentábamos anteriormente, por la porción timpánica y la porción periótica, las cuales están conectadas entre sí por uniones que no son óseas (Perrin y cols., 2009).

La porción periótica que forma la mitad dorsal del complejo, aloja al oído interno, es más compacta, está unida al cráneo a través de ligamentos y se presenta fusionada parcialmente a la porción timpánica (Hemilä y cols., 2010; Ketten, 2000; Nummela, Reuter, Hemila, Holmberg, y Paukku, 1999).

La porción timpánica con forma de cuenco constituye la porción más ventral y alberga la cavidad del oído medio y a la cadena de huesecillos (Hemilä y cols., 2010; Ketten, 2000; Perrin y cols., 2009). Dicha cavidad comunica con la trompa de Eustaquio y con el sistema neumático de senos aéreos (F. C. Fraser y Purves, 1960a) descritos previamente en el oído externo en cetáceos. La pared lateral de dicha porción es delgada, y en odontocetos se le denomina “placa timpánica”, la cual se une al martillo directamente a través de una sinostosis entre dicha placa y el proceso gracilis del martillo, e indirectamente a la ventana oval a través de la cadena de huesecillos. La pared medial es gruesa y voluminosa (Nummela, Reuter, y cols., 1999; Perrin y cols., 2009).

A

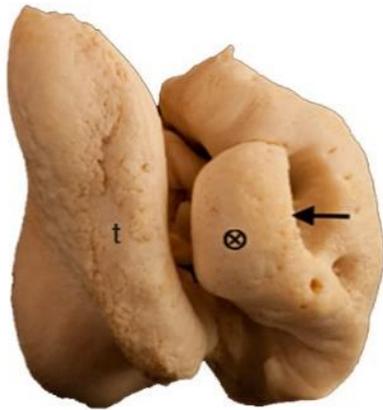


Fig. 2.5. A. Imagen del complejo tímpano-periótico derecho de un ejemplar adulto de delfín del Pacífico de flanco blanco (*Lagenorhynchus obliquidens*), donde se puede observar desde una vista medial el área coclear de la porción periótica (⊗) cubierto en su mayoría por la porción timpánica (t). **B-C.** Imágenes del complejo tímpano-periótico de un ejemplar neonato de delfín común (*Tursiops truncatus*). **B.** muestra la porción timpánica y **C.** muestra la porción periótica del complejo (Imagen modificada, Cozzi, 2017).

B



C



El meato acústico externo se ensancha para terminar en la membrana timpánica, que se origina en el anillo timpánico. La membrana timpánica en cetáceos forma una banda membranosa que consta de dos partes: una más fibrosa compuesta tanto por fibras radiales como concéntricas y otra parte sin fibras parecida a la *pars flácida* de los mamíferos terrestres.

Esta membrana se encuentra protegida por el cono timpánico, el cual tiene forma de embudo y presenta una composición fibrosa y está parcialmente calcificado. Dicha membrana se une al martillo indirectamente a través del ligamento timpánico (Boenninghaus, 1903; F. C. Fraser y Purves, 1960a; Ketten, 2000; McCormick, Wever, Palin, y Ridgway, 1970; Perrin y cols., 2009).

Los huesecillos auditivos del oído medio (martillo, yunque y estribo) se encuentran entre la placa timpánica y la ventana oval (McCormick y cols., 1970; Perrin y cols., 2009).

El martillo presenta una cresta ósea, larga y gruesa denominada proceso gracilis que lo une al borde del anillo timpánico (F. C. Fraser y Purves, 1960a; Ketten, 2000; Perrin y cols., 2009). A esta unión entre el martillo y la pared dorsal del hueso timpánico se le llama unión ósea verdadera o sinostosis, lo que quiere decir que ambas partes solo se podrían separar por una rotura del proceso anterior o gracilis. Existen además dos ligamentos suspensorios que sostienen al martillo: uno grande y grueso y otro más fino.

El primero de ellos, el ligamento timpánico, comienza en el borde de la apertura dorsal del hueso timpánico dejando alguna de sus fibras en la membrana timpánica para continuar disminuyendo sus dimensiones anteroventralmente. Dicho ligamento finaliza su trayecto en la superficie lateral del cuerpo del martillo. El otro ligamento, el ligamento anterior, comienza en la pared posterior del hueso timpánico y acaba, ventral y posteriormente donde se fija el ligamento timpánico en el martillo.

El tendón del músculo tensor del tímpano se inserta en el extremo anterolateral del martillo (McCormick y cols., 1970). Este músculo en delfines aparece bien desarrollado, presentándose en la marsopa común como un músculo delgado y en forma de banda con una longitud de 7-8 mm y un ancho de 1-1,5 mm (Cozzi y cols., 2017).

El yunque tiene un tamaño menor que el martillo y su cuerpo es pequeño y robusto. Es la cabeza del martillo la que articula con este huesecillo, formando un ángulo recto entre ambos (Cozzi y cols., 2017; Nummela, Reuter, y cols., 1999) mediante una articulación o sinostosis (McCormick y cols., 1970). Las superficies del yunque que se articulan con el martillo representan casi su totalidad, de morfología cóncava y con cartílago articular. Este huesecillo muestra una proyección ósea corta y cónica que se dirige anteriormente, con el proceso corto o *crus breve* y otra más gruesa, o proceso largo o "*crus longum*" (Cozzi y cols., 2017; F. C. Fraser y Purves, 1960a).

El huesecillo más pequeño es el estribo, los dos pilares presentes en mamíferos terrestres se han fusionado en gran medida (Cozzi y cols., 2017). Entre este huesecillo y el yunque existe una verdadera articulación móvil o diartrosis. Es la cabeza del estribo la que articula con el proceso mayor del yunque y su base se conecta estrechamente con la ventana oval gracias al ligamento anular (Ketten, 2000; McCormick y cols., 1970; Perrin y cols., 2009). El músculo estapedio se encuentra posteriormente al estribo, uniéndose a un lado a través de un ligamento (McCormick y cols., 1970).

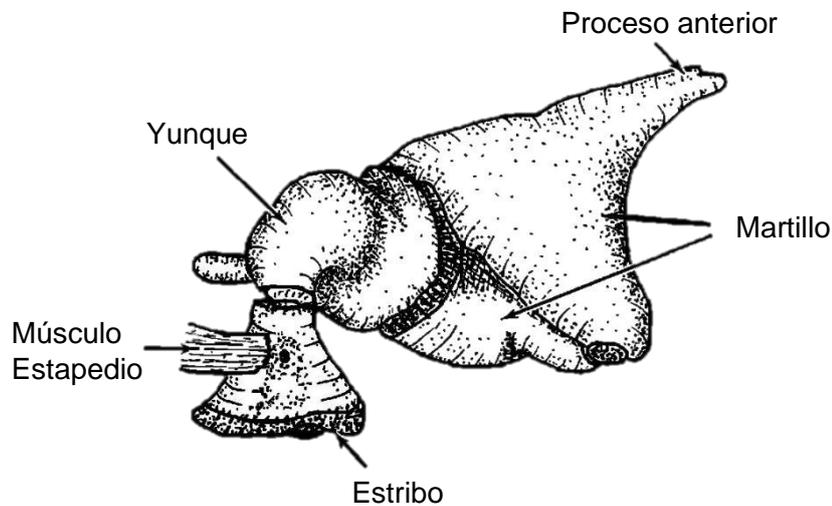


Fig. 2.6. Cadena de huesecillos auditivos en cetáceos (Imagen modificada, McCormick y cols., 1970).

Estos huesecillos están bien desarrollados, presentan una forma compleja y tienen un gran tamaño con mayor densidad ósea y consistencia parecida a la cerámica (Fleischer, 1978; Ketten, 2000). Se han realizado distintos estudios acerca de los huesecillos en cetáceos, en comparación con el resto de mamíferos, entre ellos:

Boenninghaus (1903), describió que los tres huesecillos juntos de la marsopa común eran 5 veces más pesados que en humano, posteriormente Nummela y colaboradores (1999), compararon la cadena osicular auditiva del delfín de hocico blanco con otros mamíferos terrestres y obtuvieron resultados similares.

Entre un mamífero terrestre y un delfín de similares dimensiones, este último, presenta una cadena de huesecillos de mayor tamaño (Cozzi y cols., 2017). Además, se pueden observar variaciones en la cavidad del oído medio y la cadena de huesecillos dependiendo de la especie y animal (Ketten, 2000).

Revistiendo la cavidad del oído medio conectada al hueso coclear, al martillo, a la cadena de huesecillos, al ligamento timpánico y al tímpano, encontramos una mucosa gruesa y vascularizada denominada “cuerpo cavernoso” (Ketten, 2000; Sassu y Cozzi, 2007). Se ha descrito que es un tejido eréctil debido a su morfología compuesta por vasos sanguíneos rodeados de tejido muscular liso, arterias helicinas y nervios (Sassu y Cozzi, 2007).

2.2.3. Oído interno

El oído interno se compone principalmente por la cóclea, que representa la parte auditiva, y por el sistema vestibular, funcionalmente relacionado con el equilibrio (Maroonroge y cols., 2000). En la presente tesis no estudiaremos el sistema vestibular, ya que nos centraremos en la porción que se encarga de procesar el sonido, la cóclea.

Debido a que la cóclea en cetáceos se organiza de una manera muy similar al resto de los mamíferos (Ketten, 2000), este apartado se estructurará de manera diferente a los dos anteriores, con una descripción general de dicho órgano y especificando las características especiales de cada especie.

La cóclea en mamíferos terrestres, incluidos los humanos, la encontramos incluida en el hueso temporal (Y. Raphael y Altschuler, 2003), mientras que en cetáceos es la porción periótica del complejo tímpano-periótico la que la alberga (Hemilä y cols., 2010). En mamíferos, de forma general, la cóclea posee entre 2,5 y 2,75 vueltas alrededor del modiolo (Alberti, 2001; Maroonroge y cols., 2000). Sin embargo, la cantidad de vueltas varía dependiendo de la especie, indicando así la sensibilidad a frecuencias más altas o bajas (Ekdale, 2016).

Por ejemplo, en cobayas, ratas canguro y especies subterráneas de roedores, la cóclea se presenta enroscada de una manera marcada, con forma de torre y entre 3,25 y 4,25 vueltas. Una cóclea más aplanada y menor número de vueltas es propio de murinos (Begall, Lange, Schleich, y Burda, 2007) y murciélagos.

Los mamíferos pertenecientes a la subclase terios que poseen solo 1,5 vueltas, son el kalkarratul, el erizo, el manatí (Lewis, Leverenz, y Bialek, 1985), la marsopa común y el delfín rosado (Ketten, 2000). En un estudio realizado en delfínidos (Ernest Glen Wever, McCormick, Palin, y Ridgway, 1972), se describieron un total de aproximadamente 1,75 vueltas de cóclea para el delfín del Pacífico de flanco blanco comparativamente, con las aproximadamente 2,5 vueltas del delfín mular (E.G. Wever y cols., 1971). Mayor número de vueltas cocleares podemos encontrar en especies como el cerdo, con 4 vueltas y rumiantes con 3,5 vueltas (König y Liebich, 2013).

En cuanto a la orientación de la cóclea, en mamíferos terrestres (entre los que se incluyen los humanos) el eje se orienta cranealmente, es decir, paralelo al suelo. Sin embargo, en cetáceos se orienta de manera perpendicular con respecto al resto de mamíferos (Ketten, 2000).

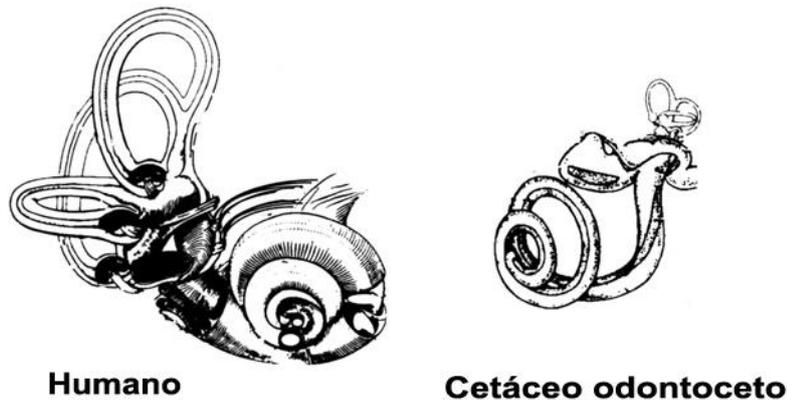


Fig. 2.7. Imagen del oído interno de humano y de un cetáceo odontoceto donde se puede apreciar la diferencia de la anatomía coclear entre ambas especies (Imagen modificada, Ketten y cols., 1997 (la imagen del ser humano fue modificada, Lewis y cols., 1985).

Con respecto a la transducción del sonido recibido, es en la base de la cóclea donde se procesan las frecuencias más altas, mientras que en el extremo opuesto, llamado extremo apical o vértice de la cóclea, se procesan las frecuencias más bajas (Y. Raphael y Altschuler, 2003).

El laberinto membranoso está dividido en tres espacios de sección transversal triangular a lo largo de toda la cóclea: escala vestibular, conducto coclear y escala timpánica. Las zonas localizadas más externamente son la escala vestibular y timpánica. La primera de ellas conecta con la ventana oval, mientras que la timpánica conecta con la ventana redonda. Estas dos secciones están llenas de perilinfa (con un alto contenido en sodio) y conectan entre sí en el ápice, por una abertura llamada helicotrema. El conducto coclear o escala media es un espacio tubular que se encuentra lleno de un líquido llamado endolinfa, el cual tiene una composición similar al fluido intracelular (alto en K^+).

El conducto coclear está lleno de endolinfa y está separado de la escala vestibular por la membrana de Reissner y de la escala timpánica, por la membrana basilar (Alberti, 2001; Y. Raphael y Altschuler, 2003). La membrana de Reissner o membrana vestibular, permanece unida a la lámina espiral ósea que se proyecta de manera oblicua hacia la pared externa de la cóclea formando así el techo de la escala media o conducto coclear. Por otro lado, el límite ventral o suelo de la escala media lo forma la membrana basilar, la cual está fijada por un extremo a la lámina espiral y por el otro extremo al ligamento espiral. La lámina espiral aparece más estrecha en el vértice y más ancha en la base, y aparte de servir de inserción para la membrana basilar y de Reissner, viaja a lo largo de la cóclea alrededor del modiolo y acomoda tanto al ganglio espiral como al nervio (Ekdale, 2016; Maroonroge y cols., 2000).

La membrana basilar, al contrario que la lámina espiral, es más ancha, gruesa y flácida en su extremo apical y se presenta más estrecha, delgada y rígida en su extremo basal (Maroonroge y cols., 2000). La dimensión de la membrana basilar presentan una gran variedad entre las distintas especies (Echteler, Fay, y Popper, 1994; Ketten, 2000; Kössl y Vater, 1995). Esta variedad de los distintos parámetros parecen estar relacionados funcionalmente con las características de la audición (Ketten, 1984; Von Békésy, 1960; West, 1985).

La longitud media aproximada de la membrana basilar en humanos es de 33,5 mm, siendo su ancho 5 veces mayor (de 125 a 500 μm) mientras que el grosor, es

aproximadamente 3 veces menor (7 a 2 μm) desde la base hasta el ápice de dicha membrana (Ketten y cols., 1998; Schuknecht, 1993).

En el ratón, la membrana basilar presenta una longitud aproximada de 6,8 mm, así como un ancho 4 veces mayor (de 40 a 60 μm), y un grosor que disminuye de 14,5 a 1 μm de la base al ápice de esta. La membrana basilar en el murciélago de herradura posee 16,1 mm de largo desde la base hasta el ápice, un ancho que aumenta de 80 a 150 μm , y un grosor que disminuye de 5 a 2 μm (Bruns, 1976).

En odontocetos el incremento de la membrana basilar puede ser hasta 10 veces mayor (de 35 a 350 μm), y la disminución 5 veces menor (de 25 a 5 μm) desde la base al ápice coclear. Por último, la membrana basilar del rorcual común mide aproximadamente 64,7 mm de longitud y presenta un aumento del ancho de 100 a 2200 μm , y una disminución del grosor de 5 a 2 μm (Ketten, 2000).

La arteria laberíntica es la encargada de suministrar el flujo sanguíneo al conducto coclear mediante la emisión de varios vasos sanguíneos que van a nutrir dicha estructura (Maroonroge y cols., 2000).

Las paredes de este conducto aparecen revestidas por células que constituyen el laberinto membranoso. Entre estas células podemos encontrar las células ciliadas (sensoriales) y células auxiliares o de apoyo (no sensoriales). En la pared lateral de dicho conducto se localiza la estría vascular medialmente, y el ligamento espiral lateralmente. A su vez, la estría vascular se compone de tres capas celulares:

- Células marginales: capa homogénea de células epiteliales polarizadas, organizadas a modo de capa que cubre la escala media (Y. Raphael y Altschuler, 2003). Los cetáceos pueden presentar hasta 5 capas de estas células (Ketten, 2000).
- Células intermedias: se localizan lateralmente a las células marginales intercalándose con el ángulo basal de las mismas, pero sin alcanzar la luz.
- Células basales (Y. Raphael y Altschuler, 2003).

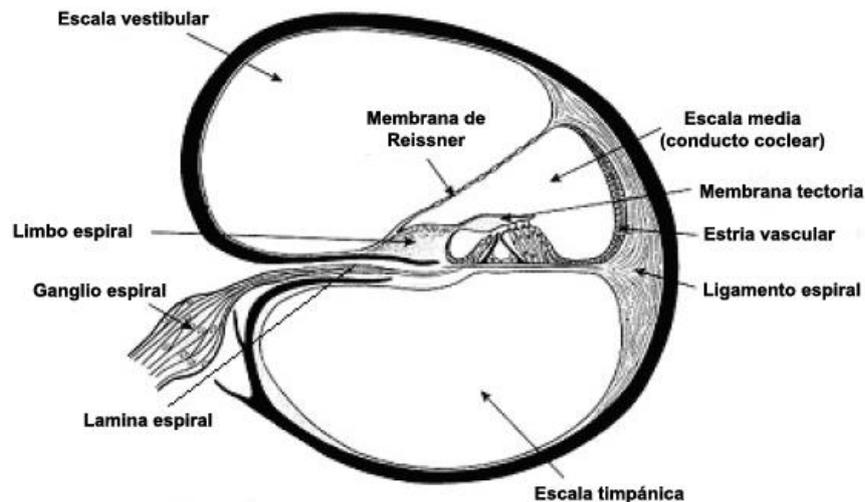


Fig. 2.8. Corte transversal de la cóclea (Imagen modificada, Maroonroge y cols., 2000 (obtenida a su vez de Emanuel y Letowski, 2009)).

Como comentábamos anteriormente, las células sensoriales que contiene la cóclea se llaman células ciliadas, las cuales las podemos encontrar en el órgano de Corti (OC). A modo general, estas células son inervadas por fibras nerviosas que transportan las señales auditivas hasta el tronco encefálico (neuronas aferentes) y en un circuito de retroalimentación, también llegan a las células nerviosas que envían las señales desde el cerebro hasta el oído (neuronas eferentes).

Las células ciliadas se dividen en dos tipos: células ciliadas internas (CCI) y células ciliadas externas (CCE) (Maroonroge y cols., 2000; Y. Raphael y Altschuler, 2003). La CCI es la célula sensorial real, enviando impulsos a través del nervio auditivo. Por otro lado, las CCE mejoran el rendimiento de la cóclea de manera cualitativa (mayor selectividad) y cuantitativa (mayor sensibilidad) (Y. Raphael y Altschuler, 2003). Las CCE permanecen separadas de las CCI por una estructura anatómica llamada túnel de Corti (Alberti, 2001).

Las CCI tienen forma de pera y un núcleo central y redondo. Estas células se extienden a lo largo de la cóclea en hilera descansando sobre la lámina espiral (Maroonroge y cols., 2000; Y. Raphael y Altschuler, 2003). En los monotremas se pueden encontrar entre 2 y 5 filas irregulares de CCI separadas de las 5-6 filas de CCE por 4 filas de células pilares (Ladhams y Pickles, 1996; Vater y Kössl, 2011).

Lateralmente, estas células contactan con las células pilares internas y las células falángicas. El extremo apical de las CCI junto con sus estereocilios, se bañan en la endolinfa del conducto coclear o escala media. Por otro lado, su porción tanto basal como lateral, queda inmersa en perilinfa y aparece cubierta por células de soporte y terminaciones nerviosas (Y. Raphael y Altschuler, 2003). Existe una única fila de CCI que se localiza próxima al núcleo central coclear (Alberti, 2001).

Todas las células ciliadas poseen en la parte superior unas estructuras llamadas estereocilios (Maroonroge y cols., 2000; Y. Raphael y Altschuler, 2003). Cada grupo de estereocilios que poseen las células ciliadas recibe el nombre de paquete de estereocilios. Este paquete se organiza en el extremo apical de cada célula ciliada en forma de filas formando distintos patrones.

En el caso de las CCE, estos paquetes presentan forma de “W” o “V”, mientras que en las CCI su forma es similar a una “U” (Maroonroge y cols., 2000). El número de estereocilios varía, dependiendo de la especie y del lugar en el conducto coclear (por ejemplo: en la porción basal las células ciliadas presentan un número mayor de estereocilios) pueden tener entre 20 y 50 estereocilios cada célula ciliada, incluso más. La morfología de estos estereocilios es similar a las microvellosidades, aunque son bastante mayores en cuanto a su tamaño.

Las células ciliadas externas (CCE) tienen una morfología cilíndrica, una membrana apical aplanada y el núcleo aparece redondeado en la porción más basal de la célula. El extremo apical está provisto de estereocilios y el basal descansa sobre las células de Deiters y su membrana lateral contacta con el espacio de Nuel (Y. Raphael y Altschuler, 2003).

Por lo general existen tres filas de CCE, pero se pueden ver hasta cuatro o cinco en la vuelta apical o en mamíferos que están especializados en baja frecuencia (Yehoash Raphael, Lenoir, Wroblewski, y Pujol, 1991). Algunas de las especies donde se pueden encontrar más de tres filas de CCE, a nivel del extremo apical de la cóclea son: el ser humano, la rata y la rata topo (Slepecky, 1996; Vater y Kössl, 2011). En cuanto a los cetáceos, para la especie *Tursiops truncatus* se describieron tres filas de CCE en las tres primeras medias vueltas de la cóclea y cuatro filas en la última (E. G. Wever, McCormick, Palin, y Ridgway, 1971b).

La longitud de las CCE se encuentra entre 20 y 70 μm , y la misma varía dependiendo de la especie y ubicación en el conducto coclear. En el caso de mamíferos adaptados a frecuencias más bajas, tienen CCE más largas y, en los mejor adaptados a frecuencias más altas, estas células son más cortas. Por otro lado, las vueltas más apicales a lo largo del conducto coclear presentan CCE más largas, mientras que estas son más cortas en los giros más próximos al extremo apical de la cóclea (Y. Raphael y Altschuler, 2003).

En algunas especies se han realizado mediciones de la longitud de sus CCE, como el murciélago de herradura con una longitud de 12-15 μm en la porción más basal de la cóclea y 28-30 μm en la zona más apical (Vater y Lenoir, 1992), el delfín nariz de botella que presenta CCE con 8-17 μm de largo (E. G. Wever y cols., 1971b), el delfín listado con 10-22 μm de longitud de sus CCE y la marsopa común con unas medidas entre 8-18,5 μm de largo en las CCE presentes en el OC (Y. Raphael y cols., 1997).

Retzius (1884), describió el número de células ciliadas totales, tanto externas como internas para el ser humano, siendo un total de 3475 CCI y 11500 CCE, para el conejo con 1600 CCI y 6100-6200 CCE y para el gato, que presentaba 2600 CCI y 9900 CCE. Posteriormente se contabilizó el número de células ciliadas en la especie *Tursiops truncatus*, la cual presentaba 3451 CCI y 13933 CCE (E. G. Wever y cols., 1971b) y en ejemplares de la especie *Lagenorhynchus obliquidens* con 3272 CCI y 12899 CCE (E. G. Wever y cols., 1972).

El OC posee distintas células de soporte, las cuales son de tipo epitelial. Estas células de soporte rodean a las células ciliadas. En el caso de las CCI, aparecen rodeadas por las células falángicas externas e internas. Las anteriormente nombradas células de Deiters, junto con las células pilares, contactan con las CCE. Lateralmente, en el OC podemos encontrar las células de Hensen. También podemos encontrar otro tipo de células de soporte, como las células de Claudius.

Las porciones apicales de las células ciliadas junto con las células de soporte del OC forman lo que se denomina lámina reticular, la cual, aísla al OC de la endolinfa de la escala media, excepto a los estereocilios que se proyectan a través de esta lámina para bañarse en la endolinfa (Maroonroge y cols., 2000; Y. Raphael y Altschuler, 2003). Las CCE entran en contacto con cinco tipos de células de soporte, cuatro a nivel de la lámina reticular y una en la superficie basal (Y. Raphael y Altschuler, 2003).

La membrana tectoria (MT) es una estructura anatómica compuesta por tejido conectivo “acelular” que cubre el OC (Lim, 1972; Steel, 1983). La MT se dispone a modo de “manta” cubriendo el OC desde la base hasta el ápice coclear (Kimura, 1966; Lim, 1972). La superficie inferior de la MT entra en contacto con los estereocilios de las CCE, mientras que su superficie lateral comunica con las células de Hensen.

La MT presenta cuatro regiones diferentes: red de cobertura (región superior), red marginal (superficie lateral), zona limbal (superficie medial) y una zona media (Y. Raphael y Altschuler, 2003).

Mientras que los estereocilios de las CCE permanecen firmemente unidos a la MT, los estereocilios de las CCI permanecen independientes y unidos de manera libre a la MT (Alberti, 2001).

El limbo espiral se proyecta desde la lámina espiral hasta el OC, uniéndose a la membrana tectoria (Maroonroge y cols., 2000).

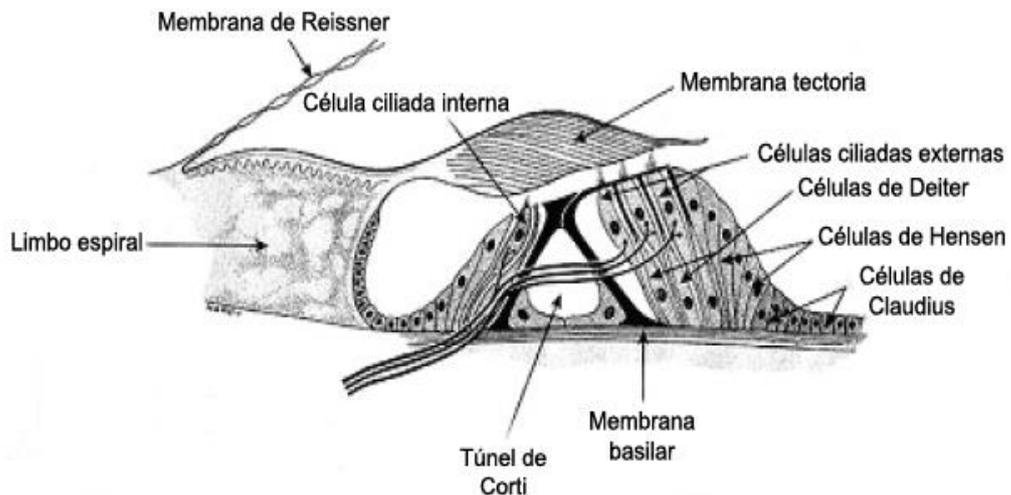


Fig. 2.9. Imagen que representa la estructura del órgano de Corti (Imagen modificada, Maroonroge y cols., 2000 (obtenida a su vez de Emanuel y Letowski, 2009)).

Los procesos periféricos de las neuronas del ganglio espiral viajan hasta el órgano de Corti para contactar tanto con las CCI como con las CCE. Los procesos de estas

neuronas constituyen la porción acústica del nervio coclear, para alcanzar el núcleo coclear en el tronco encefálico (Muniak y cols., 2016).

El GE se localiza en el interior del canal de Rosenthal, situado en el interior del modiollo (eje coclear), medial a la lámina espiral ósea (Carricondo y Romero-Gómez, 2019; Muniak y cols., 2016).

Los procesos periféricos de las neuronas ganglionares llegan hasta las células ciliadas para inervarlas a través de la *habénula perforata* (Muniak y cols., 2016). En estas células sensoriales (células ciliadas internas y externas), la inervación aferente se ejecuta de un modo muy específico por las neuronas ganglionares (Carricondo y Romero-Gómez, 2019).

Existen dos tipos de neuronas diferentes que conforman el GE (Fig. 2.10), la

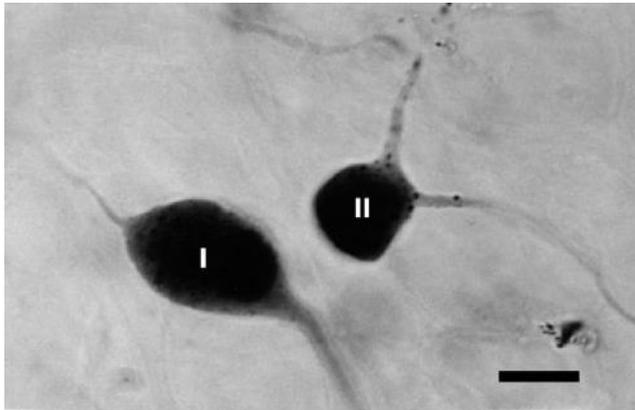


Figura 2.10. Neuronas ganglionares tipo I y II de un gato marcadas inmunohistológicamente con peroxidasa de rábano, la cual pone en evidencia tanto los procesos centrales como los periféricos de estas neuronas. La barra de escala mide 10 μm (imagen modificada, Nayagan y cols., 2011 y Kiang y cols., 1982).

clasificación se realiza en función de su tamaño, cantidad y características tanto de sus procesos centrales como periféricos (Kiang y cols., 1984; Spoendlin, 1971, 1973). A estos dos tipos de neuronas ganglionares, se les conoce como neuronas ganglionares tipo I (NGI) y neuronas ganglionares tipo II (NGII). Las primeras de ellas representan la mayoría de la población de células ganglionares, con un total

aproximado del 90-95% (Spoendlin, 1971, 1973). Las NGI son neuronas bipolares que poseen un tamaño mayor, axones mielinizados, y una alta cantidad de ribosomas y orgánulos citoplasmáticos (Muniak y cols., 2016).

Las proyecciones neuronales de dichas neuronas conecta el sistema nervioso central con las CCI (Eybalin, 1993). Las dendritas neuronales de las NGI se distribuyen de manera radial a través de la *habénula perforata* hasta el OC, formando el plexo espiral interno antes de conectar con las CCI (Carricondo y Romero-Gómez, 2019).

Cada dendrita va a inervar solo una CCI (Fig. 2.11), recibiendo cada CCI en torno a unas 10-20 dendritas aferentes tipo I (Carricondo y Romero-Gómez, 2019; Eybalin, 1993).

Por otro lado, las NGII constituyen el 5-10% restante de células ganglionares que componen el ganglio de mismo nombre. Este tipo de neuronas son pseudomonopolares, presentan un tamaño menor que las anteriores, no están mielinizadas y son ricas en neurofilamentos (Berglund y Ryugo, 1986; Kiang, Rho, Northrop, Liberman, y Ryugo, 1982; Muniak y cols., 2016).

En este caso, los axones de las NGII inervan las CCE, inervando cada neurona a 15-20 CCE aproximadamente (Figura 2.11). Por su parte, cada célula ciliada externa entra en contacto con una sola fibra aferente tipo II (Carricondo y Romero-Gómez, 2019).

Los axones de las neuronas ganglionares tipo I y tipo II forman la porción acústica del nervio craneal VIII o nervio vestibulococlear, que viaja a través del meato auditivo interno (ubicado en el hueso temporal) hasta el sistema nervioso central, en concreto hasta los núcleos cocleares (Brown, Berglund, Kiang, y Ryugo, 1988; Lorente de No, 1933b, 1933a; Maroonroge y cols., 2000).

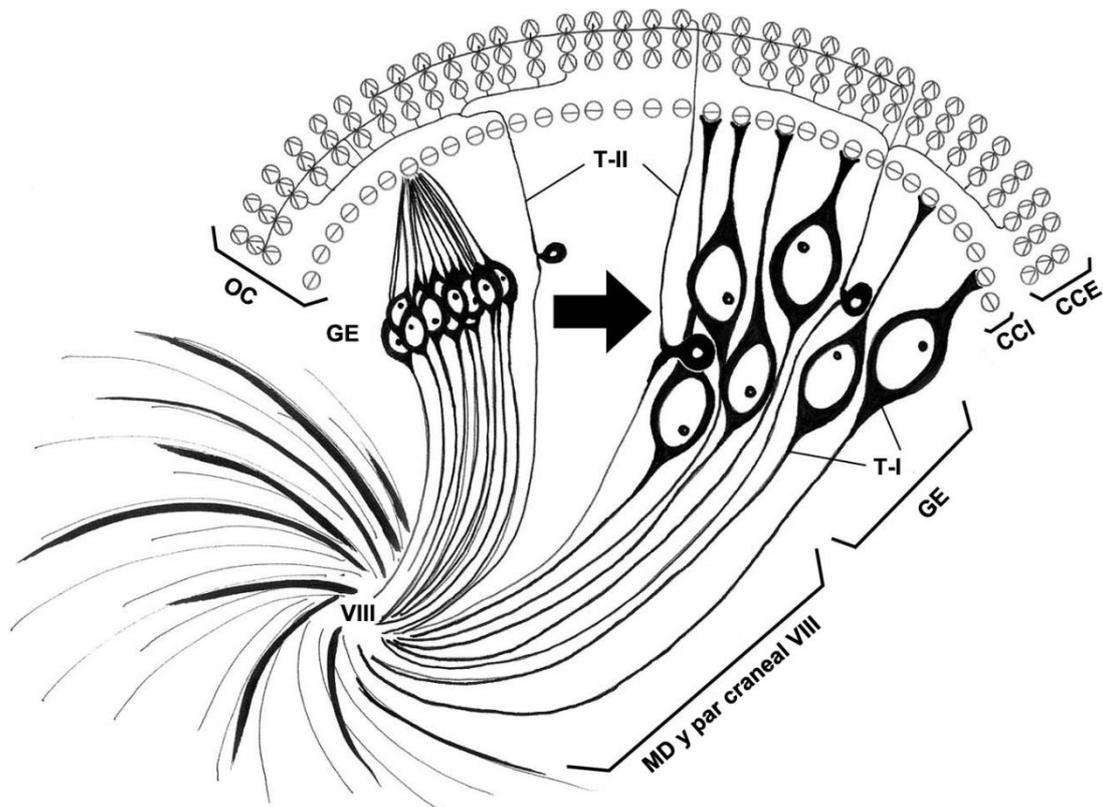


Figura 2.11. Representación del ganglio espiral (GE) y sus neuronas ganglionares tipo I (T-I) y tipo II (T-II) que interaccionan con las células ciliadas presentes en el órgano de Corti (OC). Las células ciliadas internas (CCI) se unen a las T-I, mientras que las células ciliadas externas (CCE) lo hacen a las T-II. Los axones de estas neuronas salen de la cóclea por el modiollo (MD) o eje axial formando la porción acústica del par craneal VIII o nervio vestibulococlear (imagen modificada, Carricondo y Romero-Gómez, 2019 (esta imagen a su vez está basada en dibujos de Ramón y Cajal, 1909; Warr, 1992 y Gil-Loyza y cols., 2000)).

En los seres humanos existe una diferencia a destacar con respecto a las células ganglionares, habiéndose descrito que, a diferencia de otros mamíferos, sus NGI no suelen estar mielinizadas, pero sus procesos sí, presentando a menudo entre 20 y 30 capas de mielina (Kimura, Ota, Schuknecht, y Takahashi, 1976; Ota y Kimura, 1980; Thomsen, 1966). En cuanto a las NGII, aproximadamente la mitad de ellas presentan una delgada capa de mielina en esta especie (Ota y Kimura, 1980).

Dependiendo de las características de audición de cada especie animal, el GE podrá presentar ciertas diferencias en cuanto a densidad neuronal se refiere. Así, por ejemplo, los micromurciélagos que utilizan la ecolocalización, poseen una mayor

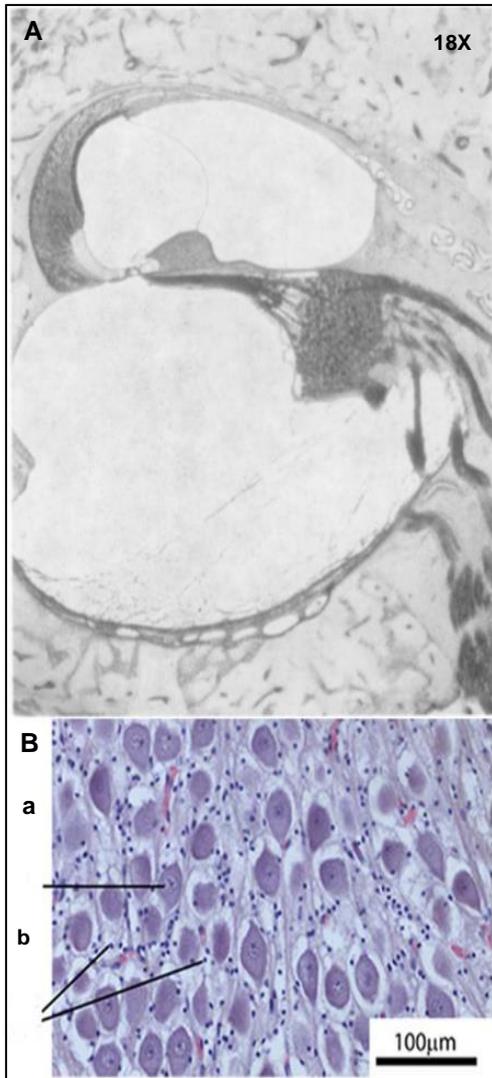


Fig. 2. 12. A: sección transversal de la cóclea de un ejemplar de *Tursiops truncatus*, 10 mm desde el extremo basal dónde se puede apreciar el GE a la derecha de la imagen (imagen modificada, Wever, 1971). **B:** Imagen del GE de un ejemplar de *Delphinapterus leucas* con una tinción de HE. **B.a.** Neuronas ganglionares. **B.b.** Núcleos de las células gliales satélite. (Imagen modificada, Sensor, 2015).

densidad de neuronas ganglionares (Bruns y Schmieszek, 1980; Burda, Fiedler, y Brums, 1988). En ratones se ha podido observar que las áreas sensibles a frecuencias más altas, presentan un número mayor de neuronas ganglionares (Johnson, Schmitz, y Santi, 2011).

El diámetro del canal que contiene al GE aumenta su diámetro en especies sensibles a frecuencias más altas como los murciélagos (Pye, 1966b, 1966a, 1967) y los odontocetos que ecolocalizan (Fleischer, 1976; Luo y Eastman, 1995; Luo y Marsh, 1996; E. G. Wever, McCormick, Palin, y Ridgway, 1971a). Este canal es más estrecho en misticetos (ballenas) ya extintos, que se asociaría a una sensibilidad a frecuencias más bajas (Ekdale y Racicot, 2015; Geisler y Luo, 1996).

Guild y cols., (1931) describieron un total de 29024 neuronas ganglionares en el ser humano, posteriormente, E. G. Wever (1949) publicó un trabajo en el que este número cambiaba a un total de 30500 neuronas ganglionares en esta especie. Esta investigación también se ha realizado en especies de cetáceos odontocetos, como por ejemplo, *Tursiops truncatus* (Figura 2.12) con un total de 95004-96716 neuronas

ganglionares (Ketten, 1997; E. G. Wever y cols., 1971b) y 50412 (Ernest Glen Wever y cols., 1972) en *Lagenorhynchus obliquidens*.

Esto se traduciría en que estas especies tendrían tres veces más neuronas ganglionares cocleares que los humanos (E. G. Wever y cols., 1971b). Por otra parte, la relación entre estas células (neuronas) y células ciliadas, en *Tursiops truncatus* se estimaría un ratio de 5:1, y un ratio 4:1 para *Lagenorhynchus obliquidens* frente al ratio en el ser humano que sería de 2:1 (E. G. Wever y cols., 1972).

En lo que respecta al diámetro de las fibras auditivas, en estos animales presenta una media de 12 μm , mientras que en mamíferos terrestres oscila entre 1-15 μm de diámetro, con una media de 3 μm (Gao y Zhou, 1992, 1995; Ketten, 1984, 1992; Morgane y Jacobs, 1972; Nadol, 1988). Se ha hipotetizado que este hallazgo anatómico podría corresponderse con latencias (tiempo entre la entrada del estímulo y la emisión de una respuesta) más cortas en las respuestas auditivas del tronco encefálico de los delfines (Ridgway y cols., 1981).

2.2. Audición

La audición es uno de los sentidos principales, siendo una herramienta útil para el estado de alerta y la comunicación (Alberti, 2001). El oído es el encargado de gran parte de este proceso, recibiendo las ondas sonoras que provienen del medio externo, distinguiendo las distintas frecuencias y vehiculizando esta información hacia el sistema nervioso central donde se descifra (Guyton y Hall, 2016).

2.2.1. Mamíferos terrestres

En el caso de los mamíferos terrestres es el pabellón auricular el responsable de recoger el sonido del entorno y canalizarlo hacia el canal auditivo (Alberti, 2001). Posteriormente, la cadena de huesecillos lleva el sonido recogido por la membrana timpánica o tímpano hasta la cóclea a través del oído medio (Guyton y Hall, 2016).

El sonido es amplificado tanto por el oído externo como el medio. El pabellón auricular se compone por un área amplia que hace un efecto embudo llevando la señal acústica hasta la membrana timpánica más pequeña. Por otro lado, la cadena de huesecillos forma un sistema de palancas con función de amplificación de las ondas sonoras (Alberti, 2001).

El músculo tensor del tímpano mantiene a la membrana timpánica en una constante tensión, lo que permite que una vibración que se de en cualquier parte de la membrana se pueda transmitir a los huesecillos. Cada vez que la membrana

timpánica se mueve hacia adentro, con ella se desplaza también el martillo, el cual arrastra al yunque, que hace que el estribo empuje hacia adelante la ventana oval y el líquido coclear. Este fenómeno se da lugar también a la inversa cuando la membrana timpánica se desplaza hacia fuera.

El estribo es capaz de moverse hacia adentro y hacia fuera gracias a su ligamento anular. Este huesecillo, a través de su base y gracias a sus movimientos, transporta las vibraciones sonoras a la ventana a oval, y esta a su vez le da entrada a la escala vestibular (Guyton y Hall, 2016). El movimiento hacia dentro ejerce presión sobre la perilinfa de la escala vestibular.

Debido a que el líquido no se comprime, la onda de presión atraviesa el conducto coclear, pudiendo llegar a la escala timpánica por esta vía o a través del helicotrema, donde entra en movimiento la perilinfa de esta escala (Figura. 2.13) (Guyton y Hall, 2016; Krause, 2005; Maroonroge y cols., 2000).

A la inversa, cuando la salida del huesecillo es hacia fuera lo arrastra hacia atrás. Una vez la onda sonora llega a la ventana oval, la lámina basilar en su porción más basal se dobla en dirección a la ventana redonda. Esto va a hacer que se origine una onda de líquido que recorre la lámina basilar hasta llegar al helicotrema.

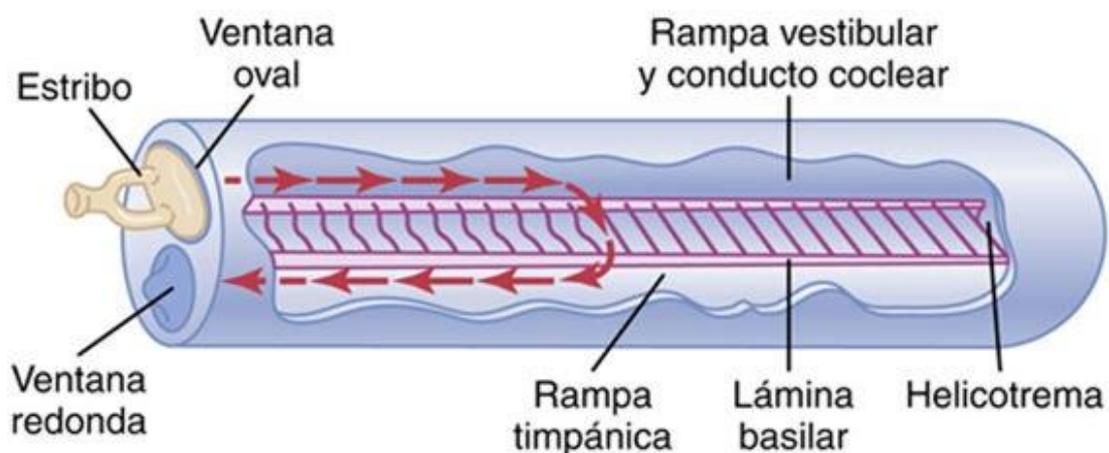


Fig. 2. 13. Esquema que representa el movimiento del líquido coclear después de que el estribo se haya desplazado hacia delante (imagen modificada, Guyton, 2016).

Los patrones de vibración que atañen a esta lámina van a variar en función de la frecuencia de las ondas que ingresen a través de la ventana oval: las ondas de frecuencias más altas se propagan una pequeña distancia sobre la lámina basilar hasta desvanecerse; las ondas sonoras de frecuencia media llegan más o menos hasta la mitad de esta; y las ondas de baja frecuencia recorren toda la lámina basilar.

Los impulsos nerviosos que se generan en respuesta a la vibración que recorre la lámina basilar, se generan en el órgano de Corti. Las células ciliadas localizadas en este órgano, que son los auténticos receptores sensitivos, establecen sinapsis con las fibras nerviosas cocleares que llegan al ganglio espiral (Guyton y Hall, 2016).

Las neuronas ganglionares envían sus axones hacia el nervio coclear, el cual se une al nervio vestibular formando el nervio vestibulococlear, que viaja hasta el sistema nervioso central donde se vuelven a separar y toman vías distintas (Guyton y Hall, 2016; Maroonroge y cols., 2000).

2.2.2. Mamíferos marinos: cetáceos odontocetos

Los cetáceos, en la transición del medio terrestre al marino, se enfrentaron a una serie de adaptaciones necesarias para poder desplazarse, obtener alimento, reproducirse y comunicarse. En comparación con el medio terrestre, el medio marino es oscuro y denso, presentando ciertas dificultades para llevar a cabo estas actividades. Por esta razón el sentido de la audición es una herramienta de comunicación fundamental para estos animales (Perrin y cols., 2009; Thomas, Kastelein, y Supin, 1992), sufriendo distintas adaptaciones anatómicas durante su historia evolutiva con una reorganización de la transmisión del sonido como resultado (Nummela y cols., 2007).

La reducción del pabellón auricular junto con el cierre del canal auditivo, son algunos de los cambios anatómicos que han sufrido los cetáceos en el proceso de adaptación al medio marino (Hoelzel, 2002). Como comentábamos en el apartado anterior, el pabellón auricular externo y el conducto auditivo externo se encargan normalmente de captar y conducir el sonido desde el exterior hasta el oído medio (figura 2.14) en mamíferos terrestres (Berta, Sumich, y Kovacs, 2006; Guyton y Hall, 2016).

Debido a esto, durante décadas, la comunidad científica ha estudiado el mecanismo por el cual el sonido viaja desde el medio exterior hasta la cóclea de los cetáceos (Brill, Moore, y Helweg, 2001; Brill, Sevenich, Sullivan, Sustman, y Witt, 1988; Bullock y cols., 1968; Cranford y cols., 2010; Cranford, Krysl, y Hildebrand, 2008b; Dudok van Heel, 1962; Ketten, 2000; McCormick y cols., 1970; Møhl, Au, Pawloski, y Nachtigall, 1999; Mooney y cols., 2008; Norris, 1964, 1968; Song y cols., 2019).

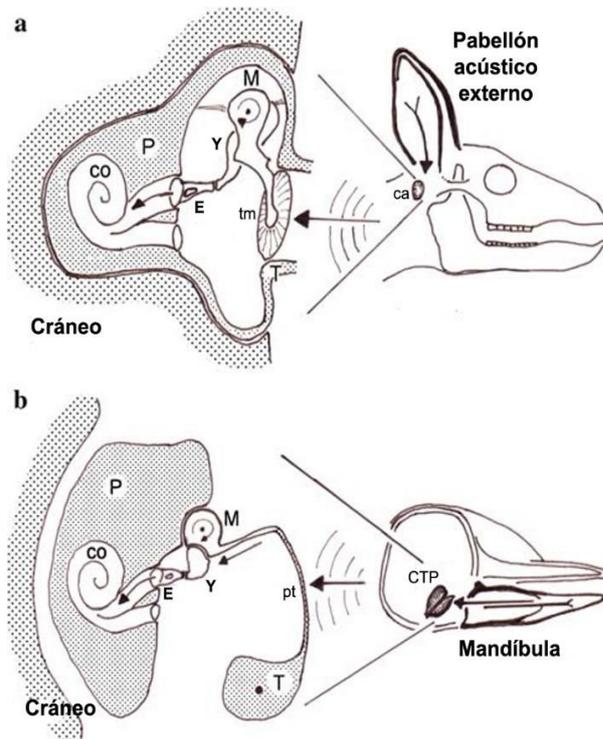


Fig. 2.14. Esquema representativo del proceso de audición de un mamífero terrestre (a) y de un delfín (b). Lo primero que se puede apreciar es que tanto el oído medio como el interno, en mamíferos terrestres están incluidos en el cráneo (a), mientras que en delfines se presentan exteriorizados (b) formando el complejo tímpano-periótico (CTP). Mientras que los mamíferos terrestres captan el sonido a través del pabellón auricular, canal auditivo (ca) y posteriormente el tímpano (tm). Las teorías dicen que en delfines el sonido ingresa en la cabeza a través de la mandíbula de estos animales. P: hueso periótico; M: martillo; Y: yunque; E: estribo; co: cóclea; pt: placa timpánica; T: hueso timpánico (Imagen modificada, Hemilä, S. y cols., 2010).

De las múltiples teorías descritas a lo largo de la historia, la más aceptada hasta la actualidad es la descrita por Norris (1964, 1968), el cual denominó como “*pan bone*” al área más delgada de la mandíbula, observando que era un hallazgo común entre los odontocetos. Sobre esta área anatómica se encuentra una estructura de composición grasa a la cual llamó “ventana acústica”. La hipótesis de Norris consistía en que el sonido ingresa en la cabeza del animal a través de esta grasa y transcurre por la porción más delgada de la mandíbula, de ahí a la grasa acústica localizada en el canal mandibular, la cual el autor observó que conecta con la bulla timpánica (Figura 2.14). La idea de Norris ha sido apoyada por varios autores (Brill y cols., 1988; Bullock y cols., 1968; Cranford y cols., 2010; Maxia y cols., 2007; Mooney y cols., 2012; Norris y Harvey, 2005; Sysueva y cols., 2017). Maxia y cols., (2007), describieron en ejemplares de *Stenella coeruleoalba*, que los

cuerpos grasos ubicados en la región posterior y lateral de la mandíbula tienen una composición distinta al “*blubber*”. Dicha composición variaba en función de la edad del animal, esto podría indicar que a lo largo de su vida poseen unas propiedades distintas en lo que respecta a la recepción del sonido.

Acerca de la anatomía de este compuesto graso, Cranford y cols., (2010), observaron la existencia de dos ramificaciones del cuerpo graso mandibular que conectaban con el CTP, lo que podría indicar la existencia de al menos dos vías por las que podría viajar el sonido hasta dicho complejo.

La teoría de este equipo involucra la participación, además de la grasa acústica, de varios componentes óseos: la señal acústica ingresa en la superficie del cráneo, se amplifica o infiltran a través de las distintas estructuras anatómicas, se propaga hacia y mediante el cuerpo graso mandibular ejerciendo presión acústica sobre los distintos componentes óseos que poseen una delgadez variable.

Las presiones acústicas se suman mediante el complejo óseo, lo cual origina una serie de desplazamientos mecánicos que desembocan en una emisión de vibraciones complejas en el CTP y la cadena de huesecillos. McCormick y cols., (1970), también apoyaban la teoría de la participación de los distintos componentes óseos presentes en las proximidades de la bulla timpánica, incluida la cadena de huesecillos.

Tras las múltiples aportaciones sobre la funcionalidad acústica de esta estructura grasa, puede que un posible equivalente al pabellón auricular que encontramos en mamíferos terrestres sea este extenso cuerpo graso que se encuentra alrededor y en el interior de cada hemimandíbula. Como resultado, la mandíbula sería parte de un sistema de recepción acústica (Cozzi y cols., 2017).

Existe otra teoría descrita por Cranford y cols., (Cranford, Krysl, y cols., 2008b; Cranford, McKenna, y cols., 2008) que sugiere otra vía de recepción de las ondas de sonido en *Ziphius cavirostris*, sin necesidad de pasar por la estructura denominada como “*pan bone*”. Dicha vía se conoce como “vía gular”, y consiste en que las ondas acústicas entrarían al cráneo ventralmente, entre las hemimandíbulas, viajando a través de la porción desprovista de tejido óseo en la superficie medial y posterior de cada hemimandíbula y continuarían medialmente por el cuerpo graso mandibular interno. Algunas propuestas describen que este cuerpo graso del que hablamos podría tener función amplificadora del sonido, tal y como lo haría el pabellón auricular en los mamíferos terrestres (Cranford, Krysl, y cols., 2008b; Cranford, McKenna, y cols., 2008; Nummela y cols., 2007).

Más recientemente, Yamato y Pyenson (2015), refirieron la presencia de un embudo acústico localizado anteriormente a la abertura timpánica, cuya orientación podría ser funcionalmente relevante, ya que parece estar relacionado con las vías receptoras del sonido descritas anteriormente. Por otro lado, Song y cols., (2019), plantean la probabilidad de que sea la cabeza en todo su conjunto capaz de recibir el sonido, existiendo más de una vía de conducción de la señal acústica. Esto se traduciría en

que la cabeza y la mandíbula, de manera conjunta, serían capaces de guiar el sonido hacia la bulla timpánica desde distintas direcciones.

Como se comentaba anteriormente, el canal acústico externo en cetáceos odontocetos permanece ocluido y sin conexión aparente con la membrana timpánica (Ketten, 2000; Norris, 1968). Algunos autores como McCormick y cols., (1970), han descrito esta estructura como afuncional respecto al proceso de audición, por lo que algunos autores comenzaron a proponer que los tejidos blandos presentes en el cráneo de estos animales podrían servir como análogos del canal auditivo para la conducción del sonido (Dudok van Heel, 1962; Reysenbach de Hann, 1957).

Sin embargo, Brill y cols., (1988), propusieron que en el caso de que el MAE fuera funcional, su eficacia dependería del tipo de frecuencia de las ondas sonoras recibidas. En 2001 demostraron que los delfines de su estudio presentaban sensibilidad tanto en el área mandibular como en la periferia de la abertura del canal acústico externo, pero cada uno para un rango distinto de frecuencias (Brill y cols., 2001). Por último, se ha especulado sobre la posible funcionalidad acústica del canal auditivo, dado el reciente hallazgo de estructuras anatómicas de composición nerviosa asociadas al mismo a lo largo de su trayecto (De Vreese y cols., 2020).

En comparación con las diferencias anatómicas y funcionales del oído medio que existen entre mamíferos terrestres y cetáceos odontocetos, el oído interno al ser anatómicamente muy similar, su funcionamiento es probablemente el mismo (Ketten, 2000) que el descrito anteriormente para mamíferos terrestres.

2.3. Descalcificación

2.3.1. Concepto, tipos y factores que influyen en la reacción

La descalcificación es el proceso mediante el cual se elimina o retira el calcio inorgánico de la matriz de colágeno orgánico de un tejido óseo. Para que esto se lleve a cabo se utilizan normalmente agentes químicos, tanto ácidos (forman sales de calcio solubles) como agentes quelantes (se unen a los iones de calcio). A continuación, se expondrán los distintos tipos de descalcificadores:

- **Ácidos:** existen dos grupos de ácidos, los ácidos fuertes (inorgánicos) y los ácidos débiles (orgánicos).

- *Ácidos fuertes.* Dentro de este grupo podemos encontrar el ácido nítrico o el ácido clorhídrico, por ejemplo. Estos ácidos descalcifican de una manera rápida, pero si el tejido permanece más de 24-48 horas puede verse alterada su capacidad de tinción. A la hora de realizar técnicas inmunohistoquímicas, con frecuencia resulta más dañino para los antígenos y las enzimas, que se pueden perder totalmente y, por tanto, su detección inmunohistoquímica.
- *Ácidos débiles.* El ácido fórmico, ácido acético o el ácido pícrico son ácidos débiles, siendo el ácido fórmico el más usado de manera extendida como descalcificador de elección. Este descalcificador suele usarse en forma de solución acuosa, tamponada o combinarse con formaldehído. Una solución de formaldehído y ácido fórmico al 10% tiene la característica de que descalcifica y fija el tejido al mismo tiempo. El ácido fórmico, a diferencia del ácido clorhídrico, es más lento y suele ser elegido si se van a realizar técnicas inmunohistoquímicas. A pesar de esto, este ácido puede ocasionar daños en el tejido, antígenos y en tinciones histoquímicas de tipo enzimáticas.
- **Agentes quelantes:** el principal agente quelante utilizado es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Aunque sea denominado ácido, no actúa de la misma manera que un ácido, lo que hace es unirse a iones metálicos, principalmente el calcio y el magnesio. Si la solución permanece a un pH inferior a 3 no podrá unirse al calcio y a un pH de 7-7,4 actuará de manera más rápida. El EDTA enlaza el calcio mediante un proceso muy lento que no daña el tejido ni su capacidad de teñirse. Es un descalcificador excelente para realizar técnicas inmunohistoquímica o tinciones enzimáticas.

Existen algunos factores que pueden influir a la hora de descalcificar un tejido, como, por ejemplo:

- **Concentración del agente descalcificador:** la concentración va a condicionar el tiempo que lleve descalcificar el tejido, pero también puede dañarlo. Tenemos que, una alta concentración de reactivo descalcificador va a hacer que el tejido se descalcifique más rápidamente, pero también va a ocasionar un mayor daño al mismo.

- **Temperatura:** por lo general, un incremento de la temperatura provoca una aceleración de muchas reacciones químicas, entre ellas se encuentra la descalcificación.

Cuando se lleva a cabo la descalcificación de un tejido con un ácido, el incremento de la temperatura puede acelerar la reacción, pero también aumenta el daño que puede ejercer el ácido sobre el tejido. En la práctica, trabajar estos agentes a temperatura ambiente (18-30°C) da unos resultados aceptables.

A la hora de trabajar con EDTA también se acelera la reacción química de la descalcificación si se produce un aumento de la temperatura, pero con el riesgo de que se produzca una escasa preservación de antígenos sensibles al calor, enzimas, etc.

Al contrario, una exposición a temperaturas más bajas ralentizaría la velocidad de la reacción.

- **Agitación:** al parecer, la agitación mecánica tiene efecto sobre el intercambio de líquidos que se produce dentro y alrededor de los tejidos con otros reactivos, por lo que sería lógico pensar que la agitación acelera la descalcificación. Se puede conseguir una agitación suave del fluido mediante una rotación a baja velocidad, balanceo, agitación o con un burbujeo de aire en la solución descalcificadora (G. M. Callis, 2008).

2.3.2. Historia de la descalcificación

El hecho de estudiar un tejido el cual aparece osificado, por su naturaleza o a causa de alguna patología, dificulta el proceso de corte si fuera necesario para su posterior análisis. Por esta razón, la comunidad científica se enfrentó al reto de descalcificar para poder profundizar en el aprendizaje de un tejido osificado, así como sobre su anatomía y/o fisiología (Carpenter, 1847; King, 1871; Pritchard, 1876; Williamson, 1849), así como sus posibles patologías (Dreschfeld, 1880; J. S. Fraser, 1908; T. Fraser, 1912; Maguire, 1881).

Existen evidencias de que en 1847 algunos autores (Carpenter, 1847) utilizaban agentes descalcificadores para el estudio de las valvas de dos moluscos distintos (*Waldheimia australis* y *Terebratulina caputserpentis*) con un agente ácido diluido.

Hay constancia de que ya en 1849 se utilizaba el ácido clorhídrico (Williamson, 1849) como descalcificador ofreciendo buenos resultados en su investigación.

Schaffer (1902), realizó una comparación de tiempos de descalcificación en huesos y tendones, como conclusión recomendó utilizar ácido nítrico al 5%. En 1930 (Evans y Krajian, 1930) publicaban un nuevo protocolo de descalcificación que consistía en una solución a base de ácido fórmico acuoso al 85% y citrato de sodio acuoso al 20%. Obtuvieron como resultado una tinción de buena calidad y aparentemente las estructuras celulares prácticamente no se habían visto afectadas, todo lo anterior en comparación con el uso del ácido nítrico como descalcificador.

Se siguieron realizando publicaciones intentando mejorar la técnica de descalcificación, obteniendo en algunos de ellos buenos resultados con el ácido fórmico (Kristensen, 1948; Lillie, 1944). Es a partir de los años 50, cuando se empieza a hacer uso de los agentes quelantes como reactivos descalcificadores de tejidos óseos (Hahn y Reygadas, 1951; Nikiforuk y Sreebny, 1951). Comparando estos últimos con agentes ácidos, concluyeron que los agentes quelantes como el EDTA eran tan buenos o incluso mejores que los ácidos (Hillemann y Lee 1953).

En 1876 se publicaba un artículo sobre el órgano de Corti en mamíferos (Pritchard, 1876), donde hablaban de una solución descalcificadora compuesta por una concentración del 1% de ácido nítrico en agua. Este compuesto químico se usó de forma extendida en la investigación del órgano de la audición (Bruce y Fraser, 1910; Hansson y Nylén, 1936; Lyon, 1958).

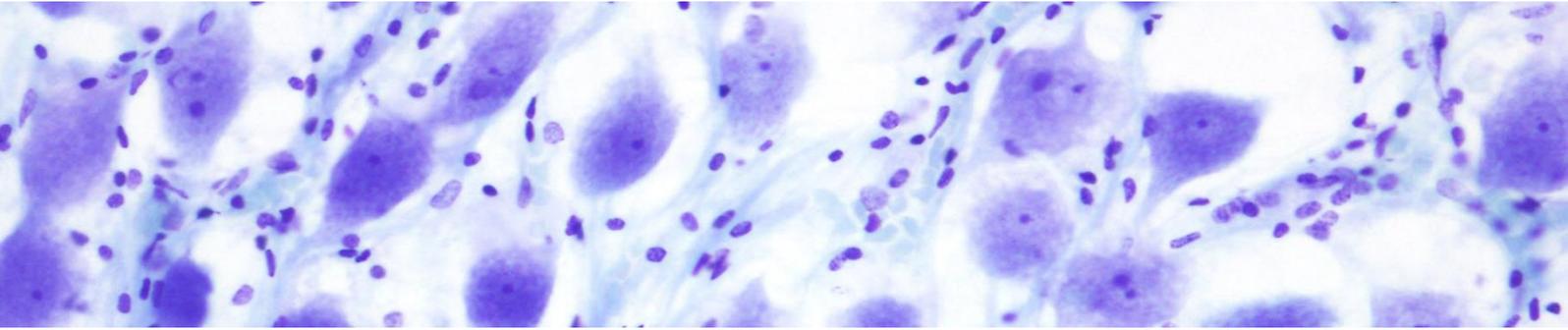
También han sido utilizados otros agentes descalcificadores como por ejemplo: ácido tricloroacético (Anders, 1947), ácido fórmico (Jorgensen, 1961) o ácido clorhídrico (Nabeya, 1923). Posteriormente, se comenzó a usar el EDTA como reactivo descalcificador (Arnold, 1988), y a introducir cortes en frío (Balogh y Nomura, 1964) para evitar el posible daño del tejido por altas temperaturas.

En los mamíferos, tanto el oído medio como el interno se encuentran envueltos en un fuerte componente óseo, el cual es necesario descalcificar para poder acceder al estudio del oído medio e interno. Tal y como ocurría en el resto de las estructuras anatómicas que se encuentran osificadas, trabajar con el oído también presentó dificultades a la hora de encontrar un protocolo óptimo de fijación y/o descalcificación, etc., para abordar de forma efectiva el estudio del oído interno, tanto desde el punto de vista histológico (estructural y ultraestructural) como particularmente, preservar la

antigenicidad de antígenos localizados en esas estructuras (Arnold, 1988; Jorgensen, 1961).

La necesidad de profundizar en la investigación de estructuras del oído interno, tanto en su estudio morfológico más íntimo, como particularmente, investigar la presencia morfofisiológica de proteínas en diferentes tipos celulares, ha hecho necesario intentar alcanzar un equilibrio entre los procedimientos de descalcificación de este órgano, particularmente, en especies donde su conocimiento es escaso si lo comparamos con otras especies de mamíferos terrestres.

3. Material y métodos



3.1. Material

Los 34 oídos utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos de distintas especies de cetáceos en las Islas Canarias. La División de Histología y Patología Animal del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) es la encargada del estudio *postmortem* (PM) de dichos animales.

Según el Acta de Protección de los Mamíferos Marinos de EE. UU. (1972, 2007), se define varamiento como un evento en su hábitat natural en el que un mamífero marino está muerto en la playa o la costa, o en aguas bajo jurisdicción (incluidas las aguas navegables); está vivo y se encuentra en una playa, en la costa, o en aguas bajo jurisdicción (incluidas las aguas navegables) y no puede regresar; puede regresar pero requiere de atención médica aparente; o no es capaz de volver a su hábitat natural por sus propios medios o sin asistencia.

En la Tabla 3.1 encontramos la información relacionada con los animales de los cuales se obtuvieron los oídos que fueron objeto del presente trabajo. Dichos datos se distribuyen de la siguiente manera:

- CET: número de referencia de cetáceo.
- Inv. (I): número de referencia laboratorial.
- Especie: nomenclatura científica.
- Sexo: hembra o macho.
- Edad: feto/neonato/cría, juvenil/subadulto, adulto.
- Procedencia: indica de cuál de las siete islas proviene el animal.
- Estado de conservación: el estado de conservación en el que se encuentra el cadáver cuando se le realiza la necropsia fue determinado de acuerdo con los parámetros y clasificación establecidos en el protocolo de la necropsia de cetáceos de la Sociedad Europea de Cetáceos (Kuiken y García-Hartmann, 1991):

- Muy fresco (grado 1): No existen signos cadavéricos visibles. En general este código se corresponde con animales eutanasiados o que mueren durante las operaciones de rescate, y la necropsia se hace inmediatamente.
- Fresco (grado 2): Individuos en los que comienzan a aparecer signos cadavéricos como leve desecación cutánea, opacidad corneal, inicio del rigor mortis y/o presencia de lividez cadavérica que desaparece por presión digital. En general, este código es el presentado con animales recién muertos, hasta aproximadamente 6 horas *postmortem*.
- Autólisis moderada (grado 3): Individuos que presentan desecación cutánea, opacidad corneal, rigor mortis, lividez y manchas de imbibición de pequeño tamaño, delimitadas, y de color rojo. Por norma general, esta categoría comprende aquellos animales a los que se le realiza necropsia entre las 6 y 24 horas *postmortem*.
- Autólisis avanzada (grado 4): Individuos en los que se observa la piel plegada y/o desprendida, hundimiento del globo ocular, timpanización del cadáver con protrusión de órganos abdominales, engrosamiento de la lengua, protrusión de genitales y presencia de manchas de imbibición extensas.
- Autólisis muy avanzada (grado 5): Individuo en el que puede observarse desde la presencia de piel desprendida y desgarrada, protrusión ocular, timpanización del cadáver con protrusión y/o evisceración de órganos abdominales y licuefacción (reblandecimiento y desorganización de la estructura orgánica), hasta la aparición de fenómenos reductivos (transformación y/o desaparición de tejidos blandos y óseos), momificación (cadáveres desecados) o adipocera (transformación grasa).

Tabla 3.1. Información sobre los animales de los que se obtuvieron los oídos incluidos en el presente estudio.

CET	Inv.	Especie	Sexo	Edad	Procedencia	Estado conservación
CET611	176/12	<i>Stenella frontalis</i>	Macho	Adulto	Fuerteventura	Fresco
CET638	124/13	<i>Delphinus delphis</i>	Hembra	Adulto	Gran Canaria	Autolisis moderada
CET643	114/13	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Macho	Adulto	Gran Canaria	Autolisis moderada
CET734	1342/14	<i>Kogia breviceps</i>	Macho	Adulto	Fuerteventura	Fresco
CET793	1242/16	<i>Delphinus delphis</i>	Macho	Juvenil	Fuerteventura	Fresco
CET801	1494/16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Adulto	La Gomera	Autolisis avanzada
CET802	1600/16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Macho	Adulto	Tenerife	Autolisis moderada
CET803	1558/16	<i>Kogia sima</i>	Hembra	Adulto	Tenerife	Fresco
CET804	1651/16	<i>Delphinus delphis</i>	Hembra	Juvenil	Gran Canaria	Autolisis moderada
CET809	1903/16	<i>Stenella frontalis</i>	Hembra	Juvenil	Gran Canaria	Fresco
CET810	1907/16	<i>Delphinus delphis</i>	Hembra	Juvenil	Tenerife	Fresco
CET813	1989/16	<i>Stenella frontalis</i>	Macho	Cría	Tenerife	Autolisis muy avanzada
CET814	1957/16	<i>Stenella frontalis</i>	Hembra	Cría	La Gomera	Fresco
CET816	1958/16	<i>Tursiops truncatus</i>	Hembra	Subadulto	Tenerife	Autolisis moderada
CET817	1911/16	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Hembra	Subadulto	Fuerteventura	Autolisis avanzada
---	1952.16	<i>Tursiops truncatus</i>	Hembra	Cría	Tenerife	Muy fresco
---	1953.16	<i>Tursiops truncatus</i>	Hembra	Cría	Tenerife	Muy fresco
CET834	1119/17	<i>Stenella frontalis</i>	Hembra	Subadulto	Tenerife	Autolisis moderada

3.2. Método

3.2.1 Extracción y fijación de los oídos

Los animales incluidos en el estudio fueron cetáceos a los que la División de Histología y Patología Veterinaria del IUSA les realizó el estudio *postmortem* en el periodo comprendido entre 2016 y 2017, así como algunos oídos que estaban conservados en el banco de tejidos del IUSA de años anteriores. A todos los individuos se les realizó una necropsia reglada completa, y como parte de ella, se usó el protocolo de extracción de oídos expuesto en la XXIII Conferencia de la

Sociedad Europea de Cetáceos (Morell y André, 2009; Morell, Brownlow, y cols., 2017), el cual consta de los siguientes pasos:

1. Se realiza un corte a nivel de la articulación atlantooccipital separando el cráneo del resto del cuerpo para un manejo más fácil.

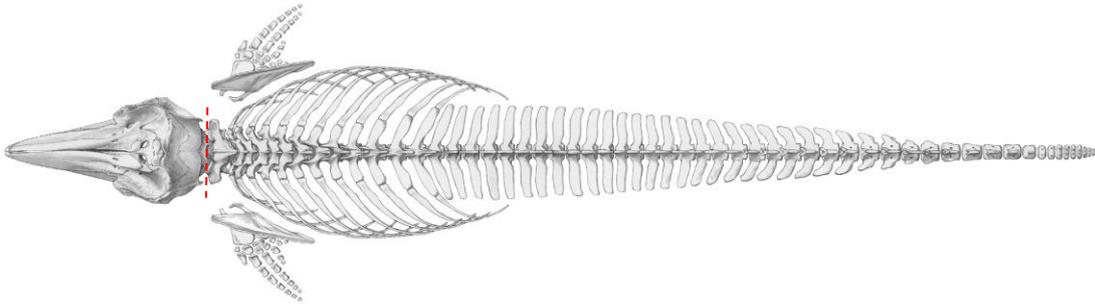


Fig. 3.1. Dibujo de un ejemplar de *Tursiops truncatus* desde una vista dorsal (Cozzi, 2017). La línea de puntos señala el nivel al que se debe diseccionar y cortar para separar el cráneo del resto del cuerpo del animal.

2. Teniendo en cuenta la localización anatómica del CTP, la mejor manera de acceder al mismo es retirando la mandíbula.
3. Se coloca la cabeza ventralmente en una superficie plana (Fig.3.2) y se retiran todos los tejidos y ligamentos que unen el CTP al cráneo.



Fig.3.2. Vista ventral del cráneo de un cetáceo durante el proceso de extracción de los complejos tímpano-perióticos.

4. Se incide de manera cuidadosa alrededor del CTP, preferiblemente con un bisturí, cortando así los ligamentos que sostienen los oídos.

Después de la extracción de dicho complejo se procede a la fijación del mismo, siguiendo los pasos del protocolo citado anteriormente (Morell y André, 2009; Morell, Brownlow, y cols., 2017).:

1. Se separa la porción periótica de la timpánica.
2. En la parte periótica se corta el ligamento estapedio y se retira el estribo.
3. Con ayuda de un bisturí, hacer un agujero pequeño en las membranas de la ventana oval y redonda.

4. Utilizando una jeringa con un catéter de un diámetro igual al de las ventanas oval y redonda, se introduce el reactivo fijador (en nuestro caso se utilizó formaldehído al 4%) lentamente y con baja presión por las dos ventanas, primero por la ventana redonda y después a través de la ventana oval, hasta que el fijador salga por la ventana contraria durante unos segundos.

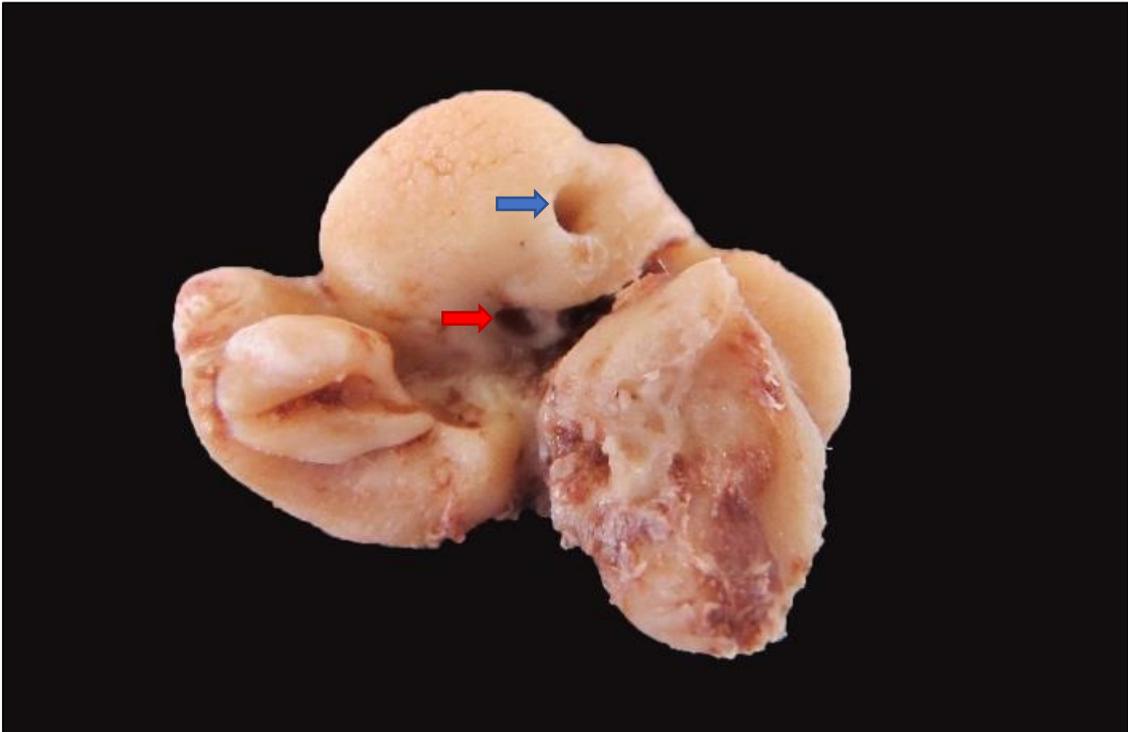


Fig. 3.3. Porción periótica del CTP en el que la flecha de color azul señala la ventana redonda y la flecha de color rojo la ventana oval.

5. Finalmente se conserva la porción periótica en un recipiente con un reactivo fijador (en el presente estudio las muestras fueron fijadas con formaldehído al 4%, a temperatura ambiente).

Los oídos de los animales necropsiados en el periodo comprendido entre 2016-2017 permanecieron en el fijador una media de 2 días, mientras que el material conservado en el banco de tejidos del IUSA permaneció inmerso en formaldehído al 4% a temperatura ambiente entre 3 y 4 años.

3.2.2 Protocolos de descalcificación

Dado que el acceso al oído interno se encuentra limitado por el componente óseo que lo rodea, es necesaria su descalcificación para su posterior estudio macroscópico y posteriormente, microscópico.

Con la finalidad de conservar la morfología y la antigenicidad del oído interno de estos cetáceos, en la presente tesis doctoral se llevaron a cabo estudios comparados de protocolos metodológicos de descalcificación con aquella finalidad.

En la Tabla 3.2 se muestra la relación de animales con sus respectivos oídos y la metodología empleada en cada caso.

Después de que los oídos se hubieran fijado en formaldehído al 4%, cada uno de ellos, de manera individual, fue depositado en un recipiente para muestras con tapa de rosca con su correspondiente descalcificador, dependiendo del protocolo elegido. Todos los recipientes conservados a temperatura ambiente permanecieron en una plataforma oscilante hasta que el tejido estuviera descalcificado (Fig. 3.4).



Fig. 3.4. Muestras en la plataforma oscilante.

Los protocolos de descalcificación incluidos fueron los siguientes:

- A. EDTA a distintas concentraciones (5%, 10% y 20%): el pH fue ajustado entre 7,2 y 7,3 con hidróxido sódico (NaOH). El líquido descalcificador fue renovado semanalmente. El EDTA fue empleado a distintas concentraciones, a temperatura ambiente y a 4°C. Un total de 20 oídos fueron procesados con este método.
 - a. EDTA a temperatura ambiente.
 - i. EDTA al 20%: (8 oídos procesados).
 - ii. EDTA al 10% (4 oídos procesados).
 - iii. EDTA al 5% (1 oído procesado).
 - b. EDTA a 4°C.
 - i. EDTA al 20% (5 oídos procesados).
 - ii. EDTA al 10% (2 oídos procesados).

- B. Ácido fórmico a dos concentraciones distintas (15% y 87%): el ácido fórmico fue diluido en formaldehído al 4%. El reactivo fue renovado semanalmente. Con este protocolo se descalcificaron un total de 7 oídos a temperatura ambiente.
 - a. AF al 15% (4 oídos procesados).
 - b. AF al 87% (3 oídos procesados).

- C. Histofix® descalcificador 3 (Marca Registrada de Panreac Química S.L.U.) está compuesto por ácido clorhídrico (HCl) al 10%. Este producto fue usado directamente en su forma comercial y al 50%. Se procesaron un total de 4 muestras con este producto a temperatura ambiente.
 - a. Histofix® descalcificador 3 (3 oídos procesados).

- b. Histofix® descalcificador 3 al 50% (3 oídos procesados).

Las muestras fueron inspeccionadas de manera periódica para comprobar su estado de descalcificación. El criterio principal de valoración fue la firmeza que presentaba el hueso. Normalmente, cuando el tejido estaba listo para ser retirado del reactivo adquiría una consistencia firme que permitía realizar el corte de este.



Fig. 3.6. Porción periótica del CTP tras ser seccionada y depositada en un casete.

Una vez descalcificada completamente el área de la porción periótica que envuelve la cóclea, se procedió a cortar las muestras con un bisturí en la superficie más dorsal, a nivel de la salida de la porción coclear del nervio vestibulococlear (Fig. 3.5).

Una vez cortado el tejido quedaba dividido en dos mitades, las cuales fueron depositadas en un casete con su identificación correspondiente (Fig. 3.6).



Fig. 3.5. Porción periótica del CTP. La línea blanca discontinua marca el área que se va a procesar. La línea roja discontinua indica el nivel al que se realiza la sección.

Tabla 3.2. Oídos incluidos en el estudio y protocolo de descalcificación correspondiente. **NE:** No evaluado.

CET/Inv.	Oído	Protocolo
CET611	Oído derecho	EDTA 10% - Tª ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 20% - Tª ambiente
CET638	Oído derecho	Histofix® descalcificador 3 50% - Tª ambiente
	Oído izquierdo	Histofix® descalcificador 3 50% - Tª ambiente
CET643	Oído derecho	AF 15% - Tª ambiente
	Oído izquierdo	AF 87% - Tª ambiente
CET734	Oído derecho	Histofix® descalcificador 3
	Oído izquierdo	Histofix® descalcificador 3

CET793	Oído derecho	Histofix [®] descalcificador 3 - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	AF 15% - T ^a ambiente
CET801	Oído derecho	Histofix [®] descalcificador 3 50% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 10% - T ^a ambiente
CET802	Oído derecho	AF 87% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	AF 87% - T ^a ambiente
CET803	Oído derecho	NE
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C
CET804	Oído derecho	EDTA 10% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 10% - 4°C
CET809	Oído derecho	EDTA 10% - 4°C
	Oído izquierdo	AF 15% - T ^a ambiente
CET810	Oído derecho	EDTA 20% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C
CET813	Oído derecho	EDTA 20% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C
CET814	Oído derecho	NE
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C
CET816	Oído derecho	EDTA 20% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 20% - T ^a ambiente
CET817	Oído derecho	EDTA 10% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	AF 15% - T ^a ambiente
I952/16	Oído derecho	EDTA 20% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C
I953/16	Oído derecho	AF 15% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 20% - T ^a ambiente
CET834	Oído derecho	EDTA 20% - T ^a ambiente
	Oído izquierdo	EDTA 5% - T ^a ambiente

En cuatro oídos pertenecientes a los animales CET611 y CET817 se siguió un procedimiento diferente. Una vez fijados los tejidos y depositados en el agente descalcificador correspondiente fueron revisados periódicamente, momento en el

que con un bisturí se retiraba el hueso hasta que la cóclea quedaba expuesta para luego depositarla en un casete con su identificación correspondiente (Fig. 3.7).

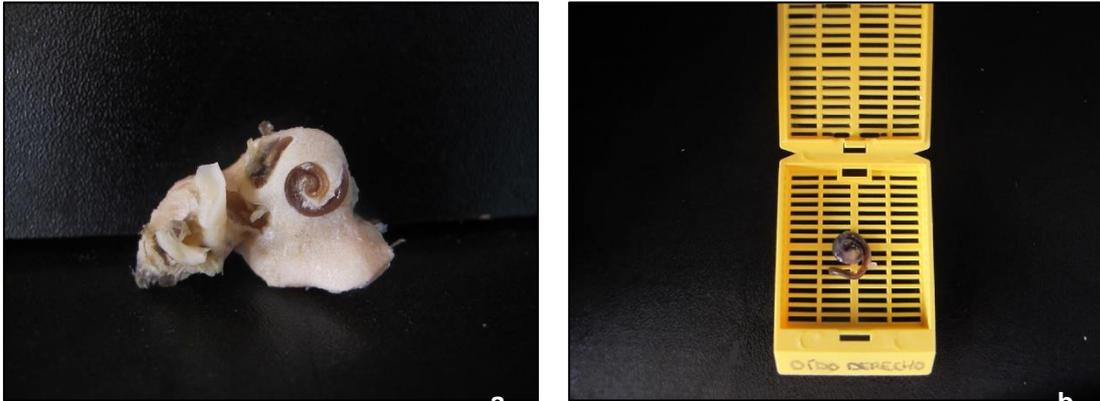


Fig. 3.7. a. Porción periótica del CTP en proceso de descalcificación retirando el hueso a medida que se descalcifica. b. La cóclea que finalmente queda expuesta se deposita en un casete.

3.2.3. Estudio histológico

Muestras incluidas en parafina

Las muestras ya descalcificadas de todos los animales, excepto los oídos procedentes de los ejemplares I952.16 (oído derecho) e I953.16 (oído izquierdo), fueron procesadas según las prácticas de rutina del laboratorio de histología y anatomía patológica del IUSA a través de un procesador automático de tejidos (Tissue embedding system TES99, Dispenser unit TES99.250, MEDITE Medizintechnik, Wollenweberstr, Burgdorf, Alemania).

Una vez las muestras fueron procesadas, se incluyeron en parafina mediante un dispensador de parafina (Leica® EG-1160, Leica Biosystems, Gmbh, Nussloch, Alemania). Posteriormente, se realizaron secciones histológicas con un microtomo (Leica® RM-2235, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania) a 3 μm tanto para las tinciones histoquímicas tiónina y violeta de cresilo, como para las técnicas inmunohistoquímicas, y un grosor de 5 μm para la tinción Hematoxilina-Eosina (HE). Dichos cortes histológicos fueron depositados en portaobjetos para su posterior tinción.

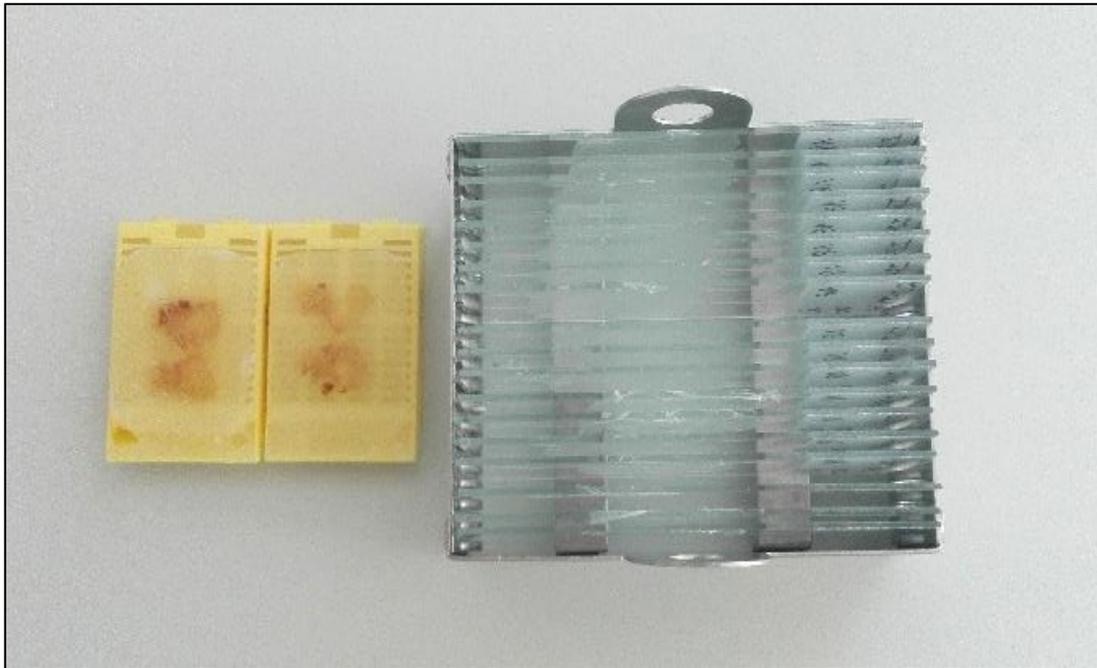


Fig. 3.8. A la izquierda muestras incluidas en parafina (bloque de parafina) y a la derecha portaobjetos con las secciones histológicas.

- a. Hematoxilina-Eosina. Al ser una técnica de rutina en el laboratorio, fue llevada a cabo por un dispositivo de tinción automático (Leica® Autostainer XL 2V3 RevC, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemania).
- b. Tionina. Para esta tinción histoquímica se siguieron los siguientes pasos:
 1. Durante 1 hora las secciones histológicas permanecieron en una solución compuesta por 50% de etanol y 50% de cloroformo (Sigma 32211).
 2. Posteriormente, se hidrataron durante 3 minutos en cada uno de los siguientes reactivos respectivamente: etanol, alcohol 96°, alcohol 90°, alcohol 80°, alcohol 70°, alcohol 50° y agua destilada.
 3. Una vez hidratadas, se sumergieron durante 10-15 minutos en tionina al 0,125%, cuya solución se preparó a partir de:

- 36 ml NaOH 1M

- 200 ml ácido acético glacial
 - 1,25 g tionina (ref. nº861340)
 - Se completa con agua bidestilada hasta completar un litro de solución.
4. Fueron deshidratadas sumergiéndolas durante unos segundos en los siguientes reactivos en el orden que se expone: alcohol 50°, alcohol 70°, alcohol 80°, alcohol 90° y alcohol 96°. A este proceso le siguieron 10 minutos en etanol y 10 minutos en xilol.
 5. Para finalizar, las muestras se montaron con el medio de montaje rápido DPX (Panreac®, Química S. A., Barcelona).
- c. Violeta de cresilo (Prophet, Mills, Arrington, y Sobin, 1992). El procedimiento fue el siguiente:
1. Se desparafinaron e hidrataron las muestras hasta llegar al etanol.
 2. Permanecieron en etanol durante 2 horas.
 3. Durante 20 minutos aproximadamente (el protocolo describe 40-60 minutos) quedaron sumergidas las muestras en la solución de trabajo de violeta de cresilo.
 4. Se diferenciaron rápidamente en alcohol 96°.
 5. Posteriormente se deshidrataron en etanol y xileno, dos cambios y dos minutos cada uno.
 6. Las muestras se montaron con el medio de montaje rápido DPX (Panreac®, Química S. A., Barcelona).

Tanto la tinción realizada con tionina como con violeta de cresilo, se utilizan para marcar la sustancia de Nissl, la cual se compone del retículo endoplasmático rugoso

y los polirribosomas que se encuentran libres en el citoplasma de la neurona (Gartner, 2017).

Muestras procesadas en criostato

Los oídos procedentes de los animales I952/16 (oído derecho) e I953/16 (oído izquierdo) fueron los únicos incluidos en esta metodología. Una vez las muestras fueron descalcificadas se lavaron con PBS (tampón fosfato salino) a pH 7,2 y sumergidas en una solución de PBS-sacarosa al 30% y azida al 0.1% a 4°C hasta que la muestra se encontrara depositada en el fondo del recipiente utilizado (método usado para crioproteger y nutrir las muestras). En un criostato clínico (Leica® CM 1950, Leica Biosystems, GmbH, Nussloch, Alemania) a -25°C se embebieron las muestras en OCT® y a continuación se obtuvieron criosecciones de 15-20 µm.

- a. Hematoxilina-Eosina. Se llevó a cabo de manera manual:
 1. Los oídos permanecieron durante 1 minuto en hematoxilina.
 2. Se enjuagaron con agua destilada.
 3. En eosina se sumergieron durante un tiempo breve de 30 segundos.
 4. Se volvieron a enjuagar con agua destilada.
 5. Montaje en medio acuoso (Immuno-Mount, Shandhon, EE. UU.).
- b. Tionina. La única diferencia con respecto a los oídos embebidos en parafina fue que, no se desparafinaron las muestras y el tiempo que permanecieron en tionina al 0,125% fue de 10 min.
- c. Violeta de cresilo. Al no tener que retirarse la parafina, el protocolo comenzó con dos pases de 2 minutos en etanol, y continuó con el segundo paso del protocolo descrito anteriormente para las muestras embebidas en parafina.

3.2.4. Estudio inmunohistoquímico

Con el objetivo de evaluar la conservación de la antigenicidad de cada tejido después de ser descalcificados, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) utilizando anticuerpos (Ac) que se habían testado previamente en sistema nervioso central en el laboratorio de Histología y Anatomía patológica del IUSA. Fue incluida la detección de calretinina, óxido nítrico sintasa neuronal y HSP70 (proteína de shock térmico). Por razones de logística solo se les realizó la técnica inmunohistoquímica a 5 oídos pertenecientes a los siguientes animales CET 734 (oído derecho e izquierdo), CET 804 (oído derecho), I952/16 (oído derecho) e I953/16 (oído izquierdo). Los reactivos utilizados se exponen a continuación.

Reactivos

A. Anticuerpos primarios

- **Anti-calretinina:** La calretinina es una proteína que liga al calcio y que normalmente se puede encontrar tanto en distintos tipos de neuronas del sistema nervioso central (SNC), como en el sistema nervioso periférico (SNP) (Rogers, 1987). Esta proteína se encuentra de manera especial en neuronas del sistema sensorial como el núcleo coclear (Rogers, 1989).

A la hora de realizar el inmunomarcaje de esta proteína, se suele encontrar más comúnmente en el cuerpo celular de las neuronas, en las dendritas principales, axones y terminales, sobre todo en los aferentes sensoriales (Résibois y Rogers, 1992).

La calretinina, la cual ha sido hallada mediante inmunomarcaje en tejido de ganglio espiral (W. Liu y Davis, 2014; Sharma, Seo, y Yi, 2018), se le ha atribuido, entre otras, una función protectora frente el daño acústico (Alvarado y cols., 2016; Sharma y cols., 2018).

- **Anti-óxido nítrico sintasa neuronal:** El óxido nítrico es un mensajero intercelular que se encuentra de manera natural en el cerebro. nNOs (del inglés “neuronal óxido nítrico synthase”) es la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa, inactiva en condiciones basales (Eliasson y cols., 1999). Esta isoforma se encuentra principalmente en neuronas cerebrales y SNP

(Masliukov y cols., 2014; Yun, Dawson, y Dawson, 1996). En lo que respecta al oído interno, se ha localizado tanto en células ciliadas del órgano de Corti como en el ganglio espiral (Fessenden, Altschuler, Seasholtz, y Schacht, 1999; Gosepath y cols., 1997; Takumida y Anniko, 2002; Wang, Tang, Zhang, Lianming, y Hua, 2005).

Se ha descrito un aumento de óxido nítrico después de un episodio de isquemia (Iadecola, 1997; Malinski, Bailey, Zhang, y Chopp, 1993), así como importancia en la formación de conexiones neuronales durante el proceso de desarrollo, en estado de lesión neuronal, regulación de neurotransmisores, migración de las neuronas y diferenciación de las mismas (Arora y cols., 2007; Tricoire y Vitalis, 2012). En lo que respecta al sistema auditivo, a la nNOs se le ha identificado como un protector de este sistema en caso de daño acústico (Alvarado y cols., 2016).

- **Anti-HSP70:** HSP70 (del inglés “heat shock protein”-HSP) pertenece a la familia de proteínas de choque térmico, de las que algunas de ellas se suelen expresar en la mayoría de las células. En condiciones normales, HSP70 aparece a unos niveles muy bajos en la mayoría de los tejidos, entre los que se encuentra el cerebro. Sin embargo, en respuesta a factores como la hipertermia, isquemia, estrés, etc., es altamente inducible (Armstrong, Plumier, Robertson, y Currie, 1996; Burel y cols., 1992; Currie y cols., 2000; Gong y Yan, 2002; Krueger, Armstrong, Plumier, Robertson, y Currie, 1999; Manzerra, Rush, y Brown, 1997). Esta familia de proteínas existe en el oído interno, y HSP70 se ha encontrado entre otras estructuras, en el ganglio espiral (Fairfield, Kanicki, Lomax, y Altschuler, 2002; Gong y Yan, 2002; Gower y Thompson, 1997; Mikuriya y cols., 2008; Neely, Thompson, y Gower, 1991).

En cuanto al inmunomarcaje, se ha descrito como HSP70 se ha expresado en el citoplasma de células del ganglio espiral de conejillos de indias antes de someterlas a un tratamiento de hipertermia, y en el núcleo después de dicho tratamiento (Akizuki y cols., 1995).

Entre las funciones asignadas a HSP70, podemos encontrar la de la protección del oído frente al daño ocasionado por una exposición acústica, fármacos que producen ototoxicidad o hipertermia (Altschuler y cols., 2002;

Fairfield y cols., 2005; Gong y Yan, 2002; Oh y cols., 2000; Sugahara y cols., 2003; Yoshida, Kristiansen, y Liberman, 1999).

B. Anticuerpos secundarios

- Anti-IgG de ratón biotinado desarrollado en caballo (Abcam, Ab6535).
- Anti-IgG de conejo biotinado desarrollado en cabra (Biotechnology, sc-52).

C. Anticuerpo terciario

- Complejo avidina-biotina (VECTSTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (Peroxidasa, Standard) Vector, PK-6100).

D. Sueros no inmunes

- Suero normal de caballo (Vector, S-2000).
- Suero normal de cabra (Dako, S-1000).

E. Cromógeno

- 3-amino-9-etilcarbazol (AEC Peroxidase (HRP) Substrate Kit, Vector, SK 4200).

F. Solución tampón

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2.

En la Tabla 3.3 se resume los procedimientos utilizados según el anticuerpo primario utilizado.

Tabla 3.3. Relación de los anticuerpos primarios utilizados con detalle de su clonalidad, dilución y pretratamiento utilizado, así como el anticuerpo secundario correspondiente.

Anticuerpo primario	Clonalidad	Dilución	Pretratamiento	Anticuerpo secundario
Anti-HSP70	Monoclonal	1:100	Citrato	Caballo anti-ratón
Anti-nNOs	Policlonal	1:300	Sin Pretratamiento	Cabra anti-conejo
Anti-Calretinina	Monoclonal	1:100	Sin Pretratamiento	Caballo anti-ratón

Preparación de las muestras

Las muestras cortadas en microtomo presentaron un grosor de 3 μm y fueron depositadas en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma® Chemical Company, St. Louis MO, EE. UU.) al 10%, o Vectabond™ (Vector® Laboratories Ltd., Burlingame, CA) con el objetivo que durante la elaboración de la IHQ el tejido no se desprendiera. Por otro lado, los oídos procesados en el criostato clínico fueron cortadas con un grosor de 15-20 μm y montadas en portaobjetos Superfrost plus™ (Thermo Scientific™ J1800AMNZ).

Desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas

Para la elaboración de las técnicas inmunohistoquímicas se siguió el método de Hsu y cols. (1981) con modificaciones, consta de los siguientes pasos:

A. Muestras embebidas en parafina

1. Desparafinado realizando tres baños en xilol, 10 minutos cada uno;
2. Se comenzó la rehidratación con un pase en etanol;
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena mediante una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, en agitación durante 30 minutos;

4. Continuación de la rehidratación en pases de 8 minutos consecutivos en etanol, alcohol de 96° y 70°, así como dos baños en agua destilada de 5 minutos cada uno;
5. Lavado en PBS durante 5 minutos en agitación;
6. Desenmascaramiento antigénico, a través de un pretratamiento térmico mediante baño en citrato (pH6) a 90-95°C durante 10 minutos;
7. Se realizó un lavado en agua destilada durante 5 minutos y dos en PBS de 5 minutos cada uno;
8. Incubación en cámara húmeda con el suero normal correspondiente al 10% en PBS durante 1 hora y 30 min a T^a ambiente;
9. Tras retirar el exceso de suero normal, se incubó el anticuerpo primario (a la concentración que correspondiese) en PBS y suero normal correspondiente al 10% durante toda la noche a 4°C;
10. Las muestras permanecieron durante 1 hora a temperatura ambiente;
11. Tres lavados de PBS de 10 minutos cada uno;
12. Incubación del anticuerpo secundario 1-200 de concentración en PBS y suero normal al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente;
13. Se lavaron las secciones tres veces en PBS durante 10 minutos cada vez;
14. Incubación en oscuridad durante una hora en el complejo avidina-biotina (VECTSTAIN[®] Elite[®] ABC-HRP Kit (Peroxidasa, Standard) Vector, PK-6100);
15. Dos lavados de PBS durante 10 minutos cada uno y un lavado de 10 minutos en agua destilada;
16. Revelado mediante inmersión en el kit mencionado anteriormente (AEC) durante 10-30 minutos;

17. Tres lavados en agua destilada de 10 minutos cada uno;
18. Contraintinción con hematoxilina de Mayer durante 1-5 min;
19. Lavado en agua corriente durante 10 minutos;
20. Lavado en agua destilada durante 2 minutos;
21. Montaje en medio acuoso VECTASHIELD® (Immuno-Mount, Shandhon, EE. UU.).

B. Criosecciones

1. Tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno;
2. Bloqueo de la peroxidasa endógena en una solución de agua oxigenada al 1% en PBS a T^a ambiente durante 30 minutos;
3. Seis lavados de 5 minutos cada uno en PBS;
4. Incubación durante 2 horas en el suero normal correspondiente al 10% y Tritón X-100 al 0,5% en PBS;
5. Tras retirar el exceso de suero normal, se incubó el anticuerpo primario (a la concentración que correspondiese), suero normal correspondiente al 1% y Tritón X-100 al 0,5% en PBS durante dos noches a 4°C;
6. Una hora a T^a ambiente;
7. Los tejidos se lavaron tres veces durante 10 minutos cada uno en PBS;
8. Durante 2 horas se incubó en el anticuerpo secundario correspondiente a una concentración de 1-200 junto con Tritón X-100 al 0,3% y suero normal al 1% en PBS;
9. Tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno;

10. Durante una hora en oscuridad se incubó en el complejo avidina-biotina (VECTSTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (Peroxidasa, Standard) Vector, PK-6100);
11. Se lavaron las muestras 3 veces en PBS, 10 minutos cada lavado;
12. Revelado mediante inmersión en el kit AEC durante 10-30 minutos;
13. Se realizaron 3 lavados en agua destilada, 5 minutos cada uno;
14. Contraintinción con hematoxilina de Mayer durante 2 minutos;
15. Tres lavados de 10 minutos en agua destilada;
16. Montaje en medio acuoso VECTASHIELD® (Immuno-Mount, Shandhon, EE. UU.).

3.2.5. Criterios de valoración para los distintos protocolos de descalcificación

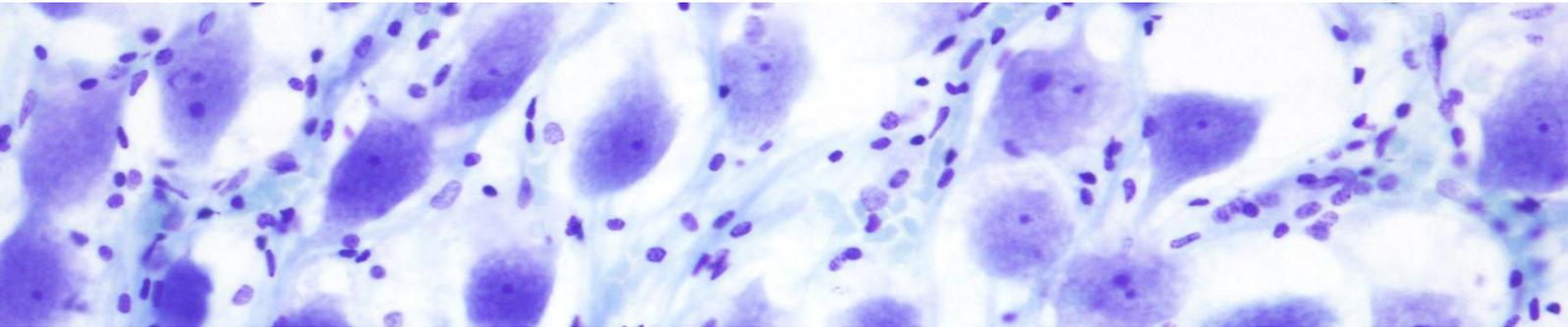
Cada protocolo usado en esta tesis doctoral ha sido valorado individualmente con el objetivo de conseguir el protocolo definitivo, que muestre ventajas tanto de manejo como de resultados histológicos e inmunohistológicos. Los patrones o criterios valorados fueron los siguientes:

- A. Tiempo de descalcificación: se contabilizó en días el tiempo total que permanecieron las muestras en cada descalcificador.
- B. Conservación de la morfología macroscópica: se valoró la integridad de la muestra durante y una vez acabado el proceso de descalcificación. También se tuvo en cuenta la facilidad con la que se realizaban los cortes con el bisturí una vez descalcificados los oídos. Este paso es importante para su posterior procesado y montaje de bloques de parafina o la obtención de criosecciones.
- C. Conservación de la morfología tisular: se calificó las secciones histológicas de cada protocolo de descalcificación según la calidad que mostraran para las tinciones con HE, tionina y violeta de cresilo.

- D. Preservación de la antigenicidad: mediante técnicas inmunohistoquímicas se evaluó la calidad con la que las secciones respondían antigénicamente según el descalcificador empleado.

Para los tres últimos parámetros se usaron cinco calificadores de valoración según el resultado obtenido: muy pobre, pobre, aceptable, buena o muy buena.

4. Resultados



4.1. Tiempo de descalcificación

4.1.1. Resultados grupales

El tiempo de descalcificación se contabilizó para un total de 33 muestras en lugar de las 34 mencionadas, en la sección “material y métodos”, debido a cuestiones técnicas. Nueve protocolos fueron llevados a cabo, los cuales están expuestos en la Tabla 4.1, además de la media de tiempo que necesitó cada uno de ellos para descalcificar el tejido óseo.

Tabla 4.1. Relación de protocolos, número de muestras incluidas y la media de tiempo de descalcificación de cada uno de ellos.

Protocolo	Número de muestras	Media tiempo de descalcificación (días)
EDTA 20% - T ^a ambiente	8	55
EDTA 20% - 4°C	5	84
EDTA 10% - T ^a ambiente	4	28
EDTA 10% - 4°C	2	39
EDTA 5% - T ^a ambiente	1	214
AF 87% - T ^a ambiente	3	32
AF 15% - T ^a ambiente	4	26
Histofix [®] descalcificador 3 - T ^a ambiente	3	2
Histofix [®] descalcificador 3 50% - T ^a ambiente	3	6

En rangos generales, la muestra procesada con EDTA al 5% a T^a ambiente (Ta) fue la que más tiempo llevó en descalcificarse con un total de 214 días, y las muestras procesadas con Histofix[®] descalcificador 3 a Ta ambiente se descalcificaron en una media de 2 días.

Los demás protocolos utilizados a Ta, salvo el llevado a cabo con EDTA al 20% (media de 55 días de duración), mostraron una media de tiempo necesaria para la descalcificación similar.

En cuanto a las comparaciones de los protocolos de EDTA al 10 y 20% a Ta y en refrigeración a 4°C, los oídos descalcificados en frío requirieron un mayor número de días para culminar el proceso de descalcificación.

Salvo en el caso de las muestras descalcificadas con Histofix® descalcificador 3 e Histofix® descalcificador 3 al 50%, se puede observar en la Tabla 4.1, como en todos los protocolos de descalcificación al aumentar la concentración del descalcificador, aumenta la media de número de días necesarios para completar el procedimiento.

En la tabla anterior (Tabla 4.1) se observa como dentro de los protocolos llevados a cabo con EDTA, el que más tiempo llevó fue el de menor concentración (214 días), seguido por los concentrados al 20% a 4°C y Ta (84 y 55 días respectivamente), y, por último, los basados en EDTA al 10% a 4°C y Ta (39 y 28 días correspondientemente).

Con lo que respecta al ácido fórmico, la media de días total de descalcificación fue mayor para el protocolo llevado a cabo a mayor concentración (32 días) frente al de menor concentración (26 días).

Por último, el protocolo basado en Histofix® descalcificador 3 tardó menos tiempo de media en descalcificar totalmente la muestra (2 días), que el mismo a la mitad de concentración (6 días).

4.1.2. Resultados individuales

En algunos casos en concreto se pudieron hacer comparaciones de protocolos dentro del mismo individuo (Tabla 4.2) para que, de este modo, se encontraran en las mismas condiciones de conservación y tamaño del animal.

Tabla 4.2. Relación individual de cada espécimen, protocolo de descalcificación y tiempo total del procedimiento.

CET/Inv.	Oído	Protocolo	Tiempo de descalcificación (días)
CET611	Oído derecho	EDTA 10% - T ^a ambiente	25
	Oído izquierdo	EDTA 20% - T ^a ambiente	18
CET643	Oído derecho	AF 15% - T ^a ambiente	23
	Oído izquierdo	AF 87% - T ^a ambiente	
CET734	Oído derecho	Histofix [®] descalcificador 3 - T ^a ambiente	2

	Oído izquierdo		
CET793	Oído derecho	Histofix® descalcificador 3 - Tª ambiente	2
	Oído izquierdo	AF 15% - Tª ambiente	7
CET801	Oído derecho	Histofix® descalcificador 3 50% - Tª ambiente	1
	Oído izquierdo	EDTA 10% - Tª ambiente	33
CET804	Oído derecho	EDTA 10% - Tª ambiente	28
	Oído izquierdo	EDTA 10% - 4°C	36
CET809	Oído derecho	EDTA 10% - 4°C	49
	Oído izquierdo	AF 15% - Tª ambiente	50
CET810	Oído derecho	EDTA 20% - Tª ambiente	99
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C	60
CET813	Oído derecho	EDTA 20% - Tª ambiente	20
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C	133
CET817	Oído derecho	EDTA 10% - Tª ambiente	27
	Oído izquierdo	AF 15% - Tª ambiente	24
1952.16	Oído derecho	EDTA 20% - Tª ambiente	31
	Oído izquierdo	EDTA 20% - 4°C	86
CET834	Oído derecho	EDTA 20% - Tª ambiente	75
	Oído izquierdo	EDTA 5% - Tª ambiente	214

Excepto en el caso del animal CET643, en el resto de los ejemplares que se utilizó el mismo agente descalcificador, pero con distinta concentración, el oído procesado con una concentración mayor logró ser descalcificado en menos tiempo que el otro oído.

En el momento que se examinó el estado de descalcificación del animal CET643, el día 23 después de haber iniciado ambos oídos el proceso de descalcificación se comprobó que el oído izquierdo había quedado destruido y no fue posible tomar ningún tipo de muestra.

En el caso del espécimen CET834, la muestra procesada con EDTA al 5% tardó casi tres veces más que el oído descalcificado con EDTA al 20% (ambos a temperatura ambiente).

Los tejidos descalcificados con Histofix® descalcificador 3 e Histofix® descalcificador 3 al 50% tardaron menos tiempo en ser procesados que los procesados con AF al 15% y con EDTA al 10% a Ta.

En dos animales se comparó el ácido fórmico al 15% a Ta con EDTA al 10% a Ta y a 4°C. El oído del animal CET809 descalcificado con AF al 15%, llevó un día más de proceso que el tratado con EDTA al 10% a 4°C. Sin embargo, en el espécimen CET817, el oído descalcificado con AF al 15% tardó tres días menos que el otro oído procesado con EDTA al 10% a Ta.

Se comparó el factor de la temperatura en el proceso de la descalcificación en cuatro ejemplares, y solamente en uno de ellos el permanecer en frío favoreció el tiempo total para conseguir la descalcificación (CET810).

4.2. Conservación de la morfología macroscópica

Todas las muestras procesadas con Histofix® descalcificador 3 e Histofix® descalcificador 3 al 50% a Ta mostraron una conservación morfológica muy buena y ofrecieron una gran facilidad al corte.

En cuanto a los protocolos que incluyeron los agentes descalcificadores EDTA al 5, 10 y 20% a Ta, mostraron una buena conservación morfológica y facilidad al corte.

Este no fue el caso de los oídos sometidos a descalcificación con EDTA al 10 y 20% a 4°C, y con ácido fórmico al 15 y 87% a Ta, ya que su conservación morfológica fue pobre para las primeras y muy pobre para los oídos descalcificados en ácido fórmico. En algunas ocasiones, como es el caso de las muestras procesadas con ácido fórmico al 87%, este hecho impidió tomar tejido suficiente para su posterior observación microscópica (Fig. 4.1).

En los casos en los que el hueso fue retirado paulatinamente con el bisturí a medida que se descalcificaba el tejido (CET611 y CET817), se consideró no valorar su conservación macroscópica.

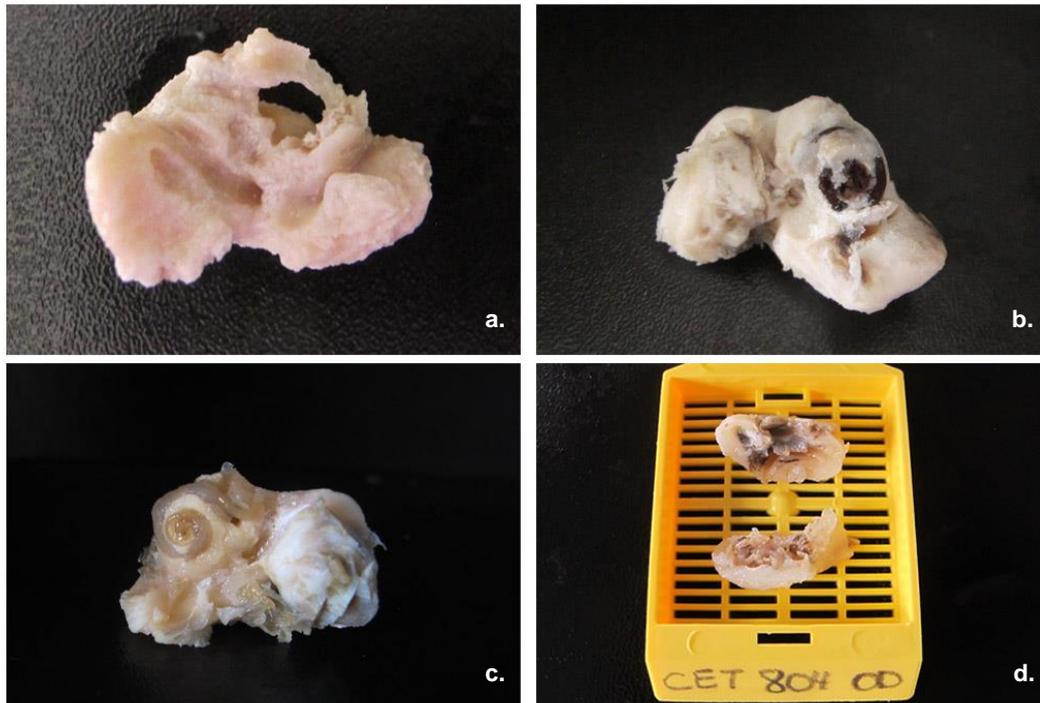


Fig. 4.1. a. Se observa la porción periótica del CTP del oído izquierdo perteneciente al animal CET802, cuyo tejido óseo aparece destruido casi en su totalidad. b. y c. Visualización de dos porciones perióticas del CTP de los animales CET817 (oído izquierdo) y CET 611 (oído derecho) a los cuales se les retiró el hueso a medida que se descalcificaban. d. Oído derecho del animal CET804 después de ser descalcificado y muestreado.

4.3. Conservación de la morfología tisular

Por razones técnicas sólo se les realizó técnicas histoquímicas a 21 oídos (Tabla 4.3). Aunque no existe registro del tiempo de descalcificación del oído derecho del animal I953.16, se le realizaron las técnicas histoquímicas mencionadas anteriormente, por lo que ha sido incluido en esta sección.

Tabla 4.3. Relación de animales, protocolo utilizado y existencia o no de técnicas histológicas. **M-N:** tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la realización de la necropsia; **EC:** estado de conservación del animal cuando que se le realiza la necropsia; **OD:** oído derecho; **OI:** oído izquierdo; **NE:** no evaluado.

CET	M-N	EC	Observaciones	Oído	Protocolo	Histología
CET611	49	Fresco	Congelado	OD	EDTA 10% - Tª ambiente	Si
				OI	EDTA 20% - Tª ambiente	Si
CET638	69	Autolisis moderada	Congelado	OD	Histofix® descalcificador 3 50% - Tª ambiente	NE
				OI	Histofix® descalcificador 3 50% - Tª ambiente	NE
CET643	1	Autolisis moderada	No	OD	AF 15% - Tª ambiente	NE
				OI	AF 87% - Tª ambiente	NE
CET734	0	Fresco	No	OD	Histofix® descalcificador 3	Si
				OI	Histofix® descalcificador 3	Si
CET793	38	Fresco	Congelado	OD	Histofix® descalcificador 3 - Tª ambiente	Si
				OI	AF 15% - Tª ambiente	Si
CET801	6	Autolisis avanzada	Congelado	OD	Histofix® descalcificador 3 50% - Tª ambiente	Si
				OI	EDTA 10% - Tª ambiente	Si
CET802	14	Autolisis moderada	Congelado	OD	AF 87% - Tª ambiente	NE
				OI	AF 87% - Tª ambiente	NE
CET803	1	Fresco	No	OD	No	NE
				OI	EDTA 20% - 4°C	NE
CET804	2	Autolisis moderada	Refrigerado	OD	EDTA 10% - Tª ambiente	Si
				OI	EDTA 10% - 4°C	Si
CET809	1	Fresco	Refrigerado	OD	EDTA 10% - 4°C	Si
				OI	AF 15% - Tª ambiente	Si
CET810	88	Fresco	Congelado	OD	EDTA 20% - Tª ambiente	NE
				OI	EDTA 20% - 4°C	NE
CET813	112	Autolisis muy avanzada	Congelado	OD	EDTA 20% - Tª ambiente	Si
				OI	EDTA 20% - 4°C	Si

CET814	74	Fresco	Congelado	OD	No	NE
				OI	EDTA 20% - 4°C	NE
CET816	59	Autolisis moderada	Congelado	OD	EDTA 20% - Tª ambiente	NE
				OI	EDTA 20% - Tª ambiente	NE
CET817	0	Autolisis avanzada	No	OD	EDTA 10% - Tª ambiente	Si
				OI	AF 15% - Tª ambiente	Si
I952/16	0	Muy fresco	No	OD	EDTA 20% - Tª ambiente	NE
				OI	EDTA 20% - 4°C	Si
I953/16	0	Muy fresco	No	OD	AF 15% - Tª ambiente	Si
				OI	EDTA 20% - Tª ambiente	Si
CET834	13	Autolisis moderada	Congelado	OD	EDTA 20% - Tª ambiente	Si
				OI	EDTA 5% - Tª ambiente	Si

Las muestras recogidas en la tabla anterior (Tabla 4.3), fueron sometidas a tres tinciones histológicas: HE, tionina y violeta de cresilo. En algunas ocasiones, como en el caso del oído izquierdo del animal CET793, no se le pudieron realizar todas las técnicas anteriormente nombradas debido a escasez de tejido.

En este criterio de evaluación entra una nueva variable, ya que dos muestras (oído derecho del animal I952/16 y oído izquierdo del ejemplar I 953/16) fueron cortadas en frío (criostato) en lugar de ser embebidos en parafina y cortados al microtomo como el resto de los tejidos descalcificados.

4.3.1. Resultados generales

En la Tabla 4.4 se recogen las valoraciones adjudicadas a cada protocolo. Se puede observar como un protocolo en algunos casos mostró resultados de buena calidad y en otros, sin embargo, una calidad muy pobre, como es el caso de los oídos descalcificados con EDTA al 10% a temperatura ambiente y embebidos en parafina.

Tabla 4.4. Valoración de las técnicas histoquímicas empleadas en rangos generales según el protocolo de descalcificación utilizado. **HE:** Hematoxilina-eosina; **VC:** violeta de cresilo; **NE:** no evaluado.

Protocolo	HE	Tionina/VC
EDTA 20% - T^a ambiente - Parafina	Muy pobre-aceptable	Muy pobre-pobre/pobre-aceptable
EDTA 20% - T^a ambiente - Criostato	Muy buena	Muy buena/muy buena
EDTA 20% - 4°C - Parafina	Buena-muy buena	NE/pobre
EDTA 20% - 4°C - Criostato	Muy buena	Muy buena/muy buena
EDTA 10% - T^a ambiente - Parafina	Muy pobre-buena	Muy pobre-muy buena/pobre-muy buena
EDTA 10% - 4°C - Parafina	Buena-muy buena	Aceptable-muy buena/buena-muy buena
AF 15% - T^a ambiente - Parafina	Muy pobre-buena	Muy pobre-buena/pobre
Histofix® descalcificador 3 - T^a ambiente - Parafina	Pobre-aceptable	Muy pobre/muy pobre
Histofix® descalcificador 3® 50% - T^a ambiente - Parafina	Pobre	Muy pobre/pobre

Dado este contraste de valoraciones al estudiar dicha valoración de manera general, en el apartado siguiente se estudiarán los resultados obtenidos en cada animal de manera individual.

4.3.2. Resultados individuales

Hematoxilina-eosina

- CET611
 - Oído derecho (EDTA 10% - Ta - Parafina): presentó escasa cantidad de ganglio espiral, mostrando una marcada acidofilia generalizada en dicha estructura. Se visualizaron los cuerpos neuronales con aparente pérdida de su morfología, algunas células gliales satélite (CGS) y en ocasiones, los núcleos y nucléolos neuronales. En la Fig. 4.2 a y b se puede observar la mínima presencia del GE, así como la ausencia de uniformidad en su morfología y la pobre apreciación de los cuerpos neuronales. Debido a una calidad muy pobre de tinción, no se pueden apreciar en las fotos estructuras como núcleos y nucléolos neuronales.
 - Oído izquierdo (EDTA 20% - Ta - Parafina): en este oído tampoco se logró muestrear una cantidad aceptable de GE, siendo su tinción de calidad pobre y con predominancia eosinófila. Se pudieron observar los cuerpos y núcleos neuronales, así como escasos nucléolos neuronales y CGS. En esta ocasión, en la figura correspondiente (Fig. 4.2 c y d), además de los cuerpos neuronales se visualizan también, en algunas ocasiones, los núcleos presentes en los mismos.

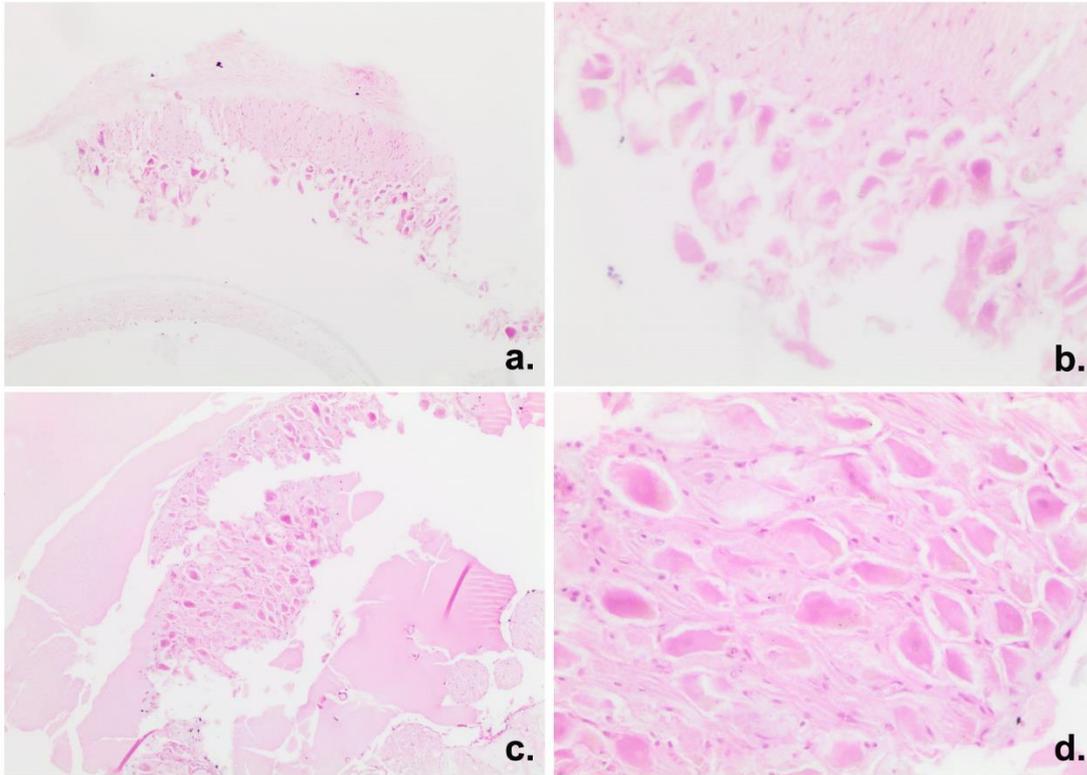


Fig. 4.2. CET611; oído derecho (a-b) y oído izquierdo (c-d). Tinción HE; a. 10x; b. 40x; c. 10x; d. 40x.

- CET734
 - Oído derecho e izquierdo (Histofix® descalcificador 3 - Ta - Parafina): dado que los dos oídos fueron procesados de la misma manera y arrojaron resultados muy similares, se han valorado en conjunto. El GE mostró una calidad de tinción aceptable y un alto grado de eosinofilia generalizada con fácil reconocimiento de las siguientes estructuras: cuerpos y núcleos neuronales, algunos nucléolos, así como CGS. En las células gliales satélite se observaron con leve grado de basofilia. En la Fig. 4.3, aparte de una visualización general de la cóclea a pocos aumentos (4.3 a y c), se aprecian las estructuras propias del GE mencionadas anteriormente.

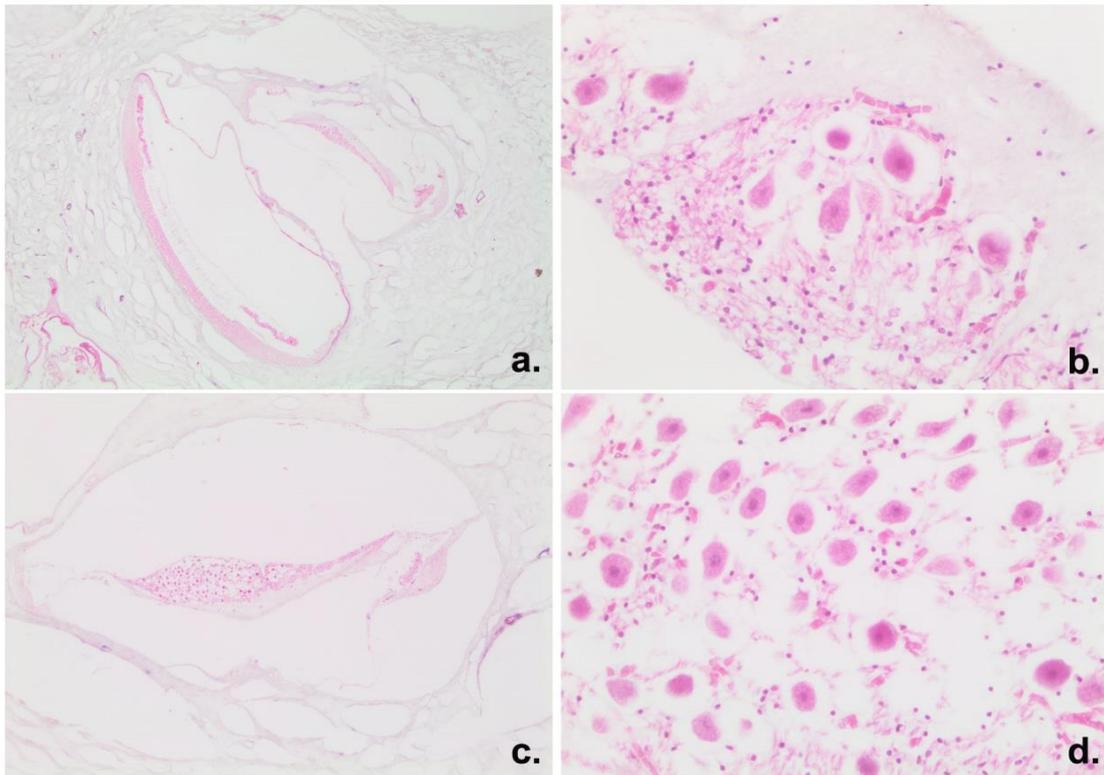


Fig. 4.3. CET734; oído derecho (a-b) y oído izquierdo (c-d). Tinción HE; a. 2x; b. 40x; c. 4x; d. 40x.

- CET793
 - Oído derecho (Histofix® descalcificador 3 - Ta - Parafina): la tinción acidófila predominó de forma marcada y extendida por todo el GE, con una calidad pobre, pudiéndose observar los cuerpos y núcleos neuronales, así como las CGS. Los nucléolos neuronales solo se observaron en algunas de las células ganglionares. En las imágenes adjuntas disponemos tanto de una visión a menos aumentos de la cóclea, donde se aprecia el GE en tres ocasiones debido al corte realizado en este oído (Fig. 4.4 a), como una imagen a más aumentos del GE, donde se aprecia lo descrito anteriormente (Fig. 4.4 b).
 - Oído izquierdo (AF 15% - Ta - Parafina): las estructuras con más afinidad por la tinción basófila como los núcleos y nucléolos neuronales y CGS mostraron una notoria basofilia. La arquitectura del GE fue fácilmente reconocible (cuerpos, núcleo y nucléolos neuronales, y CGS) (Fig. 4.4 c y d), mostrando una buena calidad de tinción.

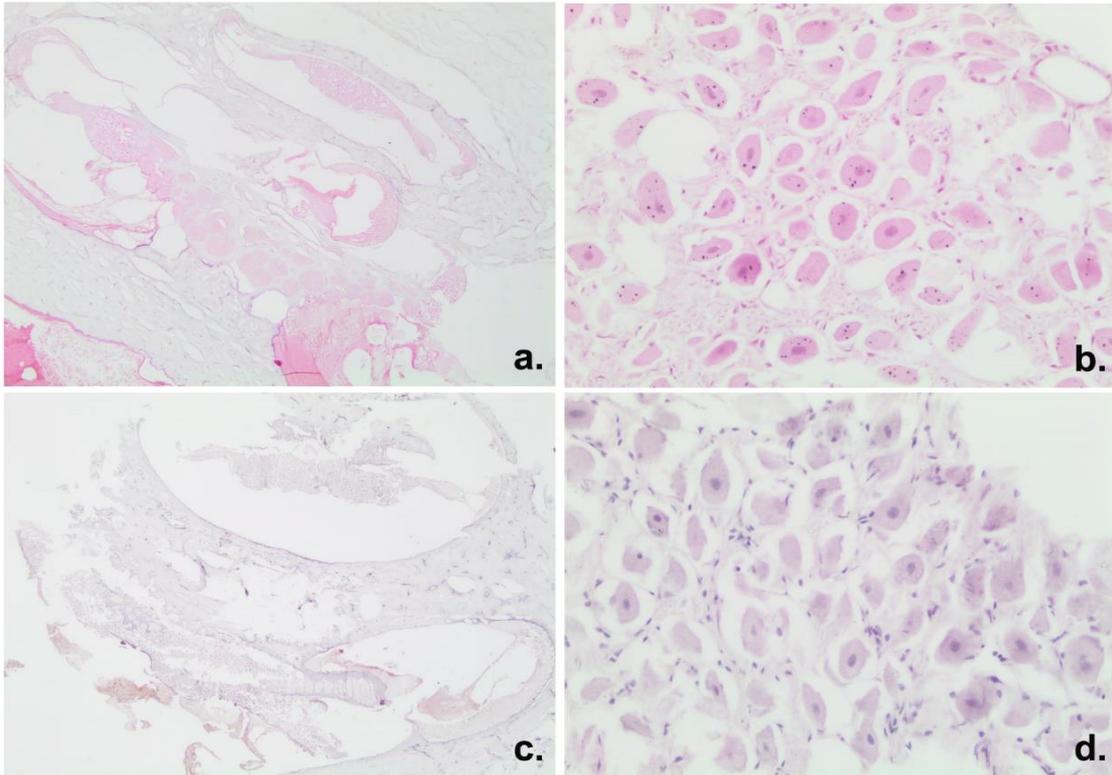


Fig. 4.4. CET793; oído derecho (a-b) y oído izquierdo (c-d). Tinción HE; a. 2x; b. 40x; c. 2x; d. 40x.

- CET801
 - Oído derecho (Histofix® descalcificador 3 50% - Ta - Parafina): cómo se puede observar en la Fig. 4.5 a y b, el GE reveló una coloración acidófila generalizada, de calidad pobre. Solamente las CGS mostraron un leve grado basófilo. Se pudieron reconocer las siguientes estructuras del GE: cuerpos neuronales, núcleos neuronales y CGS.
 - Oído izquierdo (EDTA 10% - Ta - Parafina): en este oído, a diferencia del oído derecho, la basofilia fue más notable y con una buena calidad de tinción (Fig. 4.5 c). Este hecho se ve reflejado en estructuras como las CGS y los núcleos y nucléolos neuronales, las cuales se pueden apreciar en la Fig. 4.5 d.

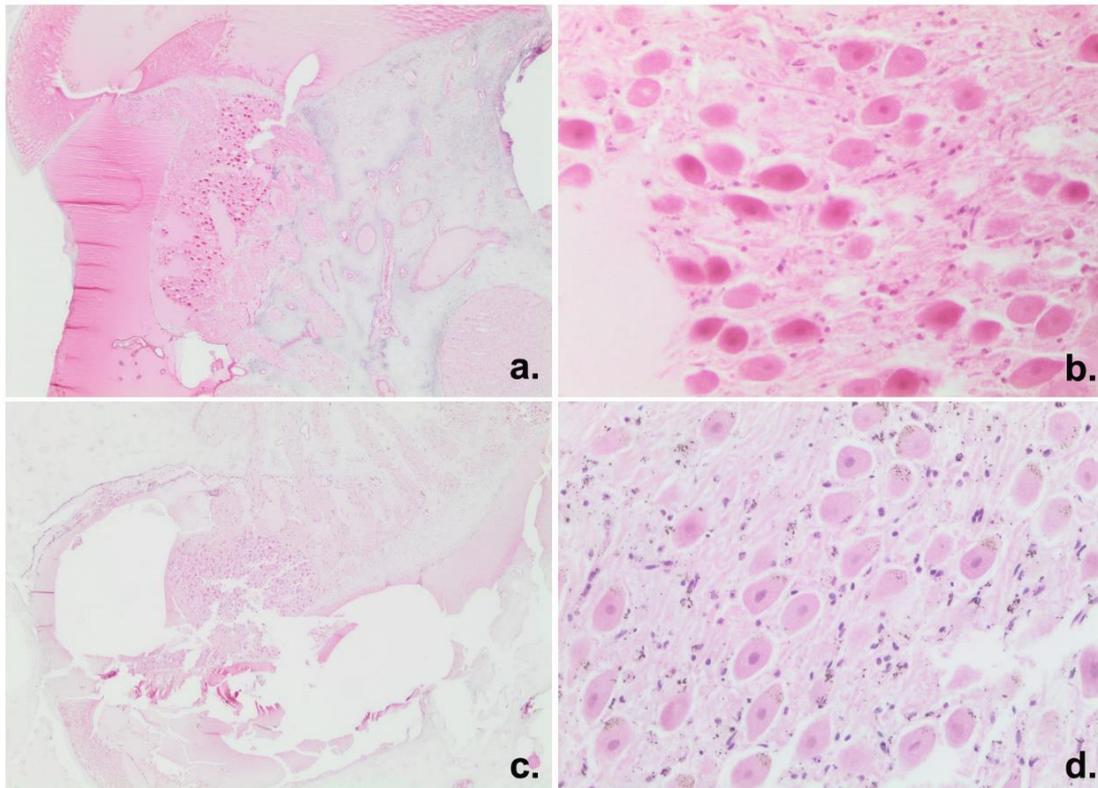


Fig. 4.5. CET801; oído derecho (a-b) y oído izquierdo (c-d). Tinción HE; a. 4x; b. 40x; c. 2x; d. 40x.

- CET804
 - Oído derecho (EDTA 10% - Ta - Parafina): en la Fig. 4.6 a y b se evidencia como en este oído a través de la tinción HE, se apreciaron las distintas estructuras del GE: cuerpos neuronales, núcleos y nucléolos correspondientes, así como CGS. Todas estas estructuras descritas mostraron una afinidad basófila de calidad buena.
 - Oído izquierdo (EDTA 10% - 4°C - Parafina): las observaciones llevadas a cabo en este oído se corresponden con las descritas para el oído derecho, aunque el grado de basofilia fue levemente mayor, como se evidencia en la Fig. 4.6 c y d.

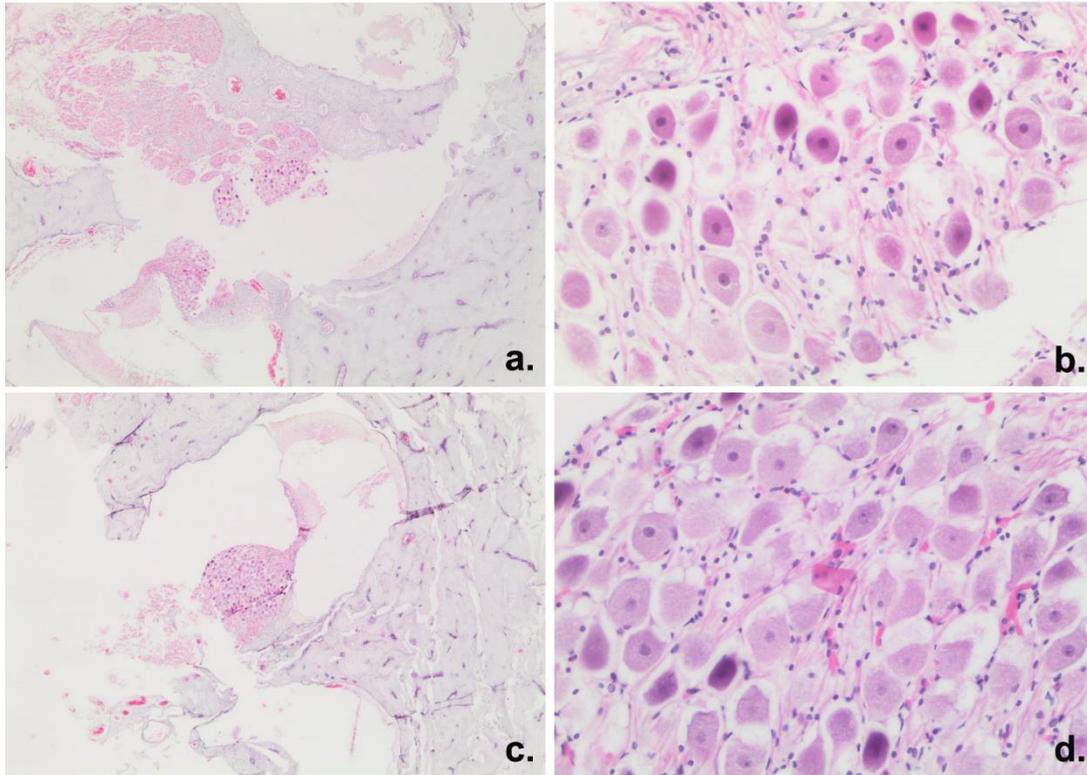


Fig. 4.6. CET804; oído derecho (a-b) y oído izquierdo (c-d). Tinción HE; a. 4x; b. 40x; c. 4x; d. 40x.

- CET809

- Oído derecho (EDTA 10% - 4°C - Parafina): estructuras como núcleos y nucléolos neuronales, así como CGS mostraron una muy buena

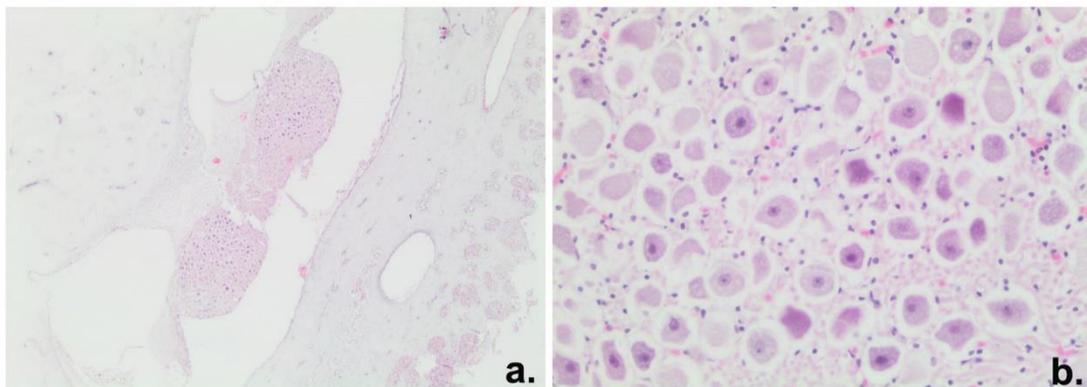


Fig. 4.7. CET809. Tinción HE; a. 4x; b. 40x.

tinción basófila (Fig. 4.7). Además de las estructuras nombradas, también se reconocieron con facilidad los cuerpos neuronales de las células ganglionares.

- Oído izquierdo (AF 15% - Ta - Parafina): En este oído no fue posible muestrear el ganglio espiral, ya que no se pudo localizar en ninguna sección histológica.
- CET813
 - Oído derecho (EDTA 20% - Ta - Parafina): la tinción de este oído resultó muy pobre, y con un alto grado de acidofilia, solo pudiendo identificarse los cuerpos neuronales de las células ganglionares (Fig. 4.8 a y b).
 - Oído izquierdo (EDTA 20% - 4°C - Parafina): la cantidad que se pudo muestrear de GE para este animal fue muy pequeña, como se puede ver en la Fig. 4.8 c y d. En el oído derecho, al igual que en el izquierdo, la coloración se presentó de manera muy pobre y con una marcada acidofilia generalizada, aunque levemente más basófila. Solamente fue posible identificar los cuerpos neuronales y en ocasiones, CGS y núcleos neuronales (Fig. 4.8 d).

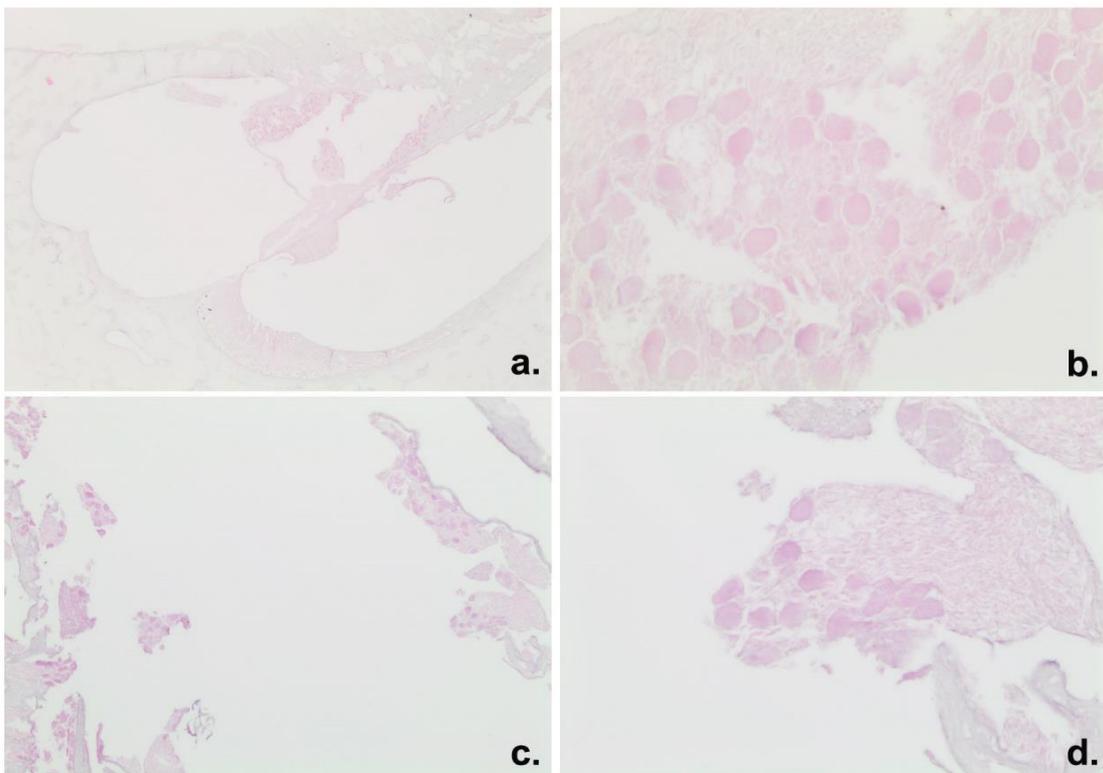


Fig. 4.8. CET813; oído derecho (a-b) y oído izquierdo (c-d). Tinción HE; a. 4x; b. 40x; c. 10x; d. 40x.

- CET817
 - Oído derecho (EDTA 10% - Ta - Parafina): en las secciones inspeccionadas de este animal se observó, muy sutilmente, una presencia muy escasa de GE, el cual aparecía con un alto grado de eosinofilia distribuida de manera general, y una calidad muy pobre. Se identificaron algunos cuerpos neuronales y algunas CGS, las cuales reflejaban una ligera tinción basófila (Fig. 4.9 a).
 - Oído izquierdo (AF 15% - Ta - Parafina): el GE se tiñó de forma generalizada en un alto grado de acidofilia, muy débil y de una calidad muy pobre. Se diferenciaron sutilmente algunos cuerpos neuronales de las células ganglionares y CGS (Fig. 4.9 b).

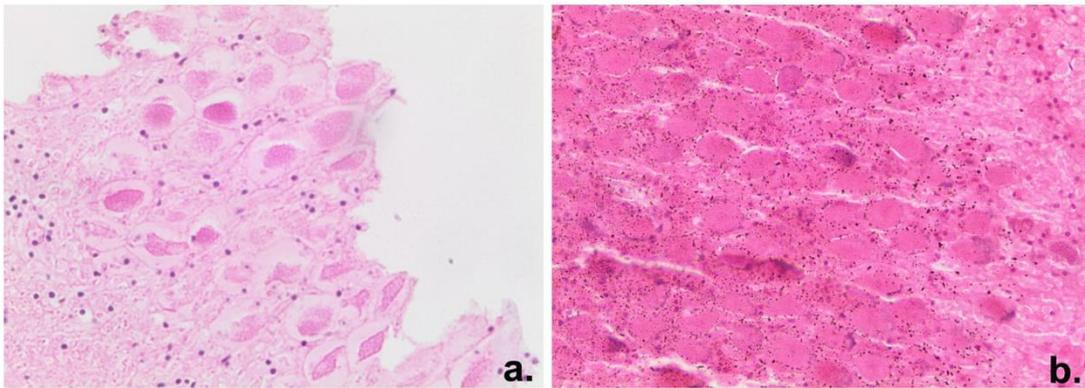


Fig. 4.9. CET817; oído derecho (a) y oído izquierdo (b). Tinción HE; a. 40x; b. 40x.

- I952/16
 - Oído derecho (EDTA 20% - Ta - Criostato): la tinción de HE del GE de este oído fue muy buena, mostrando alta afinidad basófila en estructuras como CGS, núcleos neuronales y sus nucléolos. La arquitectura de dicho ganglio nervioso fue fácilmente reconocible, identificando las estructuras anteriormente mencionadas, además de los cuerpos neuronales de las células ganglionares (Fig. 4.10 b). En la Fig. 4.10 a, podemos ver el GE en una posición central a pocos aumentos.

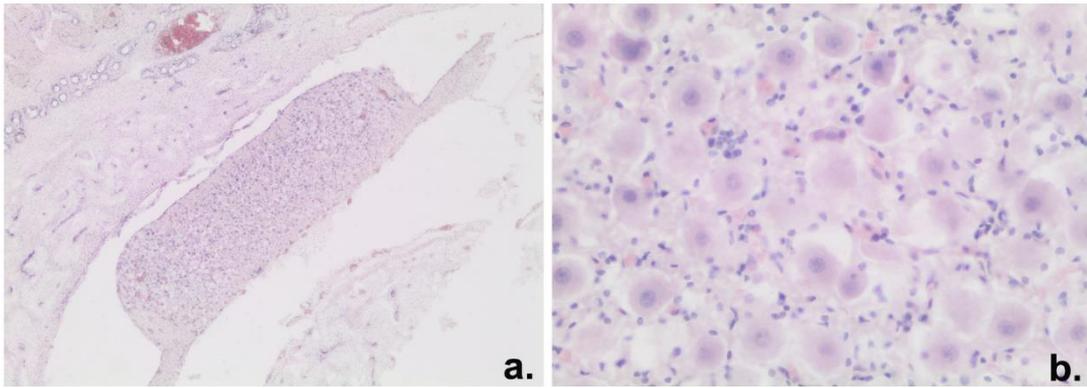


Fig. 4.10. I952/16. Tinción HE; **a.** 4x; **b.** 40x.

- I953/16
 - Oído derecho (AF 15% - Ta - Parafina): cómo se puede apreciar en la Fig. 4.11 a, se logró muestrear una pequeña cantidad de GE para este oído, así como la leve y generalizada acidofilia, ofreciendo una calidad muy pobre. Se identificaron estructuras como los cuerpos neuronales y sus núcleos, así como CGS (Fig. 4.11 b).
 - Oído izquierdo (EDTA 20% - Ta - Criostato): en la Fig. 4.11 c se observa el GE con muy buena calidad de tinción usando HE. En más detalle (Fig. 4.11 d), a mayores grados de aumentos, se logra evidenciar como dicho tejido preservó con éxito su arquitectura, así como una alta afinidad basófila en estructuras como CGS, núcleos de las células ganglionares, y nucléolos.

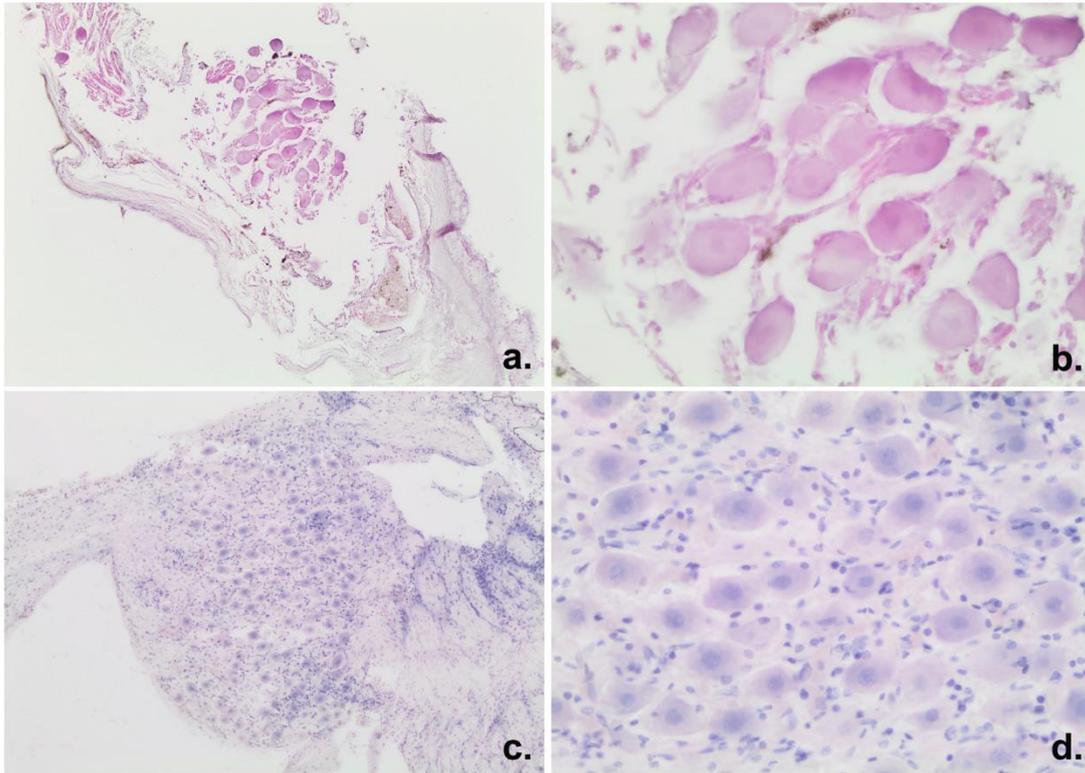


Fig. 4.11. I953/16; oído derecho (a-b) y oído izquierdo (c-d). Tinción HE; a. 10x; b. 40x; c. 10x; d. 40x.

- CET834

- Oído derecho (EDTA 20% - Ta - Parafina): en la Fig. 4.12 a, donde se evidencia el GE a pocos aumentos en una posición central, se intuye el leve aumento de la acidofilia que presentó el tejido. A pesar de este predominio de la acidofilia de manera generalizada, se pudo detectar (Fig. 4.12 b) que componentes del GE como CGS, núcleos y nucléolos neuronales, presentaron cierta afinidad basófila con una calidad aceptable.
- Oído izquierdo (EDTA 5% - Ta - Parafina): en las secciones de este oído no se pudo localizar el GE.

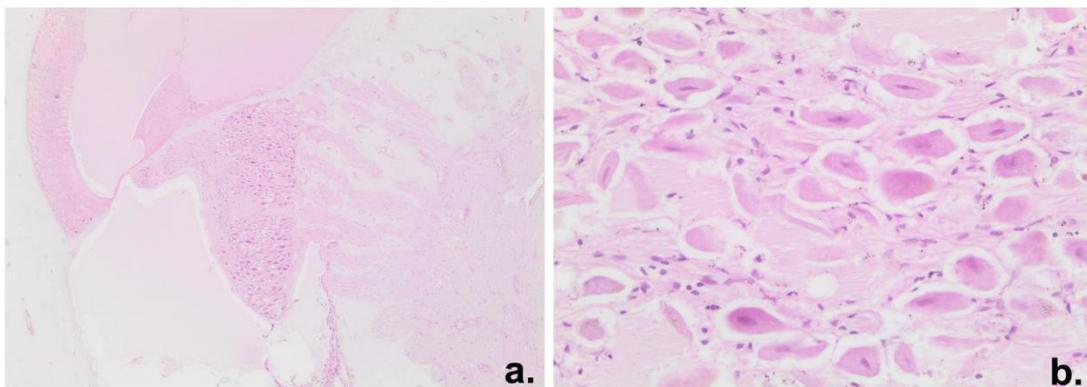


Fig. 4.12. CET834. Tinción HE; **a.** 4x; **b.** 40x.

La totalidad de los resultados individuales, descritos anteriormente con respecto a la tinción HE, aparecen recogidos en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Valoración individual de la calidad de tinción de la HE según el protocolo de descalcificación utilizado en cada animal y en cada oído del mismo. **NE:** No evaluado.

CET	Oído	Protocolo	Valoración
CET611	OD	EDTA 10% - Tª ambiente -Parafina	Muy pobre
	OI	EDTA 20% - Tª ambiente -Parafina	Pobre
CET734	OD	Histofix® descalcificador 3 -Parafina	Aceptable
	OI		
CET793	OD	Histofix® descalcificador 3 - Tª ambiente -Parafina	Pobre
	OI	AF 15% - Tª ambiente -Parafina	Buena
CET801	OD	Histofix® descalcificador 3 50% - Tª ambiente - Parafina	Pobre
	OI	EDTA 10% - Tª ambiente -Parafina	Buena
CET804	OD	EDTA 10% - Tª ambiente	Buena
	OI	EDTA 10% - 4°C -Parafina	Muy buena
CET809	OD	EDTA 10% - 4°C -Parafina	Muy buena
	OI	AF 15% - Tª ambiente -Parafina	NE
CET813	OD	EDTA 20% - Tª ambiente -Parafina	Muy pobre
	OI	EDTA 20% - 4°C -Parafina	Muy pobre
CET817	OD	EDTA 10% - Tª ambiente -Parafina	Muy pobre
	OI	AF 15% - Tª ambiente -Parafina	Muy pobre

I952/16	OD	EDTA 20% - Tª ambiente - Criostato	NE
	OI	EDTA 20% - 4°C - Criostato	Muy buena
I953/16	OD	AF 15% - Tª ambiente -Parafina	Muy pobre
	OI	EDTA 20% - Tª ambiente - Criostato	Muy buena
CET834	OD	EDTA 20% - Tª ambiente -Parafina	Aceptable
	OI	EDTA 5% - Tª ambiente -Parafina	NE

Tionina y violeta de cresilo

Dado que las técnicas histoquímicas tionina y violeta de cresilo, buscan marcar la sustancia de Nissl, serán tratadas de manera conjunta.

- CET611
 - Oído derecho (EDTA 10% - Ta - Parafina)
 - Tionina: al igual que en el caso de la HE, se dispuso de una escasa cantidad de GE tanto para la tinción con tionina como con violeta de cresilo. Dicha estructura apareció teñida de forma pobre por la tionina (Fig. 4.13 a), con evidencia de los nucléolos de las células ganglionares como se puede apreciar en la Fig. 4.13 a.1.
 - Violeta de cresilo: mostró una aceptable tinción de las células ganglionares (Fig. 4.13 b), destacando sus nucléolos con un aumento de la coloración (Fig. 4.13 b.1).
 - Oído izquierdo (EDTA 20% - Ta - Parafina)
 - Tionina: el GE apareció teñido de manera muy débil, por lo que, aunque al microscopio óptico se apreciaron levemente algunos nucléolos neuronales en las células ganglionares, estos no consiguieron ser visualizados en las fotos tomadas (Fig. 4.13 c).

- Violeta de cresilo: la muestra ofreció una coloración pobre (Fig. 4.13 d) con nucléolos de las células ganglionares evidentes, pero muy sutilmente (Fig. 4.13 d.1).

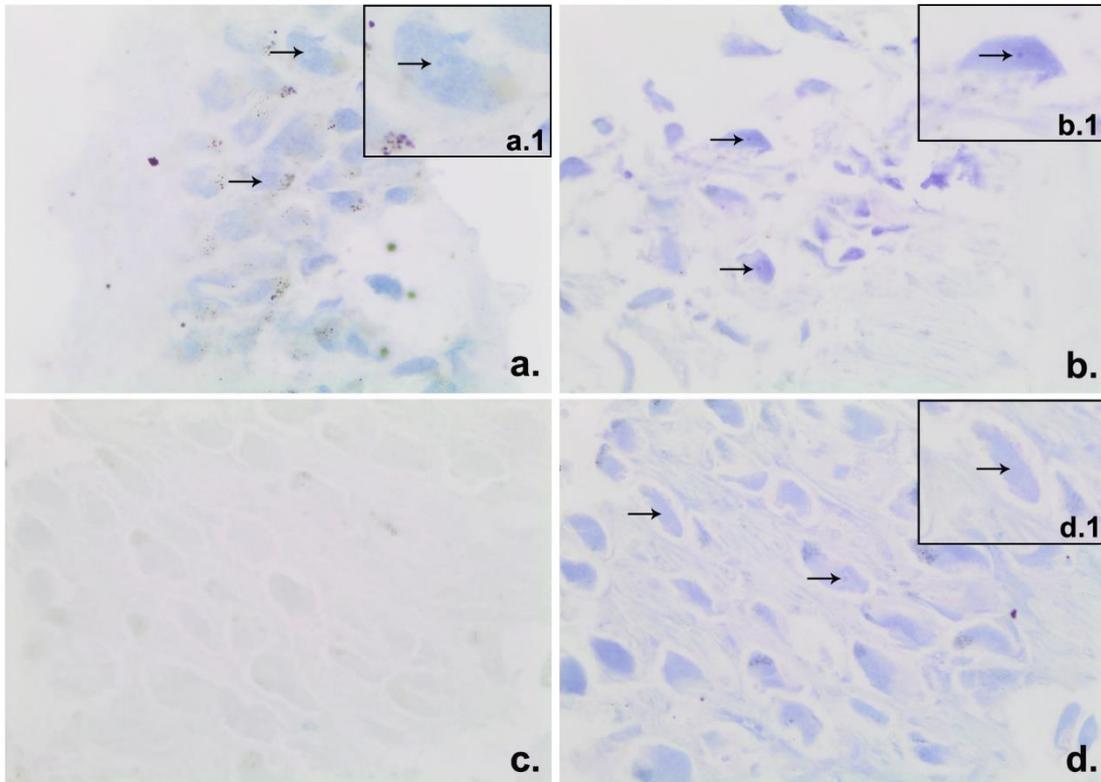


Fig. 4.13. CET611; oído derecho (a y b) y oído izquierdo (c y d). Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (a 40x y c 40x) y violeta de cresilo (b 40x y d 40x). a.1, b.1 y d.1 evidencian en detalle una célula ganglionar.

- CET734
 - Oído derecho y oído izquierdo (Histofix® descalcificador 3 - Ta - Parafina): estas muestras se procesaron bajo el mismo protocolo y ofrecieron resultados casi idénticos, por esa razón se exponen conjuntamente.
 - Tionina: a pesar de haberse distinguido el GE, este apareció teñido con una coloración muy pobre, en la que solo se logran diferenciar levemente los cuerpos neuronales (Fig. 4.14 a).

- Violeta de cresilo: esta tinción, también con una coloración muy pobre (Fig. 4.14 b), logró mostrar con un poco más de detalle, la arquitectura de las células ganglionares, e incluso los nucléolos (Fig. 4.14 b.1).

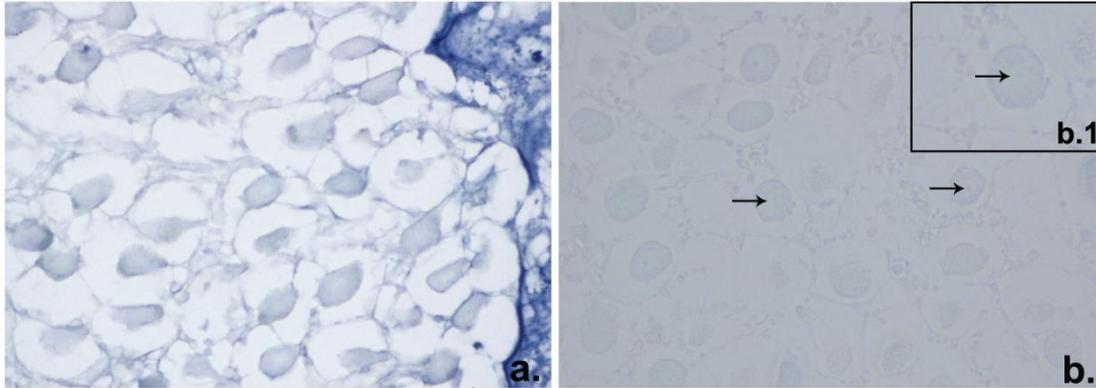


Fig. 4.14. CET734. Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (a 60x) y violeta de cresilo (b 60x); b.1 evidencia en detalle una célula ganglionar.

- CET793
 - Oído derecho (Histofix® descalcificador 3 - Ta - Parafina)
 - Tionina: el GE se pudo identificar sutilmente, ya que la tinción fue muy pobre (Fig. 4.15 a).
 - Violeta de cresilo: aunque esta tinción ofreció un nivel de coloración levemente mayor, las estructuras del GE aparecieron de una manera muy tenue.
 - Oído izquierdo (AF 15% - Ta- Parafina)
 - Tionina: esta muestra resultó en una buena tinción con tionina (Fig. 4.15 b) con diferenciación de las células ganglionares y coloración evidente de sus nucléolos (Fig. 4.15 b.1) y algunas CGS.
 - Violeta de cresilo: no fue posible realizar esta tinción debido a que no se pudieron obtener secciones para ello.

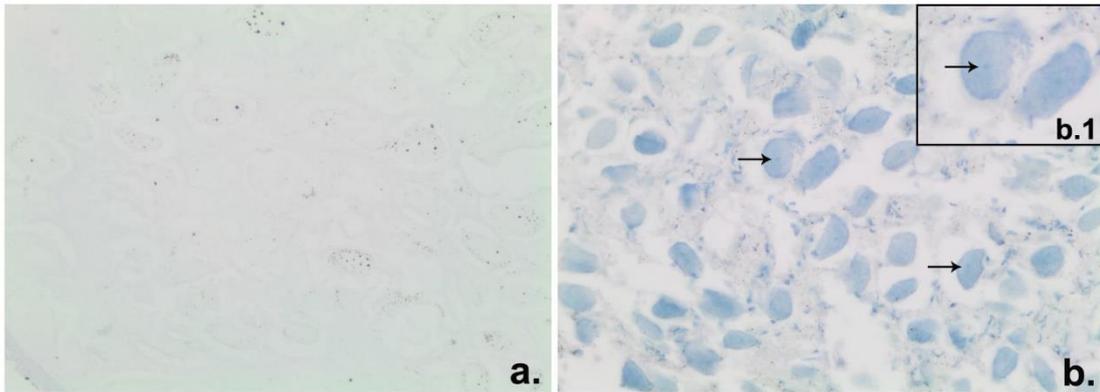


Fig. 4.15. CET793; oído derecho (a) y oído izquierdo (b). Tinción específica de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (a y b 40x); d.1 evidencia en detalle una célula ganglionar.

- CET801

- Oído derecho (Histofix® descalcificador 3 50% - Ta - Parafina)
 - Tionina: la coloración conseguida con esta tinción fue muy pobre (Fig. 4.16 a), con reconocimiento débil de los cuerpos neuronales, y hallazgos aislados de nucléolos levemente evidentes (Fig. 4.16 a.1).
 - Violeta de cresilo: el GE presentó una calidad de tinción pobre (Fig. 4.16 b), con apreciación de los nucléolos y CGS (Fig. 4.16 b.1).
- Oído izquierdo (EDTA 10% - Ta - Parafina)
 - Tionina: tinción pobre con apreciación de nucléolos en algunas de las neuronas del GE, aunque no se consiguen visualizar en las imágenes tomadas del tejido (Fig. 4.16 c).
 - Violeta de cresilo: buena calidad de tinción del GE (Fig. 4.16 d), con apreciación evidente de las neuronas ganglionares y evidencia de nucléolos neuronales (Fig. 4.16 d.1) y CGS.

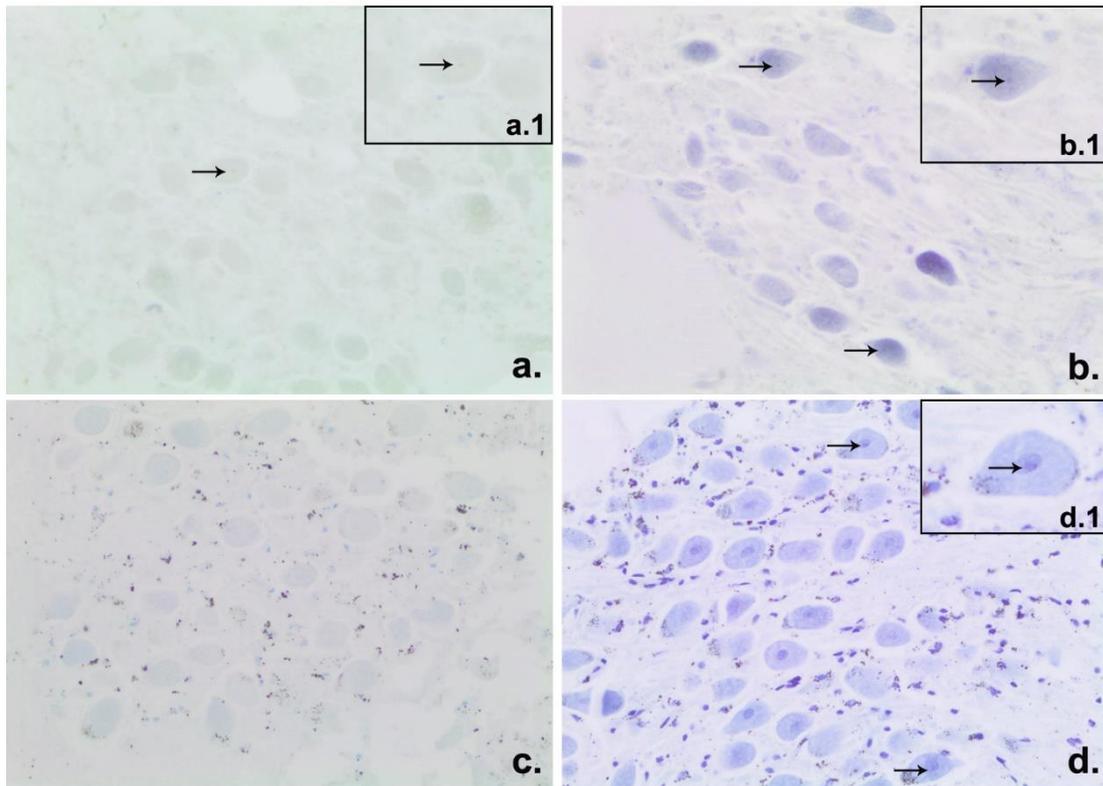


Fig. 4.16. CET801; oído derecho (a y b) y oído izquierdo (c y d). Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (a 40x y c 40x) y violeta de cresilo (b 40x y d 40x). a.1, b.1 y d.1 evidencian en detalle una célula ganglionar.

- CET804
 - Oído derecho (EDTA 10% - Ta - Parafina) y oído izquierdo (EDTA 10% - 4°C - Parafina): dado que los resultados obtenidos para este ejemplar fueron muy similares, para los distintos protocolos de descalcificación, como para las dos técnicas histoquímicas, se tratarán de manera conjunta.
 - Tionina/violeta de cresilo: las imágenes microscópicas obtenidas fueron de muy buena calidad (Fig. 4. 17) para ambas técnicas, pudiéndose identificar fácilmente los distintos componentes que conforman el GE: cuerpos neuronales, CGS y nucléolos (Fig. 4.17 a.1, b.1, c.1 y d.1).

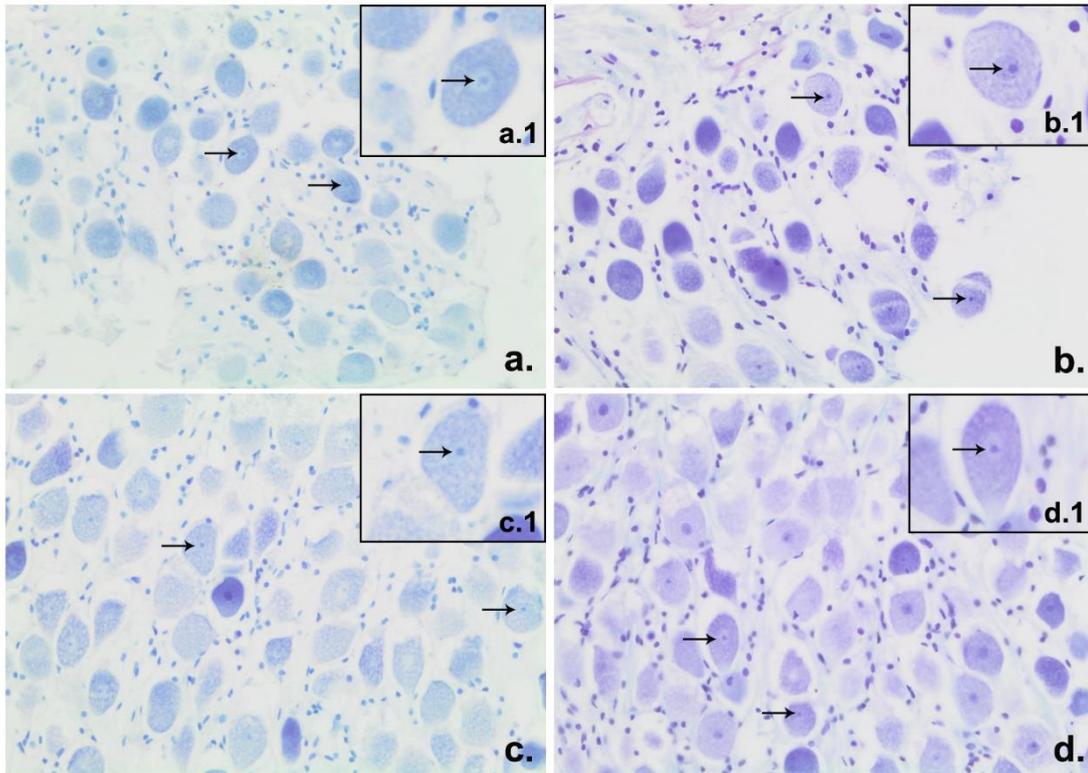


Fig. 4.17. CET804; oído derecho (a y b) y oído izquierdo (c y d). Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (a 40x y c 40x) y violeta de cresilo (b 40x y d 40x). a.1, b.1, c.1 y d.1 evidencian en detalle una célula ganglionar.

- CET809
 - Oído derecho (EDTA 10% - 4°C - Parafina)
 - Tionina: se pudo apreciar una tinción muy buena del GE (Fig. 18 a), dónde se visualizan con claridad los cuerpos neuronales, con una evidente coloración de los nucléolos de las células ganglionares (Fig. 4.18 a.1) y CGS.
 - Violeta de cresilo: la realización de esta técnica para dicha muestra ofreció una muy buena calidad de tinción (Fig. 4.18 b), en la que se logran identificar las células ganglionares, así como en una coloración más intensa, nucléolos (Fig. 4.18 b.1) y CGS.

- Oído izquierdo (AF 15% - Ta - Parafina): no fue posible valorar estas técnicas de tinción en este espécimen, ya que no se logró muestrear el GE en ninguna sección histológica.

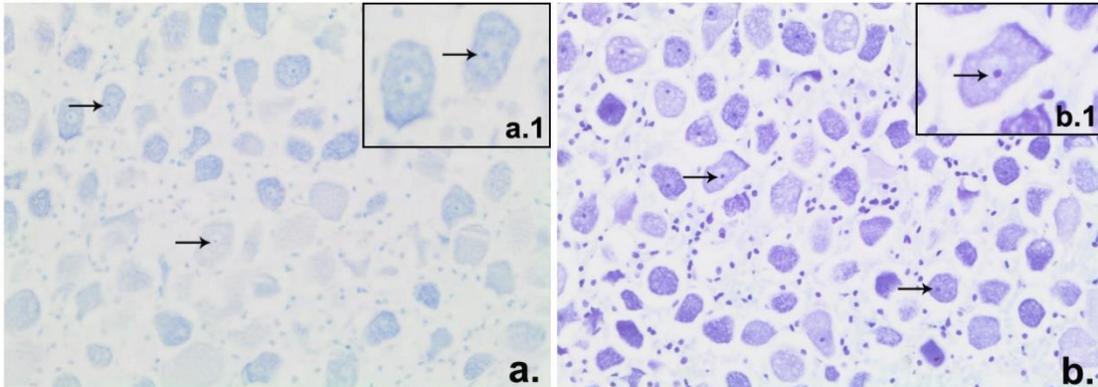


Fig. 4.18. CET809; oído derecho. Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (**a** 40x) y violeta de cresilo (**b** 40x); **a.1** y **b.1** evidencian en detalle células ganglionares.

- CET813

- Oído derecho (EDTA 20% - Ta - Parafina)
 - Tionina: se pudo identificar el GE, pero la tinción fue muy pobre como para identificar con claridad la arquitectura del mismo. En la Fig. 4.19 a se aprecia de manera muy sutil la morfología de los cuerpos neuronales.
 - Violeta de cresilo: se puede observar en la Fig. 4.19 b como la tinción ofreció una coloración pobre para este oído, con evidencia leve de algunos nucléolos (Fig. 4.19 b.1), y CGS distribuidas de manera aleatoria.
- Oído izquierdo (EDTA 20% - 4°C - Parafina)
 - Tionina: para esta técnica histoquímica no fue posible muestrear el GE.
 - Violeta de cresilo: la coloración del oído izquierdo usando esta técnica de tinción resultó en una identificación pobre de las

distintas estructuras del GE (Fig. 4.19 c), como las células ganglionares, así como algunos nucléolos (Fig. 4.19 c.1) y CGS.

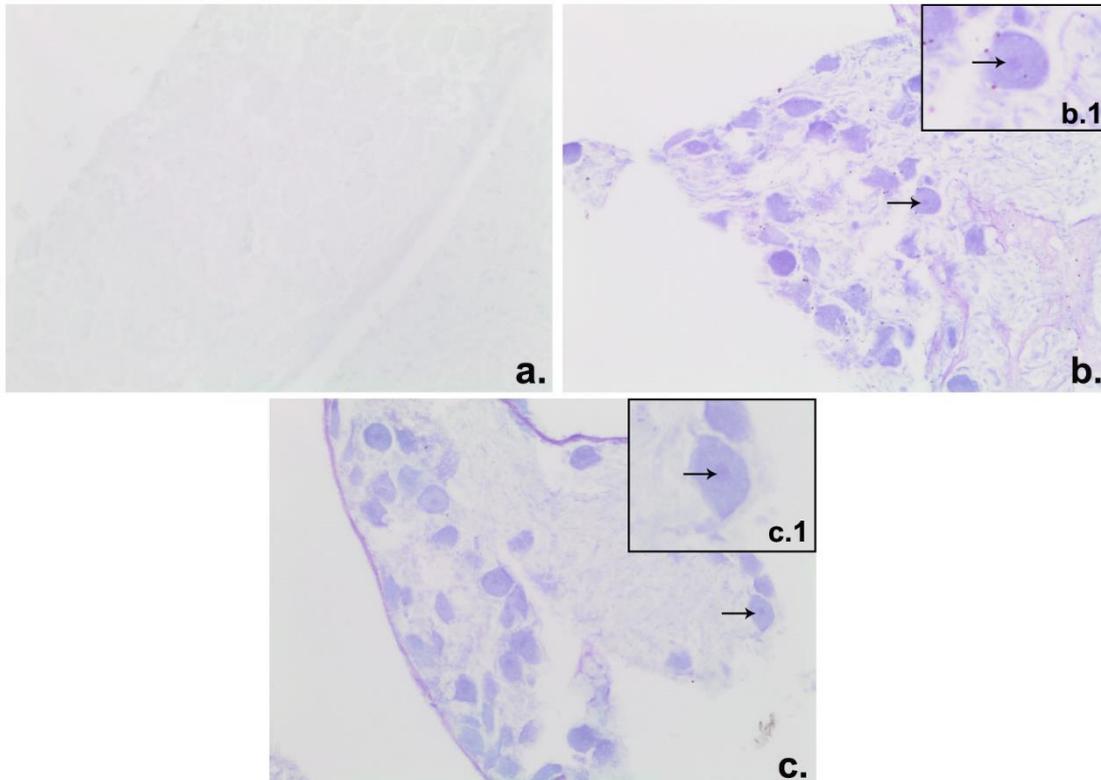


Fig. 4.19. CET813; oído derecho (a y b) y oído izquierdo (c). Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (a 40x) y violeta de cresilo (b 40x y c 40x). **b.1** y **c.1** evidencian en detalle una célula ganglionar.

- CET817
 - Oído derecho (EDTA 10% - Ta - Parafina)
 - Tionina: el oído derecho mostró una tinción muy pobre con esta técnica histoquímica, en la que no se evidenciaron los nucléolos de las neuronas ganglionares, las cuales presentan una leve coloración dejando intuir su morfología (Fig. 4.20 a).
 - Violeta de cresilo: se observó una coloración pobre (Fig. 4.20 b), visualizándose muy sutilmente algunos nucléolos aislados (Fig. 4.20 b.1), así como CGS.

- Oído izquierdo (AF 15% - Ta - Parafina)
 - Tionina: la calidad de este tejido para la tinción de tionina fue muy pobre (Fig. 4.20 c), con una apreciación débil de los cuerpos neuronales de las células ganglionares, así como de sus nucléolos (Fig. 4.20 c.1) de manera leve.
 - Violeta de cresilo: para esta tinción, el oído izquierdo mostró una coloración pobre (Fig. 4.20 d), en la que se evidenciaron tanto las células ganglionares como sus nucléolos (Fig. 4.20 d.1).

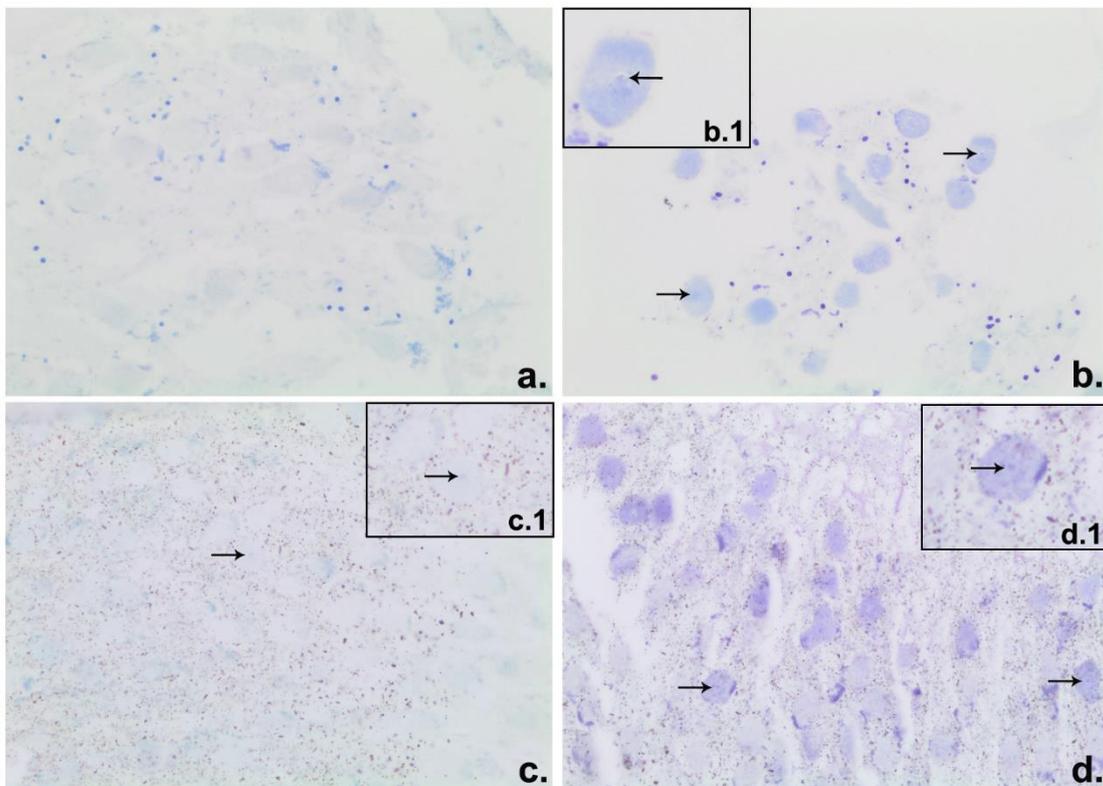


Fig. 4.20. CET817; oído derecho (a y b) y oído izquierdo (c y d). Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (a 40x y c 40x) y violeta de cresilo (b 40x y d 40x). b.1, c.1 y d.1 evidencian en detalle una célula ganglionar.

- I952/16

- Oído derecho (EDTA 20% - Ta - Criostato)

- Tionina: los resultados que mostró el oído izquierdo para esta técnica fueron muy buenos (Fig. 4.21 a), pudiéndose identificar de forma clara (Fig. 4.21 a.1) los nucléolos, cuerpos neuronales de las células ganglionares y CGS.
- Violeta de cresilo: al igual que en la tinción realizada con tionina, con violeta de cresilo se obtuvieron unas imágenes de muy buena calidad (Fig. 4.21 b), en la que se pudieron diferenciar distintas estructuras pertenecientes al GE como las células ganglionares, CGS y nucléolos neuronales (Fig. 4.21 b.1).

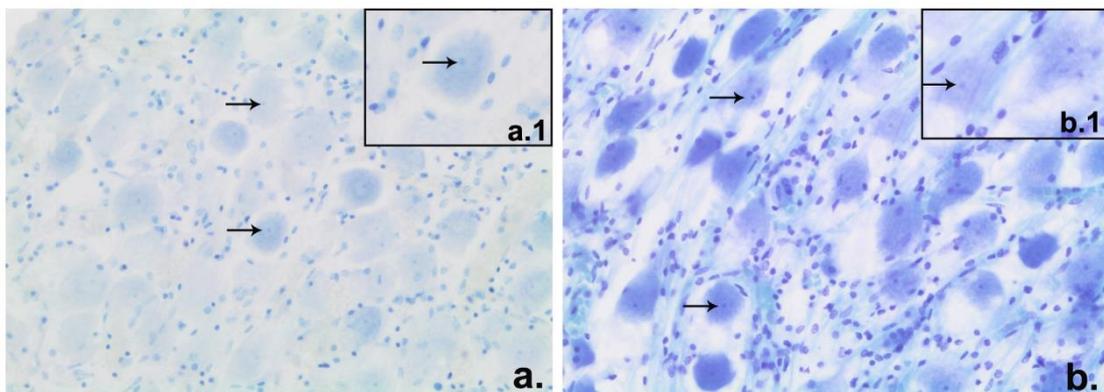


Fig. 4.21. I952/16; oído derecho. Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (**a** 40x) y violeta de cresilo (**b** 40x); **a.1** y **b.1** evidencian en detalle células ganglionares.

- I953/16
 - Oído derecho (AF 15% - Ta - Parafina)
 - Tionina: no fue posible muestrear el GE para esta tinción histoquímica.
 - Violeta de cresilo: el oído derecho mostró unos resultados de pobre calidad (Fig. 4.22 a), pudiéndose identificar los cuerpos neuronales y sus núcleos, así como ocasionales CGS.
 - Oído izquierdo (EDTA 20% - Ta - Criostato)

- Tionina: la tinción fue de una calidad muy buena (Fig. 4.22 c), con notable apreciación de la arquitectura del GE y evidente coloración de nucléolos (Fig. 4.22 c.1) y CGS.
- Violeta de cresilo: al igual que con la técnica desarrollada con tionina, el violeta de cresilo ofreció resultados de muy buena calidad (Fig. 4.22 b), dando lugar a una clara visualización de las células neuronales del GE, así como de CGS y nucléolos neuronales (Fig. 4.22 b.1).

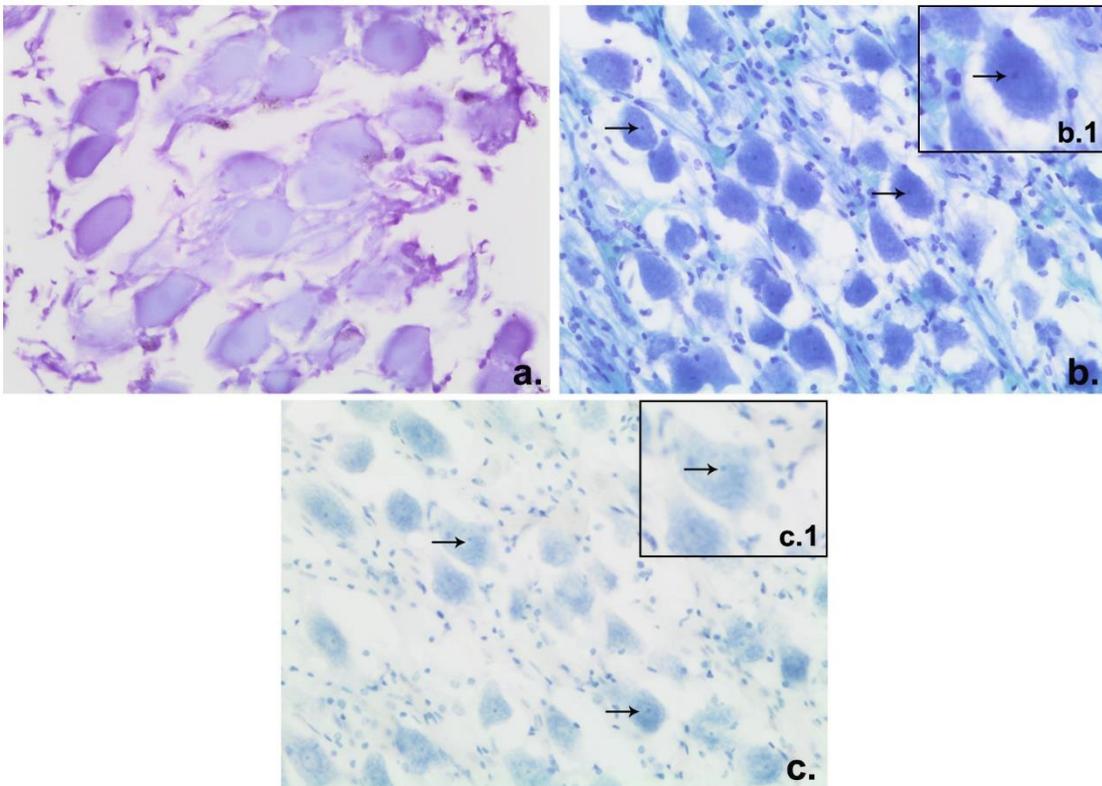


Fig. 4.22. I953/16; oído derecho (a) y oído izquierdo (b y c). Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (c 40x) y violeta de cresilo (a y b 40x); b.1 y c.1 evidencian en detalle células ganglionares.

- CET834
 - Oído derecho (EDTA 20% - Ta - Parafina)
 - Tionina: en el oído derecho de este ejemplar, la tinción con tionina fue pobre (Fig. 4.23 a), visualizándose levemente los

cuerpos neuronales, así como sus nucléolos, tal y como se puede apreciar en la Fig. 4.23 a.1.

- Violeta de cresilo: en la Fig. 4.23 b se aprecia como esta tinción resultó en una calidad aceptable, donde se mostraron con una coloración violeta intensa los nucléolos neuronales (Fig. 4.23 b.1) de las neuronas ganglionares del GE, y CGS.
- Oído izquierdo (EDTA 5% - Ta - Parafina): en las secciones de este oído no se pudo localizar el GE.

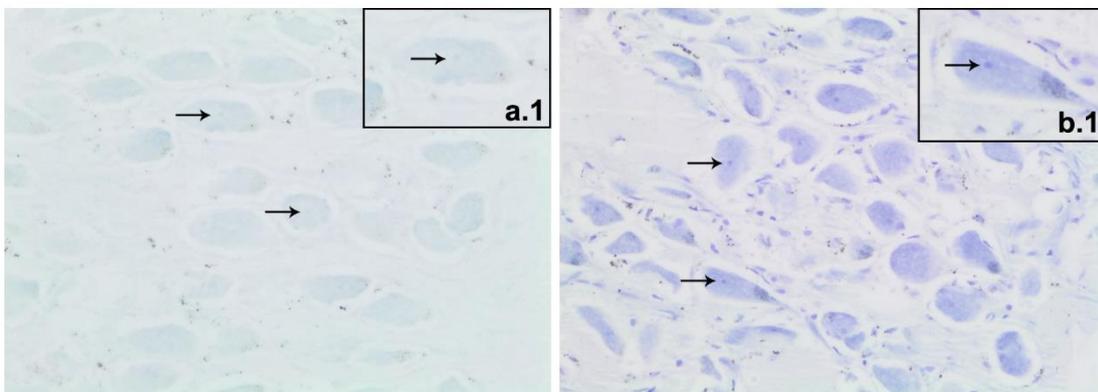


Fig. 4.23. CET834; oído derecho. Tinciones específicas de la sustancia de Nissl (flechas): tionina (**a** 40x) y violeta de cresilo (**b** 40x); **a.1** y **b.1** evidencian en detalle células ganglionares.

Todas las observaciones descritas anteriormente, quedan recogidas en la siguiente tabla (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Valoración individual de la calidad de tinción de tionina y violeta de cresilo (VC) según el protocolo de descalcificación utilizado en cada animal, y en cada oído del mismo. **NE:** No evaluado.

CET	Oído	Protocolo	Valoración Tionina/VC
CET611	OD	EDTA 10% - Tª ambiente - Parafina	Pobre/aceptable
	OI	EDTA 20% - Tª ambiente - Parafina	Muy pobre/pobre
CET734	OD	Histofix® descalcificador 3 - Parafina	Muy pobre/muy pobre
	OI		
CET793	OD	Histofix® descalcificador 3 - Tª ambiente - Parafina	Muy pobre/muy pobre
	OI	AF 15% - Tª ambiente - Parafina	Buena/ NE

CET801	OD	Histofix [®] descalcificador 3 50% - T ^a ambiente - Parafina	Muy pobre/pobre
	OI	EDTA 10% - T ^a ambiente - Parafina	Pobre/buena
CET804	OD	EDTA 10% - T ^a ambiente - Parafina	Muy buena/muy buena
	OI	EDTA 10% - 4°C - Parafina	Muy buena/muy buena
CET809	OD	EDTA 10% - 4°C - Parafina	Muy buena/Muy buena
	OI	AF 15% - T ^a ambiente - Parafina	NE
CET813	OD	EDTA 20% - T ^a ambiente - Parafina	Muy pobre/pobre
	OI	EDTA 20% - 4°C - Parafina	NE /pobre
CET817	OD	EDTA 10% - T ^a ambiente - Parafina	Muy pobre/pobre
	OI	AF 15% - T ^a ambiente - Parafina	Muy pobre/pobre
I952/16	OD	EDTA 20% - T ^a ambiente - Criostato	NE
	OI	EDTA 20% - 4°C - Criostato	Muy buena/muy buena
I953/16	OD	AF 15% - T ^a ambiente - Parafina	NE /pobre
	OI	EDTA 20% - T ^a ambiente - Criostato	Muy buena/muy buena
CET834	OD	EDTA 20% - T ^a ambiente - Parafina	Pobre/aceptable
	OI	EDTA 5% - T ^a ambiente - Parafina	NE

4.4. Preservación de la antigenicidad

Cinco fueron las muestras utilizadas para el marcaje de las proteínas descritas en la sección de “material y métodos”. Dichos oídos provienen de los animales CET734 (oído derecho e izquierdo), CET804 (oído derecho), I952/16 (oído derecho) e I953/16 (oído izquierdo).

- CET734 (oído derecho e izquierdo/ Histofix[®] descalcificador 3 50% - T^a ambiente - Parafina): debido a que los dos oídos de este animal fueron procesados del mismo modo y ofrecieron resultados muy similares, se valoraron de manera conjunta. En la Fig. 4.24 podemos observar como el inmunomarcaje frente al anticuerpos anti-HSP70 mostró resultados de buena calidad, con una distribución generalizada del soma neuronal de las células ganglionares.

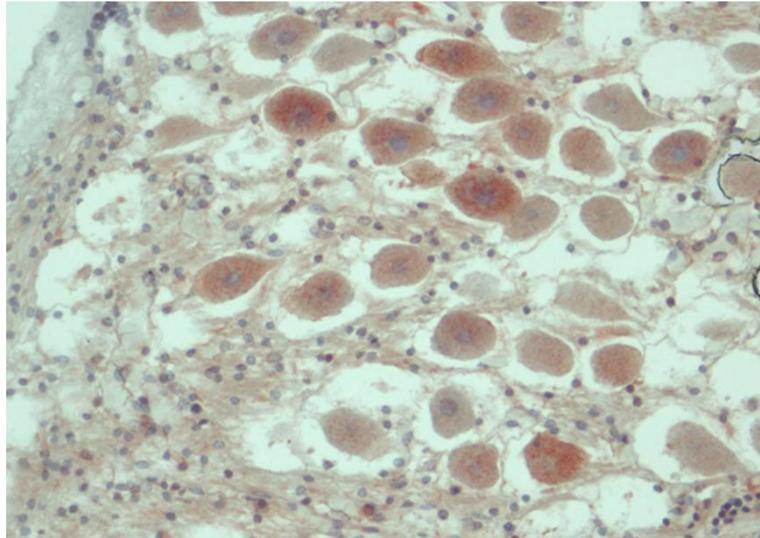


Fig. 4.24 CET734. Ganglio espiral sometido a una técnica inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-HSP70. 40x.

- CET804 (oído derecho/ EDTA 10% - T^a ambiente - Parafina): la técnica inmunohistoquímica llevada a cabo con el anticuerpo anti-nNOs, dejó un inmunomarcaje de calidad aceptable distribuido en los cuerpos neuronales de algunas células ganglionares (Fig. 4.25).

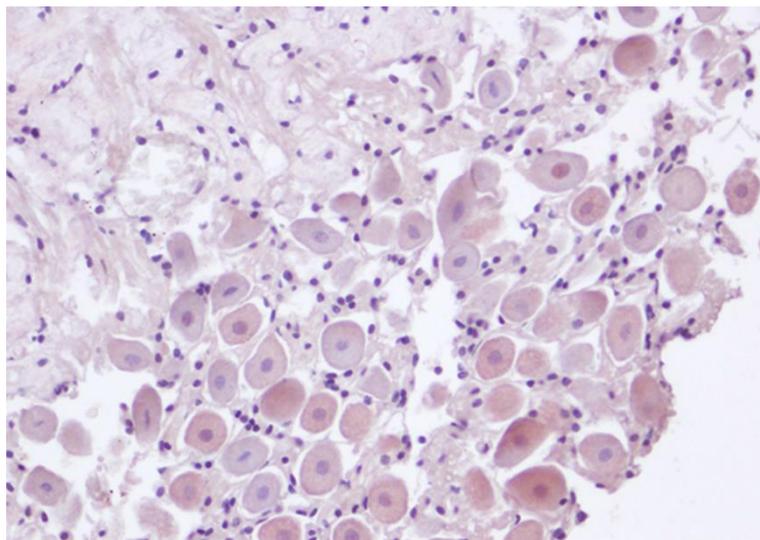


Fig. 4.25 CET804. Ganglio espiral sometido a una técnica inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-nNOs. 40x.

- I952/16 (oído derecho/ EDTA 20% - T^a ambiente - Criostato): en el caso de este ejemplar, podemos observar en la Fig. 4.26 como el inmunomarcaje, efecto de la exposición del tejido al anticuerpo anti-calretinina, resultó en imágenes microscópicas de muy buena calidad, distribuido tanto en los somas neuronales como en los axones de las células ganglionares, que posteriormente formarán el nervio coclear.

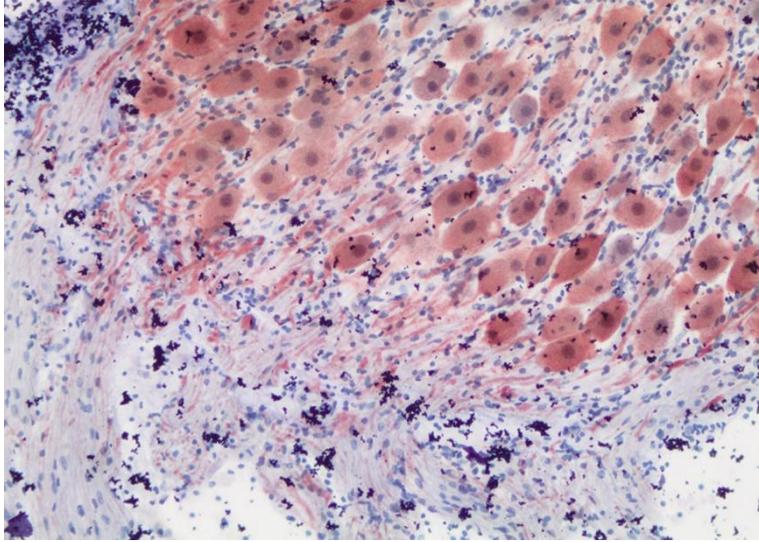


Fig. 4.26 I952/16. Ganglio espiral sometido a una técnica inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-calretinina. 20x.

- I953/16 (oído izquierdo/ EDTA 20% - T^a ambiente - Criostato): en este animal pudimos visualizar (Fig. 4.27) resultados muy similares a los observados en el ejemplar I952/16, con muy buena calidad de inmunomarcaje y similar distribución del mismo.

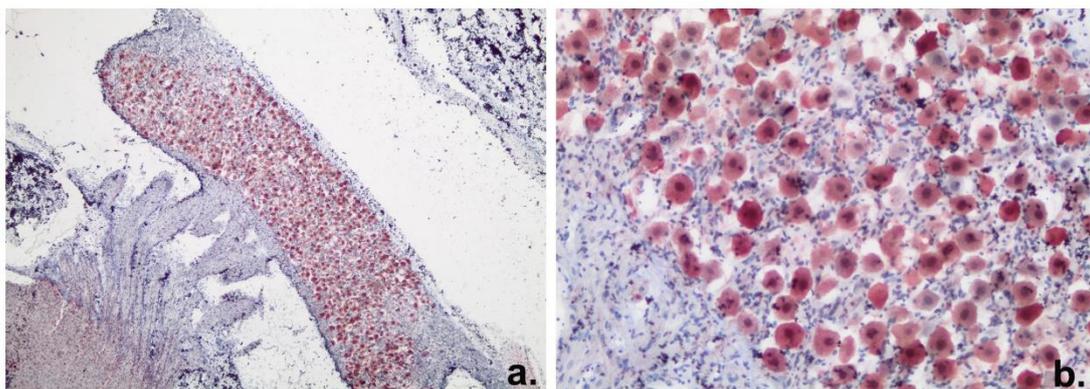
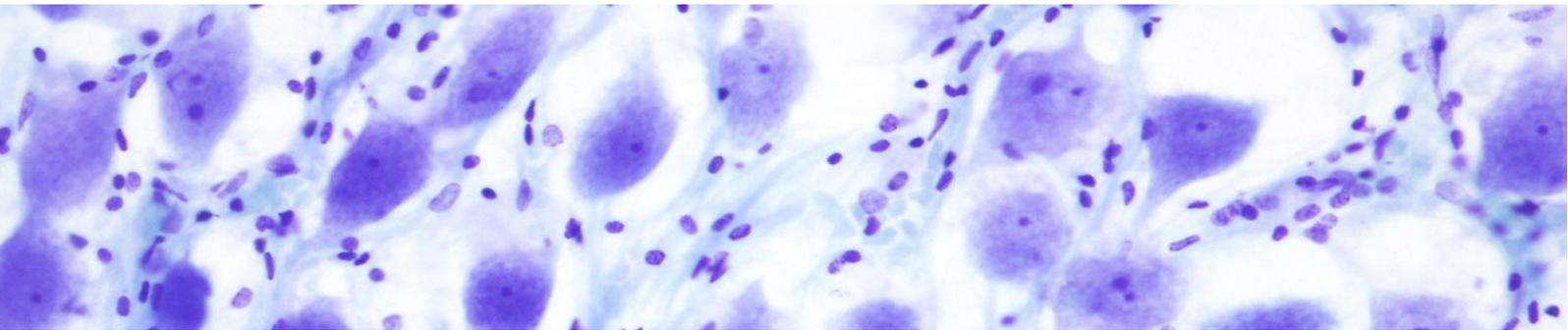


Fig. 4.27 I953/16. Ganglio espiral sometido a una técnica inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-calretinina. **a** 4x y **b** 20x.

5. Discusión



El oído interno en general, y en particular, el ganglio espiral, es un órgano aún poco investigado en cetáceos, tanto en sus aspectos anatomofisiológicos, como, en especial, sus alteraciones anatomopatológicas, y, por consiguiente, manifestaciones clínicas. Una de las principales dificultades que ofrece el estudio de este órgano en estas especies, reside en la limitación de acceso a estos mamíferos marinos, bien por ser animales de vida libre en un entorno acuático, o el escaso número de animales que actualmente se encuentran bajo el cuidado humano en parques acuáticos. Las posibilidades de investigar cetáceos se reducen a esos animales en parques acuáticos, cada vez más sometidos a normativas de bienestar o, en animales de vida libre una vez varan o mueren en las costas. Estos últimos, condicionados por el escaso número de varamientos activos, o el estado en el que son encontrados cuando se producen varamientos pasivos (Arbelo Hernández, 2007; Díaz-Delgado, 2015).

El ganglio espiral forma parte del oído interno, el cual se encuentra rodeado por una densa cobertura ósea, la cual dificulta el acceso al mismo (E. G. Wever y cols., 1971b). Por esta razón, es necesario someter los oídos, una vez extraídos, a un proceso de descalcificación que permita su procesamiento y análisis tanto macroscópico como microscópico posterior.

Dado el valor científico, la importante consideración social y mediática que poseen los cetáceos, y en especial, el requerimiento de determinar las causas de varamiento y muerte de los mismos una vez aparecen en la costa, han impulsado el estudio de estas especies en distintas partes del mundo, en las que la actividad humana en el medio marino, se ha incrementado notablemente en las últimas décadas (Arbelo Hernández, 2007; Díaz-Delgado, 2015).

De manera particular, se ha puesto atención al efecto de las actividades perniciosas humanas sobre estos animales (Fernández y cols., 2005; Girdlestone y cols., 2017; National Research Council, 2003; Romano y cols., 2004). Por este motivo, se han realizados distintos protocolos de necropsia con el fin de determinar las distintas patologías y toma de muestras, para los consiguientes análisis laboratoriales (Higgins y Noad, 2006; IJsseldijk, Brownlow, y Mazzariol, 2019).

Uno de los órganos que recibe mayor atención en estos mamíferos marinos, y parte del sistema biosonar (Cranford, Trijoulet, Smith, y Krysl, 2014), es el oído. Dicho órgano posee una gran complejidad, y necesita de un protocolo específico de

muestreo y procesamiento a la hora de poder estudiar, con garantías, su morfología. Por esta razón, son distintos los aspectos y parámetros críticos a considerar en este protocolo, el cual, a continuación, discutiremos como parte importante del objetivo y resultado de la presente tesis doctoral.

5.1. Tiempo de descalcificación

Uno de los parámetros evaluados en el presente trabajo, fue el tiempo total que tardó cada uno de los nueve protocolos empleados en descalcificar el tejido óseo que rodea el oído interno de los cetáceos.

Para el mejor seguimiento de la discusión, hemos establecido de la siguiente manera el análisis de los resultados, en primer lugar, de manera global, analizando todos y de manera conjunta, los tiempos de descalcificación, teniendo en cuenta el protocolo de descalcificación utilizado; y, en segundo lugar, de manera individual, considerando algunos ejemplares, en los que fue posible comparar dos protocolos de descalcificación diferentes, uno para cada oído del mismo cetáceo.

5.1.1. Tiempo de descalcificación general

En relación con el protocolo, observamos que el protocolo compuesto por el agente descalcificador EDTA al 5% a temperatura ambiente, fue el más lento en el proceso de descalcificación de los 9 protocolos. A este protocolo le sigue, con menor tiempo, el compuesto por EDTA al 20% a 4°C y EDTA al 20% a Ta. En cuarta, quinta, sexta y séptima posición respectivamente, se encuentran con muy poca diferencia en el tiempo de descalcificación, los protocolos: EDTA al 10% a 4°C, ácido fórmico al 87% a Ta, EDTA al 10% a Ta y ácido fórmico al 15% a Ta. Finalmente, tanto el Histofix® descalcificador 3 al 50% como el Histofix® descalcificador 3 fueron los descalcificadores con los que se logró una descalcificación más rápida y completa de las muestras sometidas a este proceso metodológico comparativo.

En rangos generales, observamos como los protocolos que tardan más tiempo en descalcificar las muestras son los que contienen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), esto coincide con otros estudios realizados por otros autores (G. Callis y Sterchi, 1998; Choi, Hong, y Yoon, 2015; Jimson, Balachander, Masthan, y Elumalai, 2014; H. Liu y cols., 2017; Prasad y Donoghue, 2013; Shibata, Fujita, Takahashi,

Yamaguchi, y Koji, 2000), en los que se referencia al EDTA como el agente descalcificador más lento entre los estudiados.

Por otro lado, los protocolos que incluyen ácido fórmico, mostraron una diferencia de pocos días con respecto a algunos de los protocolos que incorporan concentraciones de EDTA al 10%. Resultados similares obtuvieron Prasad y Donoghue (2013), quienes necesitaron, para desmineralizar muestras de mandíbulas de rata, una media de 17,9 días con un protocolo de descalcificación compuesto por EDTA, y una media de 16,3 días utilizando ácido fórmico a una concentración del 10%.

Sin embargo, en otras publicaciones la diferencia de tiempo entre estos dos agentes químicos fue más dispar, así, los resultados publicados por Jimson y cols., (2014), utilizando muestras de mandíbula humana, tardaron en descalcificarse 47 días en ácido fórmico al 10% y 61 días en EDTA. Esta diferencia también se observó en la publicación de Shibata y cols., (2000), en la que, la descalcificación de mandíbulas de ratones en EDTA, se obtuvo a los 7 días, mientras que en ácido fórmico al 5% se consiguió en 1 solo día.

El menor tiempo medio necesario para descalcificar los oídos de los cetáceos objeto de estudio, se obtuvo con diferencia, con el agente descalcificador Histofix® descalcificador 3 al 50% e Histofix® descalcificador 3. Son numerosos los trabajos comparativos realizados con diferentes protocolos de descalcificación, en los que los agentes químicos descalcificadores a base de HCl ofrecen un periodo de tiempo total más corto (G. Callis y Sterchi, 1998; Choi y cols., 2015; Jimson y cols., 2014). Sin embargo, en el artículo publicado por Shibata y cols., (2000), el tiempo necesario para descalcificar mandíbulas de ratón, fue el mismo para el HCl al 10% que para el ácido fórmico al 5% (1 día en ambos casos).

Como premisa general, la concentración utilizada del descalcificador elegido influye sobre el tiempo total de desmineralización del tejido óseo, así, cuanto mayor sea la concentración de este, menor será el tiempo necesario para ese objetivo (G. M. Callis, 2008). Esta afirmación la vemos reflejada en algunos de los resultados obtenidos en el presente estudio, así, en el caso de la utilización de EDTA, la concentración más baja (5%) requirió más tiempo en descalcificar la muestra que el EDTA a concentraciones mayores. También cumplió esta premisa el Histofix® descalcificador 3 al utilizarlo al 50%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Morell (2012), en su estudio sobre la cóclea en cetáceos, en el cual observó que

al aumentar la concentración de un agente descalcificador a base de HCl, disminuía el periodo de desmineralización.

Por otro lado, en nuestro caso, con el ácido fórmico y al comparar el EDTA al 10% con el EDTA al 20%, no se concluyó que el aumento de concentración del producto supusiera una disminución del tiempo de descalcificación. En el caso de dos agentes descalcificadores compuestos principalmente por HCl, y diferentes concentraciones, Callis y Sterchi (1998), comprobaron que al aumentar la concentración (HCl) también aumentaba ligeramente el tiempo de descalcificación.

El aumento de la temperatura, normalmente, acelera las reacciones químicas, como la descalcificación (G. M. Callis, 2008). En el presente estudio, se comprobó este hecho cuando se realizó el análisis comparativo de los protocolos en los que se incluyó EDTA al 20%, pero no así en el caso del EDTA a una concentración del 10%.

5.1.2. Tiempo de descalcificación individual

El hecho de que el oído sea un órgano par, nos ofreció la oportunidad de comparar dos protocolos con muestras obtenidas del mismo animal. Esto nos permitió tener idénticas condiciones iniciales para ambas muestras, variando posteriormente el protocolo objeto de estudio comparativo. Esta valoración a nivel individual, se llevó a cabo en un total de 12 animales, empleando sus dos porciones timpánicas del CTP en cada caso.

En el animal CET801, al comparar el EDTA al 10% con Histofix® descalcificador 3 al 50%, el oído descalcificado con EDTA tardó 32 días más en descalcificarse por completo que el desmineralizado con el agente compuesto principalmente por HCl. Dicho resultado coincide con los expuestos en el apartado de la discusión anterior, que demostraba que el EDTA es el compuesto descalcificador más lento (G. Callis y Sterchi, 1998; Choi y cols., 2015; Jimson y cols., 2014; H. Liu y cols., 2017; Prasad y Donoghue, 2013; Shibata y cols., 2000).

En cambio, los resultados obtenidos en los animales CET809 y CET817, donde se comparan tanto EDTA al 10% a Ta como a 4°C con ácido fórmico al 15% a Ta, comprobamos una vez más, que el tiempo de descalcificación entre ambos fue muy similar (Prasad y Donoghue, 2013).

Es de destacar el ejemplar CET809, cuyo tiempo de desmineralización de la porción timpánica de su CTP fue menor al ser procesada con EDTA al 10% a 4°C que al ser descalcificada con ácido fórmico al 15% a Ta, al contrario de lo que se había observado en otras muestras analizadas anteriormente. Como será expuesto en el siguiente apartado, las muestras procesadas con ácido fórmico se mostraban friables y con dificultad al manipularlas. Debido a este comportamiento de la muestra, resultaba complicado identificar el momento en el que se había descalcificado por completo, por esta razón, el oído del ejemplar CET809 descalcificado con ácido fórmico al 15%, permaneció más tiempo inmerso en dicho reactivo, hasta saber con seguridad que había llegado al punto óptimo de desmineralización.

En el caso del Histofix® descalcificador 3, utilizado tanto al 100% como al 50%, mostraron un menor periodo de desmineralización, tanto al compararse Histofix® descalcificador 3 con ácido fórmico al 15% en el CET793, como el contraste llevado a cabo de Histofix® descalcificador 3 al 50% con EDTA al 10% en muestras obtenidas del cetáceo CET801. De esta manera, las observaciones coincidieron con las llevadas a cabo en el apartado anterior, en lo que se refiere a los descalcificadores compuestos por HCl y su corto tiempo de desmineralización en comparación con otros agentes descalcificadores (G. Callis y Sterchi, 1998; Choi y cols., 2015; Jimson y cols., 2014).

En relación a la valoración de la posible influencia de la concentración del agente descalcificador sobre la velocidad de descalcificación, esta se realizó en tres animales diferentes. En los animales CET611 y CET834, se compararon dos concentraciones de EDTA, observándose una disminución del tiempo necesario para descalcificar directamente proporcional al aumento de concentración del producto, tal y como había sido descrito anteriormente (G. M. Callis, 2008; Morell, 2012). En lo que se refiere al animal CET643, en el momento en el que el oído descalcificado con ácido fórmico al 15% se desmineralizó por completo, se inspeccionó el oído sometido al mismo agente descalcificador, pero a una concentración del 87%, comprobando que este último se encontraba destruido casi en su totalidad. Por esta razón en la Tabla 4.2 aparecen con el mismo tiempo de descalcificación total.

En los animales CET804, CET813 e I952.16, comprobamos como la disminución de la temperatura en el procesamiento, conlleva al aumento del tiempo total de desmineralización de las muestras (G. M. Callis, 2008). Esto no sucedió en el caso del ejemplar CET810, donde el tiempo de descalcificación fue mayor a temperatura

ambiente, lo cual podría deberse a variaciones en la frecuencia de renovación del agente descalcificador, lo cual debería seguirse investigando.

5.2. Conservación de la morfología macroscópica

La evaluación de la morfología del tejido una vez desmineralizado, consistió en analizar en qué grado afectó el proceso de descalcificación a la integridad tisular.

Las muestras que conservaron una morfología adecuada, y que mejor facilitaron los procedimientos de estudio posterior, fueron aquellas en las que se empleó la descalcificación tanto con Histofix® descalcificador 3 como con Histofix® descalcificador 3 al 50%, lo que valida resultados previamente publicados en relación a la valoración de este parámetro (Jimson y cols., 2014).

Aunque la conservación de la morfología y la facilidad del corte fue buena para los oídos descalcificados con EDTA al 5, 10 y 20% a Ta, los resultados obtenidos mostraron, comparativamente, una calidad inferior a la ofrecida en los especímenes descritos en el párrafo anterior. Existen estudios que comparten hallazgos similares (Prasad y Donoghue, 2013; Savi, Brierly, Baldwin, Theodoropulos, y Woodruff, 2017), en los que muestras descalcificadas con EDTA mostraron facilidad al corte después de la descalcificación. En cambio, en el caso de Jimson y cols., (2014), al descalcificar muestras de mandíbula humana con este agente descalcificador, se observó una mayor dificultad del manejo posterior, debido a que las muestras obtenidas después de ser desmineralizadas se desintegraban morfológicamente.

Igualmente, al descalcificar la porción timpánica del CTP con EDTA al 10 y 20% a 4°C, estas perdieron parcialmente su morfología, presentando áreas quebradizas que dificultaron el corte, imposibilitando en algunas ocasiones la obtención de cortes histológicos. Existen autores que utilizan el EDTA a 4°C como descalcificador en sus trabajos con aparentes buenos resultados (Kalkandelen, Selimoğlu, Erdoğan, Üçüncü, y Altaş, 2002; Onishi y cols., 1999; Sun y cols., 2015), lo que contrasta con la dificultad que ofrecieron las muestras en nuestro estudio empleando un protocolo similar.

En último lugar, al emplear los protocolos con ácido fórmico al 15 y 87% se obtuvo una calidad morfológica muy pobre, ya que el tejido se desintegró casi en su totalidad, dificultando el corte para su estudio histológico. En diferentes publicaciones, se

expone la dificultad técnica a la hora de seccionar el tejido óseo una vez descalcificado con ácido fórmico (Farrel, Osmotherly, Rivett, y Cornwall, 2015; Jimson y cols., 2014; Prasad y Donoghue, 2013), indicando en ocasiones, que el aumento de la temperatura mejora el manejo (Choube y cols., 2018), pero sin reflejar la dificultad de realizar los cortes para la obtención de la muestra. En relación a este aspecto, Savi y cols., (2017), describieron la facilidad para realizar los cortes del tejido una vez descalcificado con ácido fórmico al 10%, hecho que contrasta con los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

5.3. Conservación de la morfología tisular

La valoración de la conservación morfológica del ganglio espiral en cetáceos se llevó a cabo después de la realización de las siguientes técnicas histoquímicas: hematoxilina-eosina, tionina y violeta de cresilo. Se analizaron un total de 21 muestras, las cuales se encuentran recogidas en la Tabla 4.3.

Al igual que para el tiempo de descalcificación, esta sección está dividida en una parte general, dónde únicamente se tuvo en cuenta el protocolo utilizado, y en una parte individual, en la que se evalúan las distintas técnicas partiendo de las mismas condiciones, pudiendo comparar técnicas histoquímicas sobre muestras obtenidas mediante diferentes protocolos de descalcificación en órganos del mismo animal.

5.3.1. Conservación de la morfología tisular general

A la hora de analizar los resultados morfológicos obtenidos de manera general, se observó una gran disparidad de resultados, debido a la existencia de un mayor número de factores que influyen en el estado final del tejido a analizar.

El principal factor que pudo influir en la variabilidad de estos resultados fue el estado de conservación inicial, es decir, el momento de la obtención de la muestra a partir del cadáver. El tiempo que transcurre desde la muerte del animal hasta que se toma la muestra y se introduce en el fijador es crucial, particularmente, para el oído interno, ya que dada su labilidad a la anoxia, sus células comienzan a deteriorarse apenas unas horas postmortem, lo que influye negativamente en la conservación y su posterior estudio morfológico (Girdlestone y cols., 2017; Jepson y cols., 2006; Lopez y cols., 2016).

A causa de lo indicado anteriormente, en la Tabla 4.4 se puede observar la variabilidad de los resultados obtenidos. Un buen ejemplo se puede identificar en los resultados alcanzados con el protocolo de descalcificación compuesto por ácido fórmico al 15%, en el que las secciones tisulares sometidas a la tinción con HE o tionina, ofrecieron resultados con una calidad muy pobre en algunos animales y buena en otros. Resultados similares se obtuvieron en muestras incluidas en parafina, descalcificadas anteriormente con los protocolos de EDTA al 20% y al 10% a Ta.

Con carácter general, la mejor calidad obtenida con las tres tinciones histoquímicas, se obtuvo al emplear criosecciones de oídos descalcificados con los protocolos que incluyeron EDTA al 20% tanto a 4°C como a Ta. También se obtuvieron buenos resultados en las secciones teñidas con HE, tionina y violeta de cresilo, a partir de muestras descalcificadas con los protocolos con EDTA al 10% tanto a 4°C como a Ta. Las secciones teñidas con HE, previamente procesadas con el protocolo a base de EDTA al 20% a 4°C ofrecieron, igualmente, una buena calidad morfológica.

En relación a estos resultados, varios estudios anteriores revelaron resultados similares, en los que los mejores detalles histológicos se obtuvieron utilizando el EDTA como descalcificador (Girdlestone y cols., 2017; Prasad y Donoghue, 2013; Savi y cols., 2017).

Jimson y cols., (2014), describieron buenos resultados de tinción tanto con muestras descalcificadas con EDTA, como con ácido fórmico. De igual modo, en una visión general de los resultados expuestos en la Tabla 4.4, las secciones de parafina de muestras descalcificadas con ácido fórmico al 15% y EDTA al 20% a Ta ofrecieron unas imágenes histológicas de calidad similar al utilizar dichas técnicas histoquímicas.

Por último, los protocolos formados por ácido clorhídrico arrojaron los peores resultados histológicos, tal y como otros autores reflejaron en sus trabajos (Jimson y cols., 2014)

Con el objetivo de conocer la variabilidad dependiente de las condiciones de cada animal y distintos protocolos de descalcificación, intentaremos a continuación, abordar una discusión más individual.

5.3.2. Conservación de la morfología tisular individual

Tal y como muestran la Tabla 4.5 y Tabla 4.6 el agente descalcificador EDTA ofreció de manera global buenos resultados histológicos, empleando las tres tinciones histoquímicas. Tanto en el caso de ser usado como único agente descalcificador, como comparándolo con otros (HCl o ácido fórmico), en los oídos del mismo animal, tal y como indicamos en el apartado anterior de la discusión (Girdlestone y cols., 2017; Prasad y Donoghue, 2013; Savi y cols., 2017).

En una sola ocasión (CET611) se observó que el aumento de concentración del descalcificador EDTA empeoró, moderadamente, la calidad de las tinciones con tionina y violeta de cresilo, pero mejoró la calidad de la imagen con HE.

Este caso muestra la posibilidad de que el aumento de concentración del agente descalcificador pueda dañar parcialmente el tejido (G. M. Callis, 2008). La posible justificación de esta variación, frente a los resultados generales obtenidos en relación a la concentración del descalcificador, pudiera estar relacionado con el hecho, del tiempo de permanencia en formaldehído de las muestras, aproximadamente tres años, lo que sin duda, puede haber afectado negativamente a la calidad de las tinciones realizadas sobre estas muestras después de su procesamiento (Jepson y cols., 2006).

En dos de los animales (CET804 y CET813) se contrastó la descalcificación con EDTA sin variar la concentración, pero modificando la temperatura de trabajo (temperatura ambiente y 4°C). Sólo en uno de ellos (CET804) se evidenció una pequeña mejoría de la tinción con hematoxilina. Las muestras del otro ejemplar se encontraban en unas condiciones muy avanzadas de descomposición, justificando el valor crítico negativo de la descomposición sobre la calidad morfológica del tejido (Girdlestone y cols., 2017; Jepson y cols., 2006; Lopez y cols., 2016).

Tal y como describieron Zupančič y cols., (2017), se obtuvo buena preservación morfológica tanto con las secciones de parafina como con las criosecciones al descalcificar con EDTA.

Existieron tres oportunidades de comparar la descalcificación con ácido fórmico al 15% con otros protocolos. Comparativamente, el protocolo formado por EDTA al 20% y cortes realizados al criostato, mostró mejores resultados con este último

(Girdlestone y cols., 2017; Prasad y Donoghue, 2013; Savi y cols., 2017). Sin embargo, cuando el AF al 15% fue contrastado con Histofix® descalcificador 3, este último protocolo ofreció resultados de menor calidad morfológica, coincidiendo con los resultados discutidos de manera global.

En el animal CET817, muy probablemente, su estado de descomposición fue responsable de las imágenes histológicas defectuosas obtenidas del ganglio espiral, tal y como se referencia en la discusión en relación al estado de descomposición (Girdlestone y cols., 2017; Jepson y cols., 2006; Lopez y cols., 2016).

En el caso de las muestras descalcificadas con Histofix® descalcificador 3 (ambos oídos del CET734 y oído derecho del CET793), se comprobó que la calidad morfológica del tejido fue muy superior al utilizar la tinción de HE, comparativamente, con las técnicas histoquímicas tionina y violeta de cresilo (tinciones específicas de la sustancia de Nissl), en las que la tinción se mostró de manera muy débil. Estos resultados se presentaron de manera más evidente en el animal CET734. Kristensen, en 1948, describió igualmente, que obtener una buena tinción de la sustancia de Nissl en el ganglio espiral del oído, fue la parte más difícil de su estudio. Probablemente, las muestras descalcificadas con este descalcificador (Histofix® descalcificador 3), que se clasifica como ácido fuerte, afectó la sustancia de Nissl en los tejidos analizados (G. M. Callis, 2008; G. Callis y Sterchi, 1998).

Aunque el estado de conservación parece afectar a la calidad morfológica del tejido como ha sido descrito (Girdlestone y cols., 2017; Jepson y cols., 2006; Lopez y cols., 2016), los resultados de este estudio han reflejado que la elección del agente descalcificador es muy importante para mejorar este objetivo. Así, por ejemplo, en el caso del animal CET734, que en el momento de la necropsia se encontraba en buen estado de conservación, sus oídos descalcificados con Histofix® descalcificador 3, ofrecieron imágenes histológicas de las tinciones con tionina y violeta de cresilo, de muy mala calidad, mientras que el espécimen CET804, con un estado de descomposición moderada y descalcificación con EDTA, presentó resultados morfológicos en el ganglio espiral de muy buena calidad al utilizar las mismas técnicas histoquímicas de tionina y violeta de cresilo. Esta situación, de manera muy probable, se explica igual que en el párrafo anterior. Al considerarse el HCl un ácido fuerte, es muy posible que haya afectado a la estructura tisular y celular del GE (G. M. Callis, 2008; G. Callis y Sterchi, 1998), destruyendo así, muestras originarias de un animal necropsiado en unas buenas condiciones de conservación.

5.4. Preservación de la antigenicidad

En la literatura científica se describe al EDTA como un buen conservador de la antigenicidad en órganos con tejido óseo descalcificado asociado (Choi y cols., 2015; Jimson y cols., 2014; H. Liu y cols., 2017; Savi y cols., 2017), no siendo así en la misma medida, cuando se utiliza el ácido clorhídrico como descalcificador (Choi y cols., 2015), el cual presenta ciertas limitaciones.

Al analizar los resultados obtenidos, comprobamos como se obtuvo una mejor conservación de la antigenicidad en el tejido descalcificado con EDTA al 20% y secciones obtenidas mediante criostato; disminuyendo dicha antigenicidad en las secciones de parafina descalcificadas anteriormente con Histofix® descalcificador 3 y EDTA al 10%.

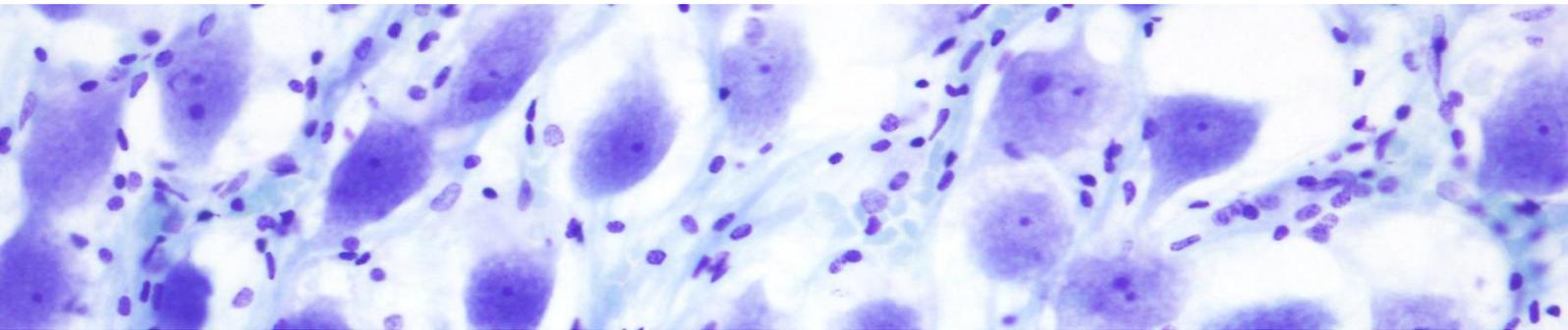
La mejor conservación de la antigenicidad en los oídos descalcificados con HCl en lugar de aquellos descalcificados con EDTA al 10%, se relaciona claramente con el estado de conservación del cadáver y tiempo postmortem de fijación de muestras tisulares correspondientes (Girdlestone y cols., 2017; Jepson y cols., 2006; Lopez y cols., 2016), en estos casos del oído y su fijación.

Por otro lado, fue evidente la diferente calidad de la conservación de la antigenicidad de las criosecciones, cuando las comparamos con las muestras incluidas en parafina. Es conocido que los procesos de fijación e inclusión en parafina eliminan o enmascaran un porcentaje muy alto de proteínas (antígenos a detectar) en relación al procesado de las muestras en congelación. Adicionalmente, hay factores que favorecen la pérdida de antigenicidad en las diferentes etapas de los protocolos aplicados en este trabajo, en los que se han incluido, altas temperaturas, alcoholes o xileno, que pueden afectar a la antigenicidad de los tejidos (Ramos-Vara y Miller, 2014; Lopez y cols., 2016; Zupančič y cols., 2017).

Se utilizaron tres proteínas (antigénicas), calretinina, HSP70 y nNOs, existentes y demostradas en células del ganglio espiral en otras especies animales (Neely, Thompson y Gower, 1991; Gosepath y cols., 1997; Gower y Thompson, 1997; Fessenden y cols., 1999; Gong y Yan, 2002; Takumida y Anniko, 2002; Wang y cols., 2005; Mikuriya y cols., 2008; Liu y Davis, 2014; Sharma, Seo y Yi, 2018), como bioindicadores de cantidad y calidad del mantenimiento de la antigenicidad en el ganglio espiral de cetáceos odontocetos después de un protocolo de descalcificación.

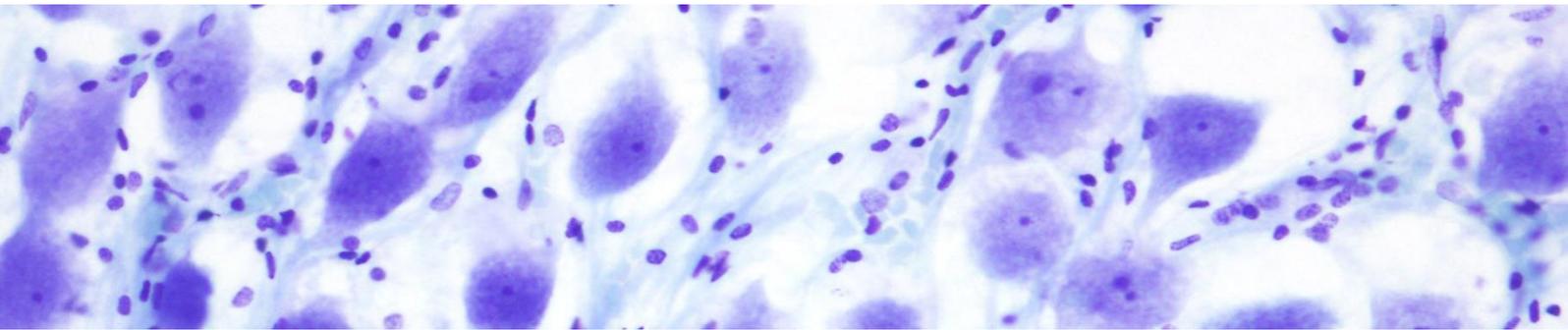
Así, se pudieron detectar estos antígenos mediante técnicas inmunohistoquímicas en neuronas del ganglio espiral de cuatro cetáceos odontocetos. Dos de ellos fueron ejemplares de la especie *Tursiops truncatus*, un ejemplar de *Kogia breviceps* y un ejemplar de *Delphinus delphis*. El protocolo con el que se consiguieron los mejores resultados antigénicos fue utilizando las criosecciones descalcificadas previamente con EDTA (tanto a temperatura ambiente como a 4°C), lo que coincide con trabajos de investigación previos en otras especies (Girdlestone y cols. 2017; Jimson y cols. 2014; Liu y cols. 2017; Lopez y cols. 2016; Savi y cols. 2017; Zupančič y cols. 2017).

6. Conclusiones



1. Los protocolos que utilizan EDTA requieren tiempos más largos para la descalcificación del oído interno, a diferencia de los protocolos que emplean Histofix® descalcificador 3, que mostraron los tiempos más cortos para este proceso del oído interno de cetáceos odontocetos.
2. El aumento de la temperatura, en protocolos en que utilizan EDTA, acorta el tiempo de descalcificación del oído interno de los cetáceos odontocetos estudiados.
3. La utilización de Histofix® descalcificador 3 y EDTA a temperatura ambiente, facilitó la descalcificación, conservando la estructura adecuada de la cóclea, para su inclusión en parafina y/o utilización en criostato, frente a protocolos que utilizaron EDTA a 4°C o ácido fórmico a temperatura ambiente.
4. Los protocolos de descalcificación basados en EDTA ofrecieron la mejor morfología tisular para el estudio microscópico de los diferentes componentes del ganglio espiral.
5. El mejor protocolo para el mantenimiento antigénico (cantidad) y su detección inmunohistoquímica (calidad) fue aquel en el que las muestras fueron descalcificadas utilizando EDTA, tanto a temperatura ambiente como a 4°C.
6. Inmunohistoquímicamente se demostró la presencia de antígenos de calretinina, HSP70 y nNOs en neuronas del ganglio espiral de cuatro cetáceos odontocetos de tres especies diferentes (*Tursiops truncatus*, *Kogia breviceps* y *Delphinus delphis*), lo que abre futuras investigaciones sobre la utilización de estos biomarcadores en casos de contaminación acústica.

7. Resumen/Summary



7.1 Resumen

El sistema de biosonar y, principalmente, el oído interno de los cetáceos sigue siendo objeto de investigaciones relacionados con su biología evolutiva, anatomía, fisiología y patología, cobrando actualmente, un gran interés el efecto de la contaminación acústica submarina sobre el mismo.

Una parte fundamental, de naturaleza nerviosa, en el oído de los cetáceos odontocetos, es el ganglio espiral, el cual juega un papel fundamental en la transmisión del sonido, y por tanto en la audición de los cetáceos. El ganglio espiral está situado en el oído interno, que en estos animales se encuentra en el interior de la porción timpánica del complejo timpánico-periótico, el cual está compuesto principalmente por tejido óseo, por lo que es necesario su descalcificación para poder estudiar, correctamente, las estructuras del oído interno.

De aquí, que el objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en mejorar y estandarizar los protocolos de descalcificación de las estructuras óseas que albergan al oído interno con el fin de llevar a cabo el estudio morfológico e inmunohistoquímico del ganglio espiral en cetáceos odontocetos.

Para ello se utilizaron 34 oídos procedentes de cetáceos, que se sometieron a 9 protocolos diferentes de descalcificación, utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido fórmico e Histofix® descalcificador 3 a distintas concentraciones y temperatura. Las muestras obtenidas fueron embebidas en parafina para su corte mediante microtomo convencional o, directamente sometidas a su corte en criostato.

Las conclusiones de la presente tesis doctoral fueron:

1. Los protocolos que utilizan EDTA requieren tiempos más largos para la descalcificación del oído interno, a diferencia de los protocolos que emplean Histofix® descalcificador 3, que mostraron los tiempos más cortos para este proceso del oído interno de cetáceos odontocetos.
2. El aumento de la temperatura, en protocolos que utilizan EDTA, acorta el tiempo de descalcificación del oído interno de los cetáceos odontocetos estudiados.

3. La utilización de Histofix® descalcificador 3 y EDTA a temperatura ambiente, facilitó la descalcificación, conservando la estructura adecuada de la cóclea, para su inclusión en parafina y/o utilización en criostato, frente a protocolos que utilizaron EDTA a 4°C o ácido fórmico a temperatura ambiente.
4. Los protocolos de descalcificación basados en EDTA ofrecieron la mejor morfología tisular para el estudio microscópico de los diferentes componentes del ganglio espiral.
5. El mejor protocolo para el mantenimiento antigénico (cantidad) y su detección inmunohistoquímica (calidad) fue aquel en el que las muestras fueron descalcificadas utilizando EDTA, tanto a temperatura ambiente como a 4°C.
6. Inmunohistoquímicamente se demostró la presencia de antígenos de calretinina, HSP70 y nNOs en neuronas del ganglio espiral de cuatro cetáceos odontocetos de tres especies diferentes (*Tursiops truncatus*, *Kogia breviceps* y *Delphinus delphis*), lo que abre futuras investigaciones sobre la utilización de estos biomarcadores en casos de contaminación acústica.

7.2 Summary

The biosonar system and more specifically, the inner ear of cetaceans continues to be one of the main research areas of this group of marine mammals, linked to their evolutionary biology, anatomy, physiology and pathology, and more recently to the increasing role of underwater noise pollution as a potential cause of ear damage.

The spiral ganglion represents a fundamental part of the nervous aspect of the ear of odontocete cetaceans, playing a fundamental role in the transmission of sound, and therefore in the hearing of these mammals. The spiral ganglion is located in the inner ear, which in these animals is located inside the tympanic portion of the tympanic-periosteal complex, which is mainly composed of bone tissue. Therefore, in order to correctly study this structure, it is paramount to perform a correct and balanced decalcification process of the structures of the inner ear.

Hence, the main objective of this doctoral thesis was to improve and standardize the decalcification protocols for the bone structures that house the inner ear of odontocete cetaceans in order to carry out the morphological and immunohistochemical study of the spiral ganglion of these marine mammals.

For this, 34 ears from cetaceans were used, which underwent 9 different decalcification protocols, using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), formic acid and Histofix® decalcifier 3 at different concentrations and temperatures. The samples obtained were embedded in paraffin for cutting using a conventional microtome or directly subjected to cutting in a cryostat.

The conclusions of the present doctoral thesis were:

1. The protocols that use EDTA require longer decalcification times of the inner ear, unlike the protocols that use Histofix® decalcifier 3, which showed the shorter times for this process of the inner ear of odontocete cetaceans.
2. The increase in temperature in protocols using EDTA, shortens the decalcification time of the inner ear of the odontocete cetaceans studied.
3. The use of Histofix® decalcifier 3 and EDTA at room temperature, facilitated decalcification, preserving the proper structure of the cochlea, for inclusion in paraffin

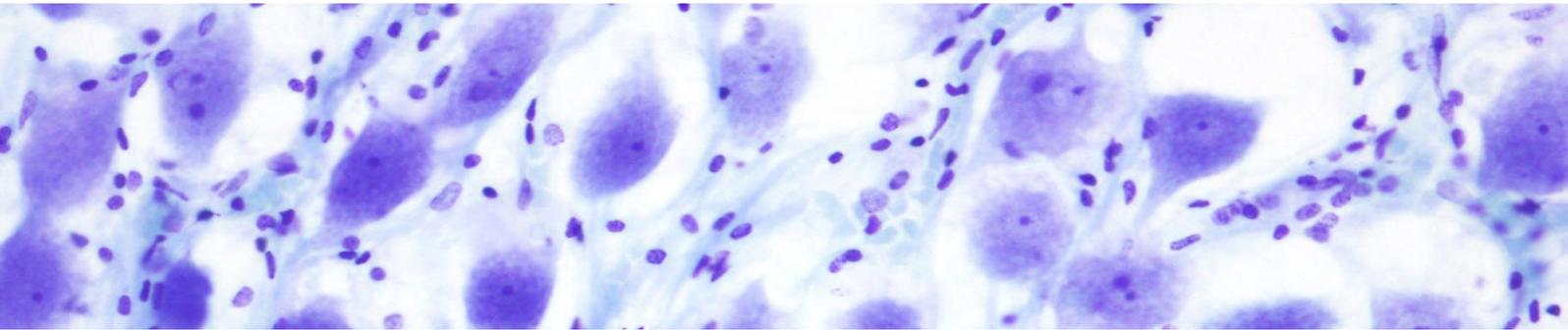
and / or use in cryostat, compared to protocols that used EDTA at 4°C or formic acid at room temperature.

4. The EDTA-based decalcification protocols offered the best tissue morphology for the microscopic study of the different components of the spiral ganglion.

5. The best protocol for antigen maintenance (quantity) and its immunohistochemical detection (quality) was that in which the samples were decalcified using EDTA, both at room temperature and at 4°C.

6. Immunohistochemically, the presence of calretinin antigens, HSP70 and nNOs was demonstrated in neurons of the spiral ganglion of four cetaceans odontocetes of three different species (*Tursiops truncatus*, *Kogia breviceps* and *Delphinus delphis*), which opens future research on the use of these biomarkers in cases of noise pollution.

8. Abreviaturas



Ac: Anticuerpo

AF: Ácido fórmico

CCE: Células ciliadas externas

CCI: Células ciliadas internas

CGS: Células gliales satélite

CTP: Complejo tímpano-periótico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

Fig.: Figura

GE: Ganglio espiral

HE: Hematoxilina-Eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

IUSA: Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

MAE: Meato acústico externo

MT: Membrana tectoria

NGI: Neurona ganglionar tipo I

NGII: Neurona ganglionar tipo II

OC: Órgano de Corti

PM: Postmortem

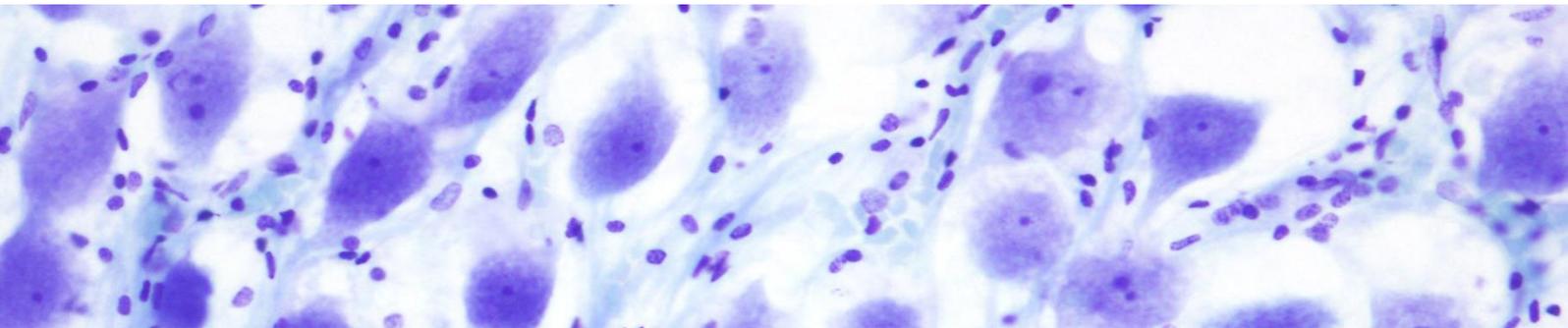
SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

Ta: Temperatura ambiente

TE: Trompa de Eustaquio

9. Referencias



- Akizuki, H., Yoshie, H., Morita, Y., Takahashi, K., Hara, A., Watanabe, T., ... Kusakari, J. (1995). Nuclear transition of heat shock protein in guinea pig cochlea after hyperthermia. *Hearing Research*, 92(1-2), 126-130.
- Alberti, P. W. (2001). The anatomy and physiology of the ear and hearing. *Occupational Exposure to Noise: Evaluation, Prevention, and Control*, 53-62.
- Altschuler, R. A., Fairfield, D., Cho, Y., Leonova, E., Benjamin, I. J., Miller, J. M., y Lomax, M. I. (2002). Stress pathways in the rat cochlea and potential for protection from acquired deafness. *Audiology and Neurotology*, 7(3), 152-156.
- Alvarado, J. C., Fuentes-Santamaría, V., Gabaldón-Ull, M. C., Jareño-Flores, T., Miller, J. M., y Juiz, J. M. (2016). Noise-induced "Toughening" effect in Wistar rats: enhanced auditory brainstem responses are related to calretinin and nitric oxide synthase upregulation. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10.
- Alvord, L. S., y Farmer, B. L. (1997). Anatomy and orientation of the human external ear. *Journal of the American Academy of Audiology*, 8(6), 383-390.
- Anders, M. V. (1947). Microscopic study of the inner ear of the ataxic rabbit. *Archives of Otolaryngology*.
- André, M., Supin, A., Delory, E., Kamminga, C., Degollada, E., y Alonso, J. M. (2003). Evidence of deafness in a striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *Aquatic Mammals*, 29(1), 3-8.
- Arbelo Hernández, M. A. (2007). *Patología y causas de la muerte de los cetáceos varados en las Islas Canarias (1999-2005)*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Armstrong, J. N., Plumier, J. C., Robertson, H. A., y Currie, R. W. (1996). The inducible 70,000 molecular weight heat shock protein is expressed in the degenerating dentate hilus and piriform cortex after systemic administration of kainic acid in the rat. *Neuroscience*, 74(3), 685-693.
- Arnold, W. (1988). Immunohistochemical investigation of the human inner ear. *Acta oto-laryngologica*.
- Arora, D. K., Cosgrave, A. S., Howard, M. R., Bubb, V., Quinn, J. P., y Thippeswamy, T. (2007). Evidence of postnatal neurogenesis in dorsal root ganglion: role of nitric oxide and neuronal restrictive silencer transcription factor. *Journal of Molecular Neuroscience*, 32(2), 97-107.
- Aroyan, J. L., McDonald, M. A., Webb, S. C., Hildebrand, J. A., Clark, D., Laitman, J.

T., y Reidenberg, J. S. (2000). Acoustic models of sound production and propagation. En *Hearing by whales and dolphins* (pp. 409-469). Springer, New York, NY.

Balogh, K. J., y Nomura, Y. (1964). A technique for the demonstration of acetylcholinesterase activity in the inner ear after decalcification with EDTA. *Journal of Histochemistry y Cytochemistry*, 12(12), 931-933.

Beauregard, H. (1894). Recherches sur l'appareil auditif chez les mammifères. *Journal de l'anatomie et de la physiologie normales*, 30, 366-413.

Begall, S., Lange, S., Schleich, C. E., y Burda, H. (2007). Acoustics, audition and auditory system. En *Subterranean Rodents: News from Underground* (pp. 97-111). Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin, Heidelberg.

Békésy, G. V. (1949). The structure of the middle ear and the hearing of one's own voice by bone conduction. *Journal of the Acoustical Society of America*, 21(3), 217-232.

Berglund, A. M., y Ryugo, D. K. (1986). A monoclonal antibody labels type II neurons of the spiral ganglion. *Brain Research*, 383(1-2), 327-332.

Berta, A., Sumich, J. L., y Kovacs, K. M. (2006). *Marine mammals: evolutionary biology* (Second). Elsevier Inc.

Berta, A., Sumich, J. L., y Kovacs, K. M. (2015). *Marine Mammals: evolutionary biology* (Third). Elsevier.

Boenninghaus, G. (1903). *Das ohr des zahnwales, zugleich ein beitrag zur theorie der schalleitung: eine biologische studie*. Fischer.

Brill, R. L., Moore, P. W. B., y Helweg, D. A. (2001). *Investigating the dolphin's peripheral hearing system: acoustic sensitivity about the head and lower jaw*. San Diego, CA: SPAWAR Systems Center.

Brill, R. L., Sevenich, M. L., Sullivan, T. J., Sustman, J. D., y Witt, R. E. (1988). Behavioral evidence for hearing through the lower jaw by an echolocating dolphin (*Tursiops truncatus*). *Marine Mammal Science*, 4(3), 223-230.

Brown, M. C., Berglund, A. M., Kiang, N. Y. ., y Ryugo, D. K. (1988). Central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 278(4), 581-590.

Bruce, A., y Fraser, J. S. (1910). A case presenting Ménière's symptoms along with facial paralysis. *The Journal of Laryngology y Otology*, 25(8), 172-183.

Bruns, V. (1976). Peripheral auditory tuning for fine frequency analysis by the CF-FM

- bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. *Journal of Comparative Physiology*, 106(1), 77-86.
- Bruns, V., y Schmieszek, E. (1980). Cochlear innervation in the greater horseshoe bat: demonstration of an acoustic fovea. *Hearing Research*, 3(1), 27-43.
- Bullock, T. H., Grinnell, A. D., Ikezono, F., Kameda, K., Katsuki, Y., Nomoto, M., ... Yanagisava, K. (1968). Electrophysiological studies of central auditory mechanisms in cetaceans. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 59(2), 117-156.
- Burda, H., Fiedler, J., y Bruns, V. (1988). The receptor and neuron distribution in the cochlea of the bat, *Taphozous kachhensis*. *Hearing Research*, 32(2-3), 131-135.
- Burel, C., Mezger, V., Pinto, M., Rallu, M., Trigon, S., y Morange, M. (1992). Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*, 48(7), 629-634.
- Callis, G. M. (2008). Bone. En J. D. Bancroft y M. Gamble (Eds.), *Theory and practice of histological techniques* (sixth, pp. 333-363). Philadelphia, USA: Elsevier Health Sciences.
- Callis, G., y Sterchi, D. (1998). Decalcification of bone: literature review and practical study of various decalcifying agents. Methods, and their effects on bone histology. *Journal of Histotechnology*, 21(1), 49-58.
- Camphuysen, K., Smeenk, C., Addink, M., van Grouw, H., y Jansen, O. E. (2008). Cetaceans stranded in the Netherlands from 1998 to 2007. *Lutra*, 51(2), 87-122.
- Carpenter, W. B. (1847). Report on the microscopic structure of shells. *British Association Report*, 115, 93-94.
- Carricondo, F., y Romero-Gómez, B. (2019). The cochlear spiral ganglion neurons: the auditory portion of the VIII nerve. *The Anatomical Record*, 302, 463-471.
- Celesia, G. G. (Ed.). (2013). *Disorders of peripheral and central auditory processing*. Elsevier Health Sciences.
- Choi, S.-E., Hong, S. W., y Yoon, S. O. (2015). Proposal of an appropriate decalcification method of bone marrow biopsy specimens in the era of expanding genetic molecular study. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 49(3), 236-242.
- Choube, A., Astekar, M., Choube, A., Sapra, G., Agarwal, A., y Rana, A. (2018). Comparison of decalcifying agents and techniques for human dental tissues. *Biotechnic and Histochemistry*, 93(2), 99-108.
- Climent Peris, S., Sarasa Barrio, M., Muniesa Lorda, P., y Terrado Vicente, J. (1998).

Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Conceptos básicos y datos aplicativos. Sistema nervioso central y órganos de los sentidos. Zaragoza, España: Acribia, S. A.

Costidis, A. M., y Rommel, S. A. (2016a). The extracranial arterial system in the heads of beaked whales, with implications on diving physiology and pathogenesis. *Journal of Morphology*, 277(1), 34-64.

Costidis, A. M., y Rommel, S. A. (2016b). The extracranial venous system in the heads of beaked whales, with implications on diving physiology and pathogenesis. *Journal of Morphology*, 277(1), 34-64.

Costidis, A., y Rommel, S. A. (2012). Vascularization of air sinuses and fat bodies in the head of the Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): morphological implications on physiology. *Frontiers in Physiology*, 3.

National Research Council (2005). *Marine mammal populations and ocean noise. Determining when noise causes biological effects.* Washington, DC: National Academies Press.

Cozzi, B., Huggenberger, S., y Oelschläger, H. (2017). *Anatomy of dolphins, insights into body structure and function.* Elsevier Inc.

Cranford, T. W., Krysl, P., y Amundin, M. (2010). A new acoustic portal into the odontocete ear and vibrational analysis of the tympanoperiotic complex. *PLoS ONE*, 5(8).

Cranford, T. W., Krysl, P., y Hildebrand, J. A. (2008a). Acoustic pathways revealed : simulated sound transmission and reception in Cuvier ' s beaked whale (*Ziphius cavirostris*). *Bioinspiration y Biomimetics*, 3(1).

Cranford, T. W., Krysl, P., y Hildebrand, J. A. (2008b). Acoustic pathways revealed: simulated sound transmission and reception in Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*). *Bioinspiration and Biomimetics*, 3(1).

Cranford, T. W., McKenna, M. F., Soldevilla, M. S., Wiggins, S. M., Goldbogen, J. A., Shadwick, R. E., ... Hildebrand, J. A. (2008). Anatomic geometry of sound transmission and reception in Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*). *Anatomical Record*, 291(4), 353-378.

Cranford, T. W., Trijoulet, V., Smith, C. R., y Krysl, P. (2014). Validation of a vibroacoustic finite element model using bottlenose dolphin simulations: The dolphin biosonar beam is focused in stages. *Bioacoustics*, 23(2), 161-194.

- Cunningham, C. D., Schulte, B. A., Bianchi, L. M., Weber, P. C., y Schmiedt, B. N. (2001). Microwave decalcification of human temporal bones. *Laryngoscope*, 111(2), 278-282.
- Currie, R. W., Ellison, J. A., White, R. F., Feuerstein, G. Z., Wang, X., y Barone, F. C. (2000). Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. *Brain research*, 863(1-2), 169-181.
- De Vreese, S., André, M., Cozzi, B., Centellegue, C., van der Schaar, M., y Mazzariol, S. (2020). Morphological evidence for the sensitivity of the ear canal of odontocetes as shown by immunohistochemistry and transmission electron microscopy. *Scientific Reports*, 10(1), 1-17.
- Díaz-Delgado, J. (2015). *Patología y causas de la muerte de los cetáceos varados en las Islas Canarias (2006-2012)*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Donaldson, J. A., y Miller, J. M. (1980). Anatomy of the ear. *Otolaryngology*, 1, 23-58.
- Dreschfeld, J. (1880). Case of cerebellar tumour (Psammo-sarcoma). *Journal of Anatomy and Physiology*, 14(Pt3), 337-345.
- Dudok van Heel, W. H. (1962). Sound and cetacea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 1(4), 407-507.
- Echteler, S. M., Fay, R. R., y Popper, A. N. (1994). Structure of the mammalian cochlea. En *Comparative Hearing: Mammals* (pp. 134-172). Springer, New York, NY.
- Ekdale, E. G. (2016). Form and function of the mammalian inner ear. *Journal of Anatomy*, 228(2), 324-337.
- Ekdale, E. G., y Racicot, R. A. (2015). Anatomical evidence for low frequency sensitivity in an archaeocete whale: comparison of the inner ear of *Zygorhiza kochii* with that of crown Mysticeti. *Journal of Anatomy*, 226(1), 22–39.
- Eliasson, M. J., Huang, Z., Ferrante, R. J., Sasamata, M., Molliver, M. E., Snyder, S. H., y Moskowitz, M. A. (1999). Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *The Journal of Neuroscience*, 19(14), 5910-5918.
- Escolar, J., Smith Agreda, V., Amat, P., Smith Agreda, J. M., Sarrat, R., y Rodríguez, S. (1978). *Anatomía humana III*. Barcelona: Espaxs.
- Evans, N., y Krajian, A. (1930). New method of decalcification. *Arch. Path.*, 10, 447.
- Eybalin, M. (1993). Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiological Reviews*, 73(2), 309-373.

Fairfield, D. A., Kanicki, A. C., Lomax, M. I., y Altschuler, R. A. (2002). Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea. *Hearing Research*, 173(1-2), 109-118.

Fairfield, D. A., Lomax, M. I., Dootz, G. A., Chen, S., Galecki, A., Benjamin, I. J., ... Altschuler, R. A. (2005). Heat shock factor 1-deficient mice exhibit decreased recovery of hearing following noise overstimulation. *Journal of Neuroscience Research*, 81(4), 589-596.

Fajardo-Mellor, L., Berta, A., Brownell, R. L., Boy, C. C., y Natalie, R. (2006). The phylogenetic relationships and biogeography of true porpoises (Mammalia: Phocoenidae) based on morphological data. *Marine Mammal Science*, 22(4), 910-932.

Farrel, S. F., Osmotherly, P. G., Rivett, D. A., y Cornwall, J. (2015). Formic acid demineralization does not affect the morphometry of cervical zygapophyseal joint meniscoids. *Anatomical Science International*, 90(1), 57-63.

Fernández, A., Edwards, J. F., Rodríguez, F., Espinosa de los Monteros, A., Herráez, P., Castro, P., ... Arbelo, M. (2005). "Gas and fat embolic syndrome" involving a mass stranding of beaked whales (family Ziphiidae) exposed to anthropogenic sonar signals. *Veterinary Pathology*, 42(4), 446-457.

Fessenden, J. D., Altschuler, R. A., Seasholtz, A. F., y Schacht, J. (1999). Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in the peripheral and central auditory system of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 404(1), 52-63.

Finneran, J. J., Carder, D. A., Dear, R., Belting, T., McBain, J., Dalton, L., y Ridgway, S. H. (2005). Pure tone audiograms and possible aminoglycoside-induced hearing loss in belugas (*Delphinapterus leucas*). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 117(6), 3936-3943.

Fleischer, G. (1976). Hearing in extinct cetaceans as determined by cochlear structure. *Journal of paleontology*, 50(1), 133-152.

Fleischer, G. (1978). Evolutionary principles of the mammalian middle ear. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 55, 3-70.

Fraser, F. C., y Purves, P. E. (1954). Hearing in cetaceans. *British Museum (Natural History)*.

Fraser, F. C., y Purves, P. E. (1960a). Anatomy and function of the cetacean ear. En *Proceedings of the Royal Society of London* (Vol. 152, pp. 62-77). Series B, Biological Sciences.

- Fraser, F. C., y Purves, P. E. (1960b). Hearing in cetaceans: evolution of the accessory air sacs and the structure and function of the outer and middle ear in recent cetaceans. *Bulletin of the British Museum (Natural History). Zoology*, 7(1).
- Fraser, J. S. (1908). Chronic inflammatory edema of the submucous tissues of the nose. *The Journal of Laryngology y Otology*, 23(8), 246-254.
- Fraser, T. (1912). The pathology of tuberculosis of bones. *Journal of Microbiology and Pathology*, 254.
- Gao, G., y Zhou, K. (1992). Fiber analysis of the optic and cochlear nerves of small cetaceans. En J. A. Thomas, R. A. Kastelein, y A. Y. Supin (Eds.), *Marine Mammal Sensory Systems* (pp. 39-52). New York: Plenum Press.
- Gao, G., y Zhou, K. (1995). Fiber analysis of the vestibular nerve of small cetaceans. En R. A. Kastelein, J. A. Thomas, y P. E. Nachtigall (Eds.), *Sensory Systems of Aquatic Mammals* (pp. 447-453). Woerden: DeSpil.
- Gartner, L. P. (2017). *Textbook of histology* (Fourth). Philadelphia, USA: Elsevier Inc.
- Geisler, J. H., y Luo, Z. (1996). The petrosal and inner ear of *Herpetocetus* sp. (Mammalia: Cetacea) and their implications for the phylogeny and hearing of archaic mysticetes. *Journal of Paleontology*, 70(6), 1045–1066.
- Geisler, J. H., y Luo, Z. (1998). Relationships of cetacea to terrestrial ungulates and the evolution of cranial vasculature in cete. En *The emergence of whales: evolutionary patterns in the origin of Cetacea* (pp. 163-212). Boston: Springer, Boston, MA.
- Gelfand, S. A. (1998). *Hearing: an introduction to psychological and physiological acoustics*. New York: Marcel Decker.
- Girdlestone, C. D., Piscitelli-Doshkov, M. A., Ostertag, S. K., Morell, M., y Shadwick, R. E. (2017). Description of cochlear morphology and hair cell variation in the beluga whale. *Arctic Science*, 4(3), 1-13.
- Gong, S. S., y Yan, Z. (2002). Expression of heat shock protein 70 in the cochlea in experimental autoimmune inner ear disease. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 111(3), 275-280.
- Gosepath, K., Gath, I., Maurer, J., Pollock, J. S., Amedee, R., Förstermann, U., y Mann, W. (1997). Characterization of nitric oxide synthase isoforms expressed in different structures of the guinea pig cochlea. *Brain Research*, 747(1), 26-33.
- Gower, V. C., y Thompson, A. M. (1997). Localization of inducible heat shock protein mRNA in the guinea pig cochlea with a nonradioactive in situ hybridization technique.

Laryngoscope, 107(2), 228-232.

Gray, H., y Lewis, W. H. (1918). *Anatomy of the human body* (Twentieth). Philadelphia: Lea y Febiger.

Guild, S. R., Crowe, S. J., Bunch, C. C., y Polvogt, L. M. (1931). Correlations of Differences in the Density of Innervation of the Organ of Corti with Differences in the Acuity of Hearing. *Acta Oto-Laryngol.*, 15, 269-308.

Guyton, A. C., y Hall, J. E. (2016). *Tratado de fisiología médica*. Elsevier.

Hahn, F. L., y Reygadas, F. (1951). Demineralization of hard tissues. *Science*, 114(2966), 462-463.

Hansson, B., y Nylén, C. O. (1936). Microscopical investigations of the middle and internal ear in cerebral tumours in man. *Acta Oto-Laryngologica*.

Harris, J. D. (1986). Anatomy and physiology of the peripheral auditory mechanism. *Pro Ed*.

Hemilä, S., Nummela, S., y Reuter, T. (2010). Anatomy and physics of the exceptional sensitivity of dolphin hearing (Odontoceti: Cetacea). *Journal of Comparative Physiology A*, 196(3), 165-179.

Higgins, D. P., y Noad, M. J. (2006). Standardised protocols for the collection of biological samples from stranded cetaceans. Department of the Environment and Heritage, Australian Government, Australia.

Hillemann, H. H., y Lee, C. . H. (1953). Organic chelating agents for decalcification of bones and teeth. *Stain technology*, 28(6), 285-287.

Hoelzel, A. R. (Ed.). (2002). *Marine mammal biology: an evolutionary approach*. John Wiley y Sons.

Houser, D. S., Finneran, J., Carder, D., Van Bonn, W., Smith, C., Hoh, C., ... Ridgway, S. (2004). Structural and functional imaging of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) cranial anatomy. *The Journal of Experimental Biology*, 207(21), 3657-3665.

Hsu, S. M., Raine, L., y Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29(4), 577-580.

Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in Neurosciences*, 20(3), 132-139.

- IJsseldijk, L. L., Brownlow, A. C., y Mazzariol, S. (2019). Best practice for cetacean post mortem investigation and tissue sampling. En *25th Meeting of the Advisory Committee*. Stralsund, Germany: Joint ACCOBAMS and ASCOBANS document.
- Jepson, P. D., Prah, S., Deaville, R., y Siebert, U. (2006). Postmortem research feasibility study on cetacean ears. *Final report to the Department for Environment, Food and Rural Affairs*.
- Jimson, S., Balachander, N., Masthan, K. M. K., y Elumalai, R. (2014). A comparative study in bone decalcification using different decalcifying agents. *International Journal of Science and Research*, 3(8), 1226-1229.
- Johnson, S. B., Schmitz, H. M., y Santi, P. A. (2011). TSLIM imaging and a morphometric analysis of the mouse spiral ganglion. *Hearing Research*, 278(1-2), 34-42.
- Jorgensen, M. B. (1961). Changes of aging of the inner ear: histological studies. *Archives of Otolaryngology*, 74(2), 164-170.
- Kalkandelen, S., Selimoğlu, E., Erdoğan, F., Üçüncü, H., y Altaş, E. (2002). Comparative cochlear toxicities of streptomycin , gentamicin , amikacin and netilmicin in guinea-pigs. *The Journal International Medical Research*, 30(4), 406-412.
- Ketten, D. R. (1984). *Correlations of morphology with frequency for odontocete cochlea: systemics and topology*. Johns Hopkins University.
- Ketten, D. R. (1992). The marine mammal ear: specializations for aquatic audition and echolocation. En *The Evolutionary Biology of Hearing* (pp. 717-750). Springer New York.
- Ketten, D. R. (1997). Structure and function in whale ears. *Bioacoustics*, 8(1-2), 103-135.
- Ketten, D. R. (2000). Cetacean ears. En *Hearing by whales and dolphins* (pp. 43-108). New York: Springer, New York, NY.
- Ketten, D. R., Skinner, M., Wang, G., Vannier, M., Gates, G., y Neely, G. (1998). In vivo measures of cochlear length and insertion depths of nucleus cochlear implant electrode arrays. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*, 175(11), 1-16.
- Kiang, N. Y. S., Liberman, M. C., Gage, J. G., Northrop, C. C., Dodds, L. W., y Oliver, M. E. (1984). Afferent innervation of the mammalian cochlea. En *Comparative Physiology of the Sensory Systems*. (pp. 143-161). Cambridge: Cambridge University Press.

- Kiang, N. Y. S., Rho, J. M., Northrop, C. C., Liberman, M. C., y Ryugo, D. K. (1982). Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *American Association for the Advancement of Science*, 217(4555), 175-177.
- Kimura, R. S. (1966). Hairs of the cochlear sensory cells and their attachment to the tectorial membrane. *Acta Oto-Laryngologica*, 61(1-6), 55-72.
- Kimura, R. S., Ota, C. Y., Schuknecht, H. F., y Takahashi, T. (1976). Electron microscopic cochlear observations in bilateral Ménière's disease. *Annals of Otology, Rhinology y Laryngology*, 85(6), 791-801.
- King, W. (1871). On the histology of the test of the class palliobranchiata. *The Transactions of the Royal Irish Academy*, 24, 439-456.
- Kojo, Y. (1954). The morphological studies of the human tympanic membrane. *The Journal of the Oto-rhino-Laryngological Society of Japan*, 57(2), 115-122.
- König, H. E., y Liebich, H. G. (Eds.). (2013). *Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas*. New York: Schattauer.
- Kössl, M., y Vater, M. (1995). Cochlear structure and function in bats. En A. N. Popper y R. R. Fay (Eds.), *Hearing by Bats* (pp. 191-235). New York: Springer-Verlag.
- Krause, W. J. (2005). *Krause 's essential human histology for medical students* (Third). Columbia, Missouri: Universal-Publishers.
- Kristensen, H. K. (1948). An improved method of decalcification. *Stain technology*, 23(3), 151-154.
- Krueger, A. M. R., Armstrong, J. N., Plumier, J. C., Robertson, H. A., y Currie, R. W. (1999). Cell specific expression of Hsp70 in neurons and glia of the rat hippocampus after hyperthermia and kainic acid-induced seizure activity. *Molecular Brain Research*, 71(2), 265-278.
- Kuiken, T., y García-Hartmann, M. (1991). Dissection techniques and tissue sampling. En *Proceedings of the first ECS workshop on Cetacean Pathology*. (p. Newsletter nº17-Special Issue). Leiden, Netherlands.
- Ladhams, A., y Pickles, J. O. (1996). Morphology of the monotreme organ of Corti and macula lagena. *Journal of Comparative Neurology*, 366(2), 335-347.
- Lee, K. J. (2009). *Essential otolaryngology and head and neck surgery* (Ninth). New York: McGraw-Hill Publishing.
- Lewis, E. R., Leverenz, E. L., y Bialek, W. S. (1985). *The vertebrate inner ear*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.

- Lillie, R. D. (1944). Studies on the decalcification of bone. *The American Journal of Pathology*, 20(2), 291-296.
- Lim, D. J. (1970). Human tympanic membrane: an ultrastructural observation. *Acta Oto-Laryngologica*, 70(3), 176-186.
- Lim, D. J. (1972). Fine morphology of the tectorial membrane: its relationship to the organ of Corti. *Archives of Otolaryngology*, 96(3), 199-215.
- Liu, H., Zhu, R., Liu, C., Ma, R., Wang, L., Chen, B., ... Gao, S. (2017). Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining. *BioMed Research International*, 2017.
- Liu, W., y Davis, R. L. (2014). Calretinin and calbindin distribution patterns specify subpopulations of type I and type II spiral ganglion neurons in postnatal murine cochlea. *Journal of Comparative Neurology*, 522(10), 2299-2318.
- Lopez, I. A., Ishiyama, G., Hosokawa, S., Hosokawa, K., Acuna, D., Linthicum, F. H., y Ishiyama, A. (2016). Immunohistochemical techniques for the human inner ear. *Histochemistry and Cell Biology*, 146(4), 389.
- Lorente de No, R. (1933a). Anatomy of the eighth nerve. General plan of structure of the primary cochlear nuclei. *Laryngoscope*, 43(4), 327-350.
- Lorente de No, R. (1933b). Anatomy of the eighth nerve. The central projection of the nerve endings of the internal ear. *Laryngoscope*, 43(1), 1-38.
- Luo, Z., y Eastman, E. R. (1995). Petrosal and inner ear of a squalodontoid whale: implications for evolution of hearing in odontocetes. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 15(2), 431-442.
- Luo, Z., y Marsh, K. (1996). Petrosal (periotic) and inner ear of a Pliocene kogiine whale (Kogiinae, Odontoceti): implications on relationships and hearing evolution of toothed whales. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 16(2), 328-348.
- Lyon, M. F. (1958). Twirler: a mutant affecting the inner ear of the house mouse. *Development*, 6(1), 105-116.
- Maguire, R. (1881). On the histology of some of the rarer forms of malignant bone tumours. *Journal of anatomy and physiology*, 15(Pt3), 405-421.
- Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z. G., y Chopp, M. (1993). Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(3), 355-358.
- Manley, G. A. (2000). Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(22), 11736-11743.

Mann, D., Hill-Cook, M., Manire, C., Greenhow, D., Montie, E., Powell, J., ... Hoetjes, P. (2010). Hearing loss in stranded odontocete dolphins and whales. *PLoS ONE*, 5(11), 1-5.

Manzerra, P., Rush, S. J., y Brown, I. R. (1997). Tissue-specific differences in heat shock protein hsc70 and hsp70 in the control and hyperthermic rabbit. *Journal of cellular physiology*, 170(2), 130-137.

Maroonroge, S., Emanuel, D. C., y Letowski, T. R. (2000). Basic anatomy of the hearing system. En *Helmet-Mounted Displays: Sensation, Perception and Cognition Issues*. (pp. 279–306). Fort Rucker, Alabama: U.S. Army Aeromedical Research Laboratory: Helmet-Mounted Displays: Sensation, Perception and Cognition Issues.

Masliukov, P. M., Emanuilov, A. I., Madalieva, L. V., Moiseev, K. Y., Bulibin, A. V., Korzina, M. B., ... Smirnova, V. P. (2014). Development of nNOS-positive neurons in the rat sensory and sympathetic ganglia. *Neuroscience*, 256, 271-281.

Maxia, C., Scano, P., Maggiani, F., Murtas, D., Piras, F., Crnjar, R., ... Sirigu, P. (2007). A morphological and ¹³C NMR study of the extramandibular fat bodies of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *The Anatomical Record*, 290(7), 913-919.

McCormick, J. G., Wever, E. G., Palin, J., y Ridgway, S. H. (1970). Sound conduction in the dolphin ear. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 48(6 (Pt2)), 1418-1428.

Mead, J. G., y Fordyce, R. E. (2009). The therian skull: a lexicon with emphasis on the odontocetes. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 627, 1-248.

Mikuriya, T., Sugahara, K., Sugimoto, K., Fujimoto, M., Takemoto, T., Hashimoto, M., ... Yamashita, H. (2008). Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. *Brain Research*, 1212, 9-17.

Miller, G. S. (1923). The telescoping of the cetacean skull (with eight plates). *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 76(5).

Møhl, B., Au, W. W. L., Pawloski, J., y Nachtigall, P. E. (1999). Dolphin hearing: relative sensitivity as a function of point of application of a contact sound source in the jaw and head region. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 105(6), 3421-3424.

Mooney, T. A., Nachtigall, P. E., Castellote, M., Taylor, K. A., Pacini, A. F., y Esteban,

- J. A. (2008). Hearing pathways and directional sensitivity of the beluga whale, *Delphinapterus leucas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 362(2), 108-116.
- Mooney, T. A., Yamato, M., y Branstetter, B. K. (2012). *Hearing in cetaceans: from natural history to experimental biology. Advances in Marine Biology* (1.^a ed., Vol. 63). London, United Kingdom: Elsevier Ltd.
- Morell, M. (2012). *Ultrastructural analysis of odontocete cochlea*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Morell, M., y André, M. (2009). Cetacean ear extraction and fixation protocol. En *European Cetacean Society Conference*. Istanbul.
- Morell, M., Brownlow, A., McGovern, B., Raverty, S. A., Shadwick, R. E., y André, M. (2017). Implementation of a method to visualize noise-induced hearing loss in mass stranded cetaceans. *Scientific Reports*, 7, 1-8.
- Morell, M., Lehnert, K., Ijsseldijk, L. L., Raverty, S. A., Wohlsein, P., Gröne, A., ... Shadwick, R. E. (2017). Parasites in the inner ear of harbour porpoise: cases from the North and Baltic seas. *Diseases of Aquatic Organisms*, 127(1), 57-63.
- Morgane, P. J., y Jacobs, J. S. (1972). Comparative anatomy of the cetacean nervous system. En *Functional Anatomy of Marine Mammals, Vol. 1* (pp. 117-224). New York: Academic Press.
- Muniak, M. A., Connelly, C. J., Suthakar, K., Milinkeviciute, G., Ayeni, F. E., y Ryugo, D. K. (2016). Central projections of spiral ganglion neurons. En *The primary auditory neurons of the mammalian cochlea* (pp. 157-190). New York: Springer New York.
- Nabeya, D. (1923). A study in the comparative anatomy of the blood-vascular system of the internal ear in mammalia and in homo (Japanese). *Jibi inkoka kyoto rinsho*, 16, 1-120.
- Nadol, J. B. (1988). Quantification of human spiral ganglion cells by serial section reconstruction and segmental density estimates. *American Journal of Otolaryngology*, 9(2), 47-51.
- National Research Council. Ocean noise and marine mammals. (2003). Washington, D.C.: National Academies Press.
- Neely, J. G., Thompson, A. M., y Gower, D. J. (1991). Detection and localization of heat shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. *Hearing Research*, 52(2), 403-406.

- Nikiforuk, G., y Sreebny, L. (1951). Demineralization of hard tissues by organic chelating agents at neutral pH. *Science*, 113, 560.
- Norris, K. S. (1964). Some problems of echolocation in cetaceans. *Marine Bioacoustics*, 1, 316-336.
- Norris, K. S. (1968). The evolution of acoustic mechanisms in odontocete cetaceans. *Evolution and Environment*, 297-324.
- Norris, K. S., y Harvey, G. W. (2005). Sound transmission in the porpoise head. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 56(2), 659-664.
- Nummela, S., Reuter, T., Hemila, S., Holmberg, P., y Paukku, P. (1999). The anatomy of the killer whale middle ear (*Orcinus orca*). *Hearing Research*, 133(1-2), 61-70.
- Nummela, S., Thewissen, J. G. M., Bajpai, S., Hussain, T., y Kumar, K. (2007). Sound transmission in archaic and modern whales: anatomical adaptations for underwater hearing. *The Anatomical Record*, 290(6), 716-733.
- Nummela, S., Wägar, T., y Hemilä, S. (1999). Scaling of the cetacean middle ear. *Hearing research*, 133(1-2), 71-81.
- Oh, S. H., Yu, W. S., Song, B. H., Lim, D., Koo, J. W., Chang, S. O., y Kim, C. S. (2000). Expression of heat shock protein 72 in rat cochlea with cisplatin-induced acute ototoxicity. *Acta Oto-Laryngologica*, 120(2), 146-150.
- Onishi, T., Ooshima, T., Sobue, S., Tabata, M. J., Maeda, T., Kurisu, K., y Wakisaka, S. (1999). Immunohistochemical localization of calbindin D28k during root formation of rat molar teeth. *Cell and Tissue Research*, 297(3), 503-512.
- Ota, C. Y., y Kimura, R. S. (1980). Ultrastructural study of the human spiral ganglion. *Acta Oto-Laryngologica*, 89(1-2), 53-62.
- Perrin, W. F., Würsig, B., y Thewissen, J. G. M. (Eds.). (2009). *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press.
- Pickles, J. O. (1988). An introduction to the physiology of hearing. Berkeley: CA: Academic Press.
- Polyak, S. L., McHugh, G., y Judd, D. K. (1946). *The human ear in anatomical transparencies*. Elmsford, NY: Sonotone.
- Prasad, P., y Donoghue, M. (2013). A comparative study of various decalcification techniques. *Indian Journal of Dental Research*, 24(3), 302-308.
- Price, S. A., Bininda-Emonds, O. R. P., y Gittleman, J. L. (2005). A complete

- phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla). *Biological Reviews*, 80(3), 445-473.
- Pritchard, U. (1876). The organ of Corti in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London*, 24(164-170), 345-352.
- Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., y Sobin, L. H. (1992). *Laboratory methods in histotechnology*. Washington, D.C.: American Registry of Pathology.
- Pye, A. (1966a). The megachiroptera and vespertilionoidea of the microchiroptera. *Journal of Morphology*, 119(2), 101-120.
- Pye, A. (1966b). The structure of the cochlea in Chiroptera I. Microchiroptera: Emballonuroidea and Rhinolophoidea. *Journal of Morphology*, 118(4), 495-510.
- Pye, A. (1967). The structure of the cochlea in Chiroptera III. Microchiroptera: Phyllostomatoidea. *Journal of Morphology*, 121(3), 241-254.
- Raphael, Y., y Altschuler, R. A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Research Bulletin*, 60(5-6), 397-422.
- Raphael, Y., Altschuler, R. A., Wever, E. G., McCormick, J. G., Palin, J., Ridgway, S. H., ... Grix, N. (1997). Ultrastructure of the odontocete organ of Corti: scanning and transmission electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 15(4-5), 2381-2385.
- Raphael, Yehosh, Lenoir, M., Wroblewski, R., y Pujol, R. (1991). The sensory epithelium and its innervation in the mole rat cochlea. *Journal of Comparative Neurology*, 314(2), 367-382.
- Rauschmann, M. A., Huggenberger, S., Kossatz, L. S., y Oelschläger, H. H. A. (2006). Head morphology in perinatal dolphins: a window into phylogeny and ontogeny. *Journal of Morphology*, 267(11), 1295-1315.
- Reidenberg, J. S., y Laitman, J. T. (2008). Sisters of the sinuses: cetacean air sacs. *Anatomical Record*, 291(11), 1389-1396.
- Résibois, A., y Rogers, J. H. (1992). Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience*.
- Reynolds, J. E., y Rommel, S. A. (1999). *Biology of marine mammals*. Smithsonian institution press.
- Reysenbach de Hann, F. W. (1957). Hearing in whales. *Acta Otolaryngologica*, 134(1), 1-114.

- Ridgway, S. H., Bullock, T. H., Carder, D. A., Seeley, R. L., Woods, D., y Galambos, R. (1981). Auditory brainstem response in dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(3), 1943-1947.
- Rogers, J. H. (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *Journal of Cell Biology*, 105(3), 1343-1353.
- Rogers, J. H. (1989). Two calcium-binding proteins mark many chick sensory neurons. *Neuroscience*, 31(3), 697-709.
- Romano, T. A., Keogh, M. J., Kelly, C., Feng, P., Berk, L., Schlundt, C. E., ... Finneran, J. J. (2004). Anthropogenic sound and marine mammal health: measures of the nervous and immune systems before and after intense sound exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(7), 1124-1134.
- Rommel, S., Costidis, A., Fernandez, A., Jepson, P., Pabst, D., Houser, D., ... Barros, N. (2006). Elements of beaked whale anatomy and diving physiology and some hypothetical causes of sonar-related stranding. *Journal of Cetacean Research and Management*, 7(3), 189-209.
- Sandoval, J. (2003). *Tratado de anatomía veterinaria. Tomo IV: Tegumento, órganos de los sentidos, sistema nervioso central y anatomía de las aves*. León, Spain: Imprenta Sorles.
- Sassu, R., y Cozzi, B. (2007). The external and middle ear of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* (Meyen 1833). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 36(3), 197-201.
- Savi, F. M., Brierly, G. I., Baldwin, J., Theodoropoulos, C., y Woodruff, M. A. (2017). Comparison of different decalcification methods using rat mandibles as a model. *Journal of Histochemistry y Cytochemistry*, 65(12), 705-722.
- Schaffer, J. (1902). Versuche mit entkalkungsflüssigkeiten. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Mikroskopie*, 19, 808.
- Schuknecht, H. F. (1993). *Pathology of the ear* (Second). Philadelphia: Lea y Febiger.
- Sensor, J. D., Suydam, R., George, J. C., Liberman, M. C., Lovano, D., Rhaganti, M. A., ... Thewissen, J. G. M. (2015). The spiral ganglion and Rosenthal's canal in beluga whales. *Journal of Morphology*, 276(12), 1455-1466.
- Sharma, K., Seo, Y. W., y Yi, E. (2018). Differential expression of Ca²⁺-buffering protein calretinin in cochlear afferent fibers: a possible link to vulnerability to traumatic noise. *Experimental Neurobiology*, 27(5), 397-407.

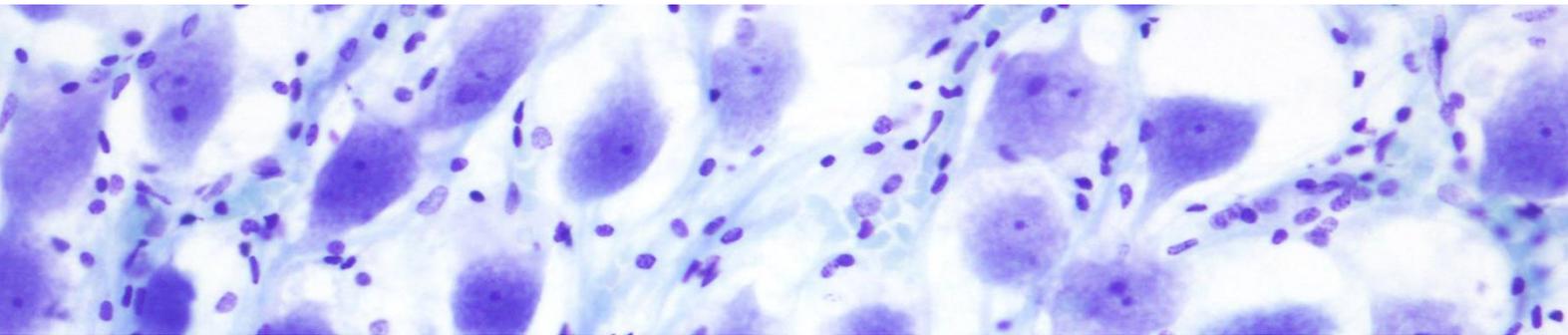
- Shennib, A., y Urso, R. C. (2000). 6,137,889. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Shibata, Y., Fujita, S., Takahashi, H., Yamaguchi, A., y Koji, T. (2000). Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. *Histochemistry and Cell Biology*, 113(3), 153-159.
- Slepecky, N. Y. (1996). Cochlear structure. En P. Dallos, A. N. Popper, y R. R. Fay (Eds.), *The Cochlea* (pp. 44-129). New York: Springer-Verlag.
- Solntseva, G. N. (2007). *Morphology of the auditory and vestibular organs in mammals, with emphasis on marine species*. Sofia, Bulgaria: Pensoft Publishers y Brill Academic Publishers.
- Song, Z., Zhang, Y., Mooney, T. A., Wang, X., Smith, A. B., y Xu, X. (2019). Investigation on acoustic reception pathways in finless porpoise (*Neophocaena asiorientalis sunameri*) with insight into an alternative pathway. *Bioinspiration and Biomimetics*, 14(1).
- Spoendlin, H. (1971). Degeneration behaviour of the cochlear nerve. *Archiv für Klinische und Experimentelle Ohren- Nasen- und Kehlkopfheilkunde*, 200(4), 275-291.
- Spoendlin, H. (1973). The innervation of the cochlear receptor. En *Basic mechanisms in hearing* (pp. 185-234). New York: Academic Press.
- Steel, K. P. (1983). The tectorial membrane of mammals. *Hearing Research*, 9(3), 327-359.
- Stocker, M. (2013). *Hear where we are*. Lagunitas, CA, USA: Springer New York.
- Stone, M., y Fulghum, R. S. (1984). Bactericidal activity of wet cerumen. *Annals of Otolaryngology, Rhinology y Laryngology*, 93(2), 183-186.
- Sugahara, K., Inouye, S., Izu, H., Katoh, Y., Katsuki, K., Takemoto, T., ... Nakai, A. (2003). Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hearing Research*, 182(1-2), 88-96.
- Sun, X., Liang, J., Wang, C., Cao, S., Hu, Y., y Xu, X. (2015). Transient effect of 17 β -estradiol on osteoporosis in ovariectomized rats accompanied with unilateral disuse in the early phase. *International Journal of Medical Sciences*, 12(5), 423-431.
- Sundberg, M. (2008). *Optical methods for tympanic membrane characterisation: towards objective otoscopy in otitis media*. Linköping, Sweden: Linköping Studies in Science and Technology, Dissertation.

- Sysueva, E. V., Nachtigall, P. E., Cranford, T. W., Pacini, A. F., Pawloski, J. L., Allum, C., y Supin, A. Y. (2017). Auditory sensitivity areas of head to local underwater stimulation in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of Meetings on Acoustics*, 30(1).
- Takumida, M., y Anniko, M. (2002). Nitric oxide in the inner ear. *Current Opinion in Neurology*, 15(1), 11-15.
- Tejedor Fuentes, M. L. (2016). *Aportaciones a la osteología y sus anomalías asociadas en los cetáceos menores del archipiélago canario*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Tejedor, M., y Martín, V. (2013). Colección de referencia de cetáceos de las Islas canarias: una herramienta para la investigación y conservación en la macaronesia. En *VI Congreso de la sociedad española de cetáceos*. Tarifa, España.
- Thomas, J. A., Kastelein, R. A., y Supin, A. Y. (1992). *Marine mammal sensory systems*. New York: Plenum Press.
- Thomsen, E. (1966). The ultrastructure of the spiral ganglion in the guinea pig. *Acta Oto-Laryngologica*, 63(sup224), 442-448.
- Treuting, P. M., y Dintzis, S. M. (Eds.). (2012). *Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas*. Elsevier Inc.
- Tricoire, L., y Vitalis, T. (2012). Neuronal nitric oxide synthase expressing neurons: a journey from birth to neuronal circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 1-36.
- Vater, M., y Kössl, M. (2011). Comparative aspects of cochlear functional organization in mammals. *Hearing Research*, 273(1-2), 89-99.
- Vater, M., y Lenoir, M. (1992). Ultrastructure of the horseshoe bat's organ of Corti. I. Scanning electron microscopy. *Journal of Comparative Neurology*, 318(4), 367-379.
- Von Békésy, G. (1960). *Experiments in Hearing*. (E.G. Wever, Ed.). New York: McGraw-Hill Book Company.
- Wallingford, N. M., Frey, J., y Evinger, W. (2018). Comparison of two decalcification agents using microwave technology: a histochemical assessment of the rat cochlea. *Journal of Histotechnology*, 41(3), 124-131.
- Wang, A., Tang, H., Zhang, Z., Lianming, L. I., y Hua, M. U. (2005). Localization and expression of three nitric oxide synthase isoforms in the cochlea of guinea pigs and the effects in the hearing process of inner ear. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 9(37), 160-161.

- West, C. D. (1985). The relationship of the spiral turns of the cochlea and the length of the basilar membrane to the range of audible frequencies in ground dwelling mammals. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 77(3), 1091-1101.
- Wever, E. G. (1949). *Theory of hearing*. New York: John Wiley and Sons.
- Wever, E. G., y Lawrence, M. (1954). *Physiological acoustics*. London, United Kingdom: Princeton University Press.
- Wever, E. G., McCormick, J. G., Palin, J., y Ridgway, S. H. (1971a). Cochlea of the dolphin, *Tursiops truncatus*: the basilar membrane. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 68(11), 2708-2711.
- Wever, E. G., McCormick, J. G., Palin, J., y Ridgway, S. H. (1971b). The cochlea of the dolphin, *Tursiops truncatus*: hair cells and ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(12), 2908-2912.
- Wever, E.G., McCormick, J. G., Palin, J., y Ridgway, S. H. (1971). The cochlea of the dolphin, *Tursiops truncatus*: general morphology. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 68(10), 2381-2385.
- Wever, Ernest Glen, McCormick, J. G., Palin, J., y Ridgway, S. H. (1972). Cochlear structure in the dolphin, *Lagenorhynchus obliquidens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(3), 657-661.
- Williamson, W. C. (1849). On the Microscopic Structure of the Scales and Dermal Teeth of Some Ganoid and Placoid Fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 139(1849), 435-475.
- Yamato, M., y Pyenson, N. D. (2015). Early development and orientation of the acoustic funnel provides insight into the evolution of sound reception pathways in cetaceans. *PLoS ONE*, 10(3), 1-15.
- Yoshida, N., Kristiansen, A., y Liberman, M. C. (1999). Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *Journal of Neuroscience*, 19(22), 10116-10124.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L., y Dawson, T. M. (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Critical ReviewsTM in Neurobiology*, 10(3-4).
- Zemlin, W. R. (1997). *Speech and hearing science: anatomy and physiology* (Fourth). Boston: Allyn and Bacon.
- Zupančič, D., Terčelj, M., Štrus, B., y Veranič, P. (2017). How to obtain good morphology and antigen detection in the same tissue section? *Protoplasma*, 254(5),

1931-1939.

**10. Anexo (publicación científica):
Comparison of Methods for the
Histological Evaluation of
Odontocete Spiral Ganglion Cells**



Article

Comparison of Methods for the Histological Evaluation of Odontocete Spiral Ganglion Cells

Tania Ramírez ^{1,*}, Simona Sacchini ¹, Yania Paz ¹, Rubén S. Rosales ², Nakita Câmara ¹,
Marisa Andrada ¹, Manuel Arbelo ^{1,*} and Antonio Fernández ¹

¹ Veterinary Histology and Pathology, Institute of Animal Health and Food Safety (IUSA), Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, 35416 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; simona.sacchini@ulpgc.es (S.S.); yania.paz102@alu.ulpgc.es (Y.P.); nakita.camara101@alu.ulpgc.es (N.C.); marisaana.andrada@ulpgc.es (M.A.); antonio.fernandez@ulpgc.es (A.F.)

² Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Institute of Animal Health and Food Safety (IUSA), Veterinary School, University of Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, 35416 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; ruben.rosales@ulpgc.es

* Correspondence: tania.ramirez101@alu.ulpgc.es (T.R.); manuel.arbelo@ulpgc.es (M.A.);
Tel.: +34-9-2845-9707 (M.A.)

Received: 1 March 2020; Accepted: 10 April 2020; Published: 14 April 2020



Simple Summary: Hearing is arguably the primary sensory and communication channel for cetaceans. The study of diverse physiological and pathological events involving this system, requires standardized and reliable protocols for processing valuable and scarce samples such as the ears of cetaceans. As part of our research, standardized tissue processing protocols were developed in order to improve our knowledge regarding the anatomy and pathological changes of this sensorial system, including the nervous structures of the ear. The results obtained suggest that ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-based decalcifying solutions are key for correct evaluation of bony tissue structures such as the ear of cetaceans.

Abstract: Cetaceans greatly depend on their hearing system to perform many vital activities. The spiral ganglion is an essential component of the auditory pathway and can even be associated with injuries caused by anthropogenic noise. However, its anatomical location, characterized by surrounding bony structures, makes the anatomical and anatomopathological study of the spiral ganglion a difficult task. In order to obtain high-quality tissue samples, a perfect balance between decalcification and the preservation of neural components must be achieved. In this study, different methodologies for spiral ganglion sample preparation and preservation were evaluated. Hydrochloric acid had the shortest decalcification time but damaged the tissue extensively. Both formic acid and EDTA decalcification solutions had a longer decalcification time but exhibited better preservation of the neurons. However, improved cell morphology and staining were observed on ears pretreated with EDTA solution. Therefore, we suggest that decalcifying methodologies based on EDTA solutions should be used to obtain the highest quality samples for studying cell morphology and antigenicity in cetacean spiral ganglion neurons.

Keywords: cetaceans; ear; decalcification; histology; spiral ganglion

1. Introduction

The hearing system is possibly the main sensory system of cetaceans, acting as their principal communication channel [1]. Cetaceans' sense of hearing enables essential behaviors such as prey localization, predator detection, navigation, and the identification of conspecifics [2]. The rising levels

of marine noise pollution appears to affect these behaviors, having been linked to stress, alterations in reproduction, gas and fat embolic syndrome, and hearing damage in cetaceans [3–9].

Well-preserved inner-ear samples from stranded cetaceans are scarce, so it is paramount to develop protocols for sample collection, preservation, and processing. In the present study, we will focus on the development of different strategies to accurately preserve the inner ear, more specifically, the spiral ganglion of cetaceans. The spiral ganglion is located in the cochlea and it is composed of type I and type II ganglion cells [10]. About 95% of the ganglion cells are classified as type I, which are connected to the inner hair cells in the organ of Corti. The remaining 5% correspond to type II ganglion cells, which connect to the outer hair cells of the organ of Corti [11]. These connections are produced through the peripheral processes of the ganglion cells. The central processes of these cells come together to form the acoustic portion of the cochlear nerve and end up the cochlear nucleus in the brainstem [12].

The anatomical location of the spiral ganglion is characterized by being surrounded by bony structures, which makes the anatomical and anatomopathological study of the spiral ganglion a difficult task [13]. Therefore, to carry out the morphological study of the spiral ganglion it is necessary to decalcify the bone that surrounds it. The decalcification consists of softening the tissue by removing inorganic calcium from the organic collagen matrix of bone tissue. This demineralization is carried out by chemical agents, either acids or chelating agents. While acids are used to form soluble calcium salts, chelating agents act by binding to calcium ions [14,15].

In order to find the most suitable decalcifying agent, four different decalcifying solutions were evaluated. Ears from cetaceans stranded in the Canary Islands were used for the evaluation of the decalcification procedure by measuring the decalcification time, ease of sectioning, and morphological conservation of the tissue. In addition, antigenic preservation was evaluated by immunohistochemistry.

2. Materials and Methods

2.1. Tissue Specimens

Six ears from five cetaceans, representing three species (*Delphinus delphis* ($n = 2$), *Kogia breviceps* ($n = 1$), and *Tursiops truncatus* ($n = 2$)), were studied. All samples were obtained from dead stranded cetaceans in the Canary Islands. Environmental variables such as weather conditions, tide, cetacean species, and size complicate the task of determining the exact time of death of the animals sampled. For that reason, animals were assigned a conservation code at the time of necropsy [16] based on both the external and internal conditions of the animal. The elapsed time between the localization of the stranded animal and the necropsy was variable (Table 1). In addition, due to logistics issues, one of the animals was previously frozen and another one was refrigerated prior to necropsy.

2.2. Tissue Fixation

Once extracted, the ears were perfused through the oval and round window with a fixative solution (4% neutral-buffered formalin (NBF)). Subsequently, the samples remained immersed in 4% NBF for 2–22 days at room temperature [17].

2.3. Decalcification

Once the samples were fixed in NBF, they were immersed in a decalcifying solution. Four decalcifiers were evaluated and included Histofix[®] decalcifier 3 (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Spain), containing 10% hydrochloric acid, 15% formic acid (18.6 g of formic acid in 100 mL of 4% formaldehyde solution), 10% EDTA (10 g of EDTA per 100 mL of phosphate-buffered saline (PBS), adjusted to pH 7.2–7.3 with NaOH), and 20% EDTA (20 g of EDTA per 100 mL of PBS, adjusted to pH 7.2–7.3 with NaOH).

Ears were placed into the assigned decalcifying solutions (Table 1) and kept at room temperature (RT). The decalcifying solutions (except hydrochloric acid) were changed on a weekly basis and the total decalcification time was recorded.

Table 1. Information about animals and decalcifying protocols included in the study.

Animal	Ears (n)	Age	Type of Decalcifying	Conservation Code	Time Elapsed Between Stranding and Necropsy
<i>Kogia breviceps</i> (1/1)	2	Adult	10% hydrochloric acid (Histofix® Decalcifier 3)	Fresh	<24 h
<i>Delphinus delphis</i> (1/2)	1	Juvenile	15% formic acid	Fresh	38 days (frozen animal)
<i>Delphinus delphis</i> (2/2)	1	Juvenile	10% EDTA	Moderate decomposition	2 days (chilled animal)
<i>Tursiops truncatus</i> (1/2)	1	Calf	20% EDTA	Extremely fresh	<24 h
<i>Tursiops truncatus</i> (2/2)	1	Calf	20% EDTA	Extremely fresh	<24 h

Decalcification time, preservation of morphological features (evaluated by histochemistry), and antigenicity (evaluated by immunohistochemistry) were studied.

2.4. Tissue Processing

After decalcification, samples were routinely processed, embedded in paraffin, and sectioned to a thickness of 3–5 µm. Briefly, tissue samples were placed in 10% NBF for 3 h. After that, tissue samples were dehydrated through a series of graded ethanol solution as follows: 70% ethanol for 1 h; two incubation steps in 96% ethanol for 1 h each; 100% ethanol for 1 h; two incubation steps in 100% ethanol for 1.5 h each; xylene for 1 h; and two incubation steps in xylene for 1.5 h each. All these steps were performed at room temperature. Finally, samples were placed in paraffin wax at 59 °C for two incubation steps of 1.5 h each. In addition, samples from the two *Tursiops truncatus* ($n = 2$) were used for the preparation of cryosections. Samples were washed in PBS and immersed in a 30% sucrose at 4 °C, until the samples reached the bottom of the container. After that, samples were removed from the sucrose solution and embedded in OCT® (Optimal Cutting Temperature). Then, 15-µm cryosections were obtained in a cryostat at −25 °C, collected on glass slides and air-dried.

2.5. Histochemical Staining

All sections were stained with HE solution. To carry out the staining, paraffin was removed by immersing the tissue through two changes of xylene, for 2 min each. Sections were then re-hydrated with 100% ethanol twice for 2 min each, followed by 70% ethanol for 2 min and with deionized water three times for 3 min each. After deparaffinization and rehydration, samples were stained using Harris hematoxylin solution for 14 min, followed by a 1-min rinse in deionized water. Then, samples were differentiated in hydrochloric ethanol through four brief dips followed by a 1-min wash in deionized water. Bluing was performed in ammoniacal water through 15 dips. Specimens were washed in running tap water for 15 min and counterstained in eosin solution for 4 min. Finally, sections were dehydrated with 96% ethanol (twice) and 100% ethanol (twice), for 2 min each, and cleared up with xylene three times for 3 min each.

Thionine and cresyl violet were used for the staining of the Nissl substance (regions with granular endoplasmic reticulum, ribosomes and polysomes, where intense protein synthesis occurs [18]) present in neurons.

Thionine staining was performed by immersing the paraffin sections in a solution composed of 50% ethanol and chloroform in equal parts. After that, samples were re-hydrated through a series of graded ethanol baths: 100% ethanol, 96% ethanol, 90% ethanol, 80% ethanol, 70% ethanol, 50% ethanol, and deionized water for 3 min each. Then the samples remained submerged in 0.125% thionine for 10–15 min. Dehydration was carried out in 5% ethanol, 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 96% ethanol (10 brief dips each), and 100% ethanol and xylene for 10 min each.

For cresyl violet staining, sections were first immersed in 100% ethanol twice for 2 min each and in xylene twice for 2 min each before being stained in cresyl violet stain solution for 20 min. Subsequently,

samples were subjected to four dips of 95% ethanol and two immersions in 100% ethanol for 2 min each, as well as of xylene twice for 2 min each.

Cryosections were processed as described above with some protocol modifications. HE staining consisted of a four step protocol. Samples remained 1 min in the Harris hematoxylin solution. Then, they were briefly washed with deionized water and then immersed for 30 s in eosin solution, followed by a final wash with deionized water. Cresyl violet staining was performed using an initial 2-min incubation step in 100% ethanol at room temperature, followed by cresyl violet staining solution, ethanol (95%–100%) and xylene incubation steps as described above. Cryosections stained with thionine were processed as described above.

Both paraffin-embedded samples and the cryosections were mounted after each staining procedure using DPX mounting medium (Panreac). HE-stained cryosections were mounted in aqueous medium (Dako Faramount Aqueous Mounting Medium).

2.6. Immunohistochemical Staining

Three primary antibodies were used to evaluate tissue antigenic preservation. Anti-hsp70 antibody (Abcam, ab6535, Abcam, Cambridge, UK) is believed to maintain the native folding of proteins under stress conditions [19] and has been linked to cases of ischemia [20]. The other two antibodies, anti-calretinin (Swant, 6B3, Swant Inc, Marly, Switzerland) and anti-nitric oxide synthase (nNos) antibody (Chemicon, ab5380, Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), can be observed in physiological conditions. Calretinin activity has been associated with potential neuroprotective activity [21,22] and protection against noise trauma [23]. nNos activity has been linked to the control of cerebral blood flow [24], as well as a potential role in ischemia [25].

Before immunostaining, all paraffin sections were dewaxed in xylene and rehydrated through graded series of alcohol to water. Endogenous peroxidase was blocked after incubation with 3% H₂O₂ in methanol for 30 min. Heat pretreatment was required for the monoclonal antibody hsp70. In this case, citrate buffer pH 6 was used at 90–95 °C for 10 min. Prior to the specific antibody addition, non-specific binding sites were blocked using goat serum for those tissue samples incubated with the polyclonal antibody, and horse serum for those samples incubated with monoclonal antibodies. Incubation with goat and horse serum was performed at 1:10 dilution for 90 min at room temperature (RT). Tissue sections were incubated with primary antibody (nNos at 1:300 dilution, calretinin and hsp70 at 1:100 dilution) at 4 °C overnight. After that, sections were kept at RT for 1 h and then washed several times with phosphate-buffered saline and incubated with the corresponding secondary antibodies (Biotinylated anti-rabbit IgG in the case of nNos and biotinylated anti-mouse IgG for calretinin and hsp70) at 1:200 dilution for 1 h at RT. Specimens were incubated with 4% Avidin-Biotin Complex (VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1 h in the dark followed by the addition of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC; Vector, SK 4200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) chromogen and counterstaining with Mayer's hematoxylin. At the end of all the staining steps, the sections were washed with deionized water and mounted in aqueous medium (Dako Faramount Aqueous Mounting Medium, Dako, Glostrup, Denmark).

Cryosections were washed with PBS and incubated for 30 min at RT with 1% H₂O₂ in PBS for blocking endogenous peroxidase. After several washes with PBS, samples were incubated for 2 h at RT with PBS containing 10% goat or horse serum to prevent non-specific labeling. Incubation with primary antibody (nNos at 1:300 dilution, calretinin and hsp70 at 1:100 dilution) was performed for 48 h at 4 °C. Cryosections remained for 1 h at RT and were then washed three times with PBS. Tissue sections were exposed to secondary antibodies at 1:200 diluted for 2 h. Samples were then processed as described above using 4% Avidin-Biotin Complex (VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit) for 1 h in the dark followed by the addition of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC; Vector, SK 4200) chromogen and counterstaining with Mayer's hematoxylin.

3. Results

The time of decalcification, preservation of macro and microscopic morphology, and antigenicity conservation for each decalcifying agent can be seen in Table 2.

Table 2. Performance characteristics of the different decalcifying agents used in the study. NT: not tested. HE: hematoxylin and eosin staining.

Decalcifying Agents	Decalcification Time (In Days)	Macroscopic Morphology Preservation	Microscopic Morphology Preservation		Antigenicity Conservation
			HE	Thionine/Cresyl Violet	
Histofix [®] Decalcifier 3	2	Very good	Good	Poor/poor	Good
15% Formic Acid	7	Poor	Good	Good/NT	NT
10% EDTA	28	Good	Poor	Fair/food	Fair
20% EDTA	25–31	Good	Very good	Very good/very good	Very good

3.1. Decalcification Time

Decalcification time varied according to the reagent used. Two days were required for full decalcification in Histofix[®] decalcifier 3, seven days in 15% formic acid, 28 days in 10% EDTA, and 25–31 days in 20% EDTA.

3.2. Preservation of Macroscopic Morphology

The macroscopic morphology of samples processed with EDTA or Histofix[®] decalcifier 3 was highly preserved after the decalcification process. Conversely, the morphology of the specimen decalcified using 15% formic acid was extensively altered in the process. Therefore, this sample partially lost its macroscopic morphology, preventing cresyl violet and immunohistochemical staining of all the 15% formic acid-decalcified specimen.

3.3. Preservation of Microscopic Morphology

Tissue microscopic morphology preservation was evaluated by hematoxylin and eosin, thionine, and cresyl violet staining.

All sections showed a good stain uniformity after hematoxylin and eosin staining for the general evaluation of tissue morphology. Nevertheless, EDTA-decalcified cryostat-processed tissue samples exhibited the greatest tissue morphology and stain uniformity.

The neuronal architecture was preserved with all the decalcifying protocols evaluated. However, some variation in the neuronal staining performance was observed, mainly affecting basophile structures (nucleus, nucleolus, and satellite glial cells). Ears decalcified with Histofix[®] decalcifier 3 (Figure 1a) and 10% EDTA (Figure 1c) showed high eosin staining and weak basophilia, as well as faded nuclear and nucleolar staining. Basophilia appeared better preserved in the tissue decalcified with 15% formic acid (Figure 1b) or 20% EDTA (Figure 1d). In both cases, the nuclei could be clearly visualized. Regarding the nucleoli, 15% formic acid processed sample presented a slightly weaker staining, while 20% EDTA displayed the best staining performance for this structure.

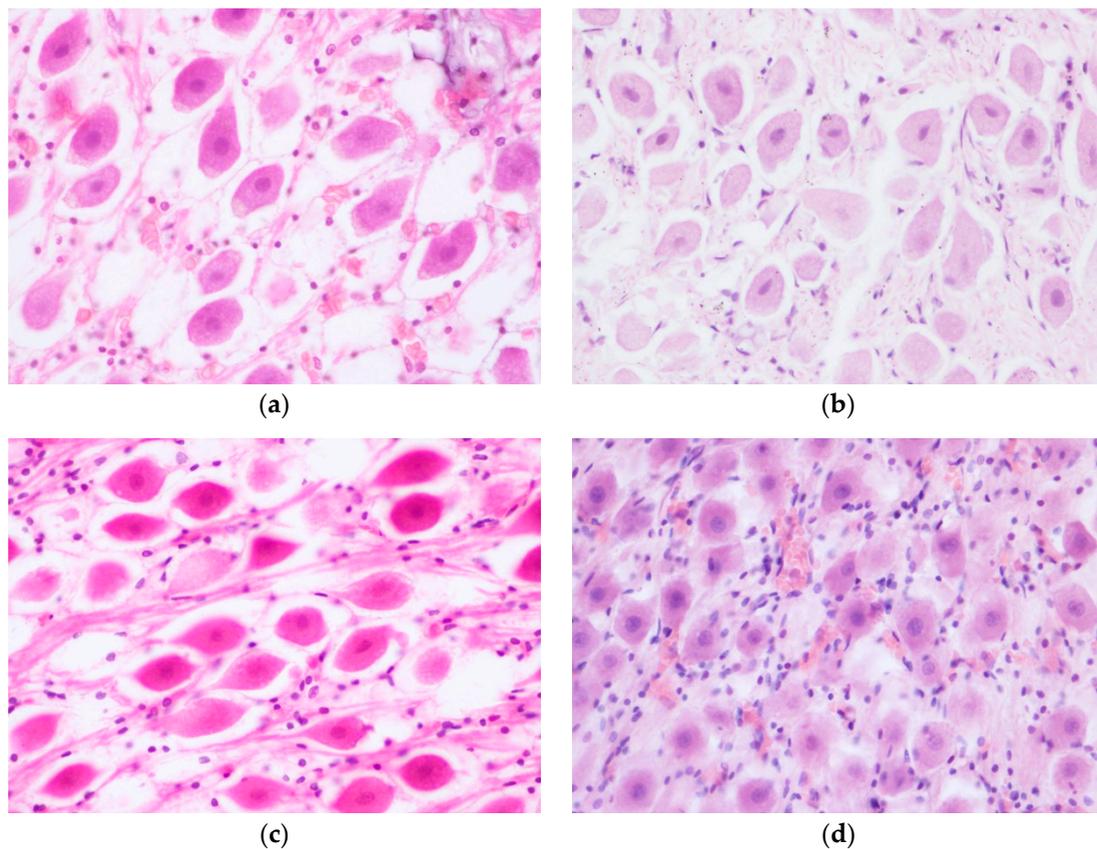


Figure 1. Spiral ganglion, hematoxylin and eosin staining. Panels contain the samples obtained from the different decalcification methods: (a) Histofix decalcifier 3[®] (magnification 60×); (b) 15% formic acid (magnification 60×); (c) 10% EDTA (magnification 60×); and (d) 20% EDTA (magnification 40×).

Thionine and cresyl violet staining presented similar results, displaying a poor efficacy for Histofix[®] decalcifier 3-decalcified samples, with no complete staining of the tissue in those specimens. Using this decalcifier, thionine stained samples did not provide evidence of cell structure (Figure 2a), while those stained with cresyl violet displayed a subtle definition of the neuronal structure and a very weak labelling of nucleoli and glial satellite cells (Figure 3a).

The 20% EDTA-decalcified samples exhibited the highest degree of conservation of the Nissl substance (Figures 2d and 3c), which is considered as good evidence of tissue preservation (neuronal structure, nucleoli and glia satellites cells). The 15% formic acid-decalcified sample also displayed a good staining efficacy using thionine, with a very good conservation of the neuronal architecture and clearly visible nucleoli (Figure 2b). However, the satellite glial cells were poorly differentiated in the tissue sample processed using this decalcifier. Cresyl violet could not be used for staining this sample due to tissue alteration, as described above. Sample treated with 10% EDTA displayed a fair staining of the Nissl substances using thionine (Figure 2c), while cresyl violet presented the best staining efficacy for this decalcifier (Figure 3b).

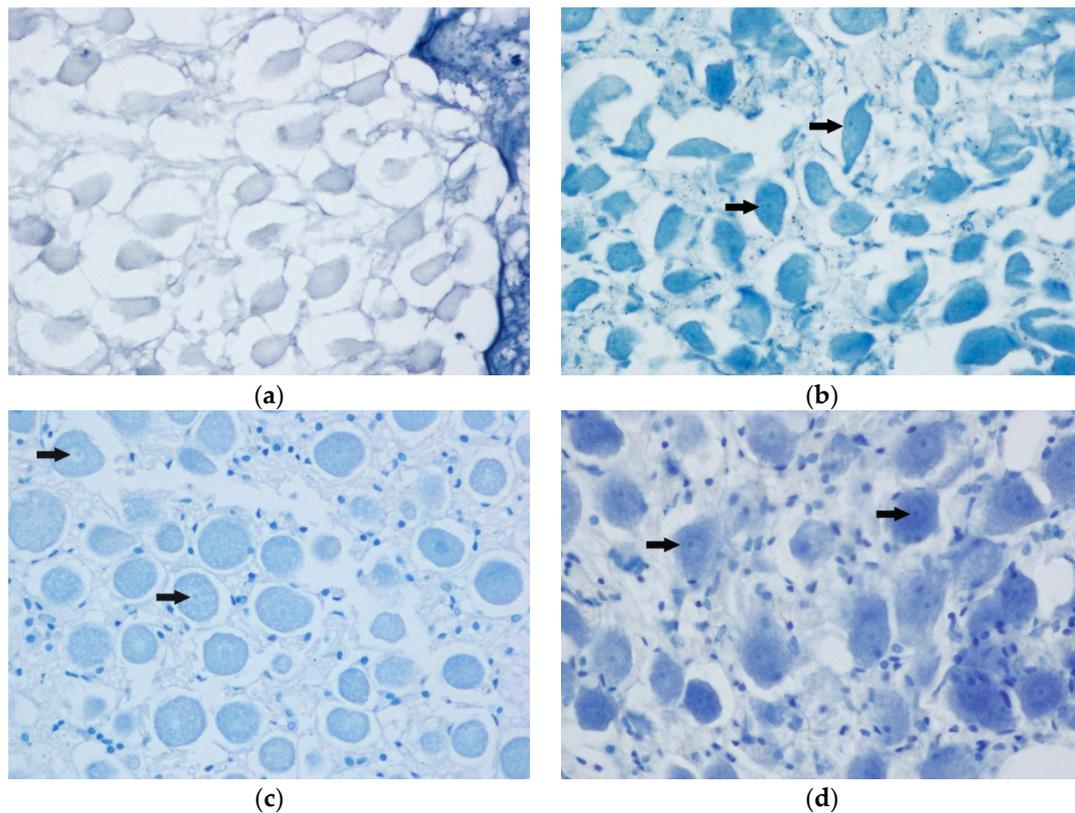


Figure 2. Spiral ganglion, thionine staining. Following images correspond to a specific staining of the Nissl substance (arrows) for each descaling method: (a) Histofix decalcifier 3[®] (magnification 60×); (b) 15% formic acid (magnification 60×); (c) 10% EDTA (magnification 60×); and (d) 20% EDTA (magnification 60×).

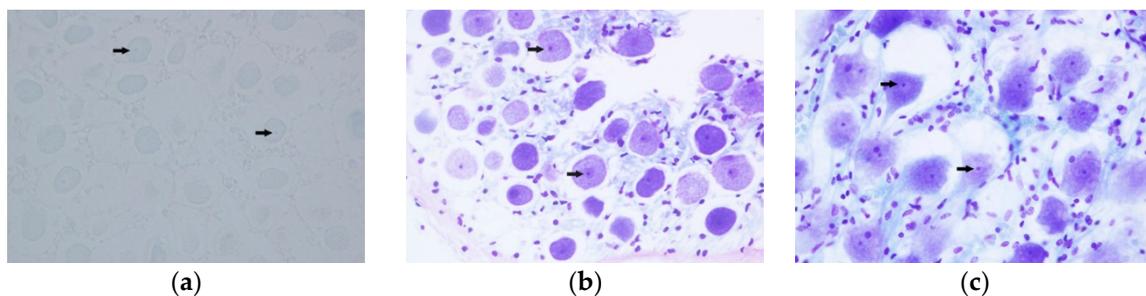


Figure 3. Spiral ganglion, cresyl violet staining. Images show the Nissl substance (arrows) present in the spiral ganglion neurons of the ears processed with the different decalcification protocols: (a) Histofix decalcifier 3[®] (magnification 60×); (b) 10% EDTA (magnification 60×); and (c) 20% EDTA (magnification 60×).

3.4. Conservation of Antigenicity

All samples subjected to immunohistochemical techniques presented a good antigenicity preservation. The 20% EDTA-decalcified cryostat-processed samples showed the greatest degree of antigen preservation, where the labelling of the antibody could be found in both the neuronal bodies and the axons, which will later form the cochlear nerve (Figure 4c). The immunolabeling of the neuronal bodies was weaker for samples processed using Histofix[®] decalcifier 3 (Figure 4a) and 10% EDTA (Figure 4b), with a slightly better distribution of immunolabeling in neuronal somas for samples treated with the former. The sample processed with 15% formic acid could not be processed for immunohistochemical staining due to tissue alteration.

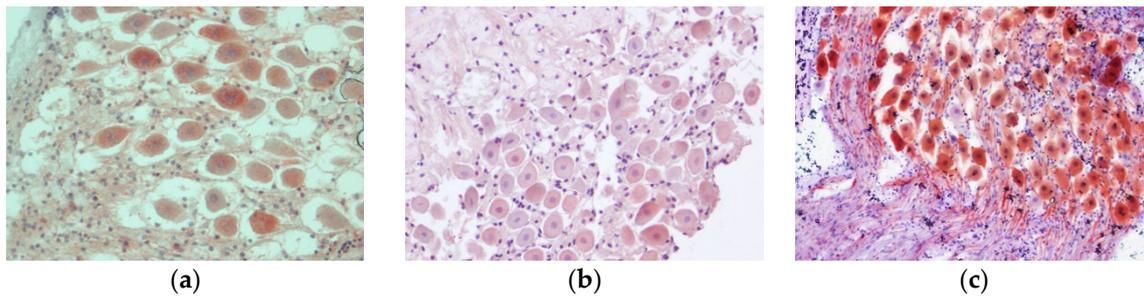


Figure 4. Spiral ganglion, immunohistochemical staining. The histological images show the results of the different immunohistochemical techniques with their corresponding antibodies and decalcifying agent: (a) Histofix decalcifier 3[®] (anti-hsp70 antibody; magnification 40×); (b) 10% EDTA (anti-nitric oxide synthase antibody; magnification 40×); and (c) 20% EDTA (anti-calretinin; magnification 20×).

4. Discussion

As a result of the anatomical nature of the spiral ganglion, that is, it being covered by a bone component, the development of optimal decalcifying strategies is paramount for the appropriate histopathological study of this tissue. As it is difficult to obtain ears from stranded cetaceans in a good state of preservation, it is important to develop protocols for optimal sample preservation and processing. Several studies have been developed comparing decalcifying agents to date. We used four protocols with four different decalcifiers: hydrochloric acid (Histofix[®] decalcifier 3), 15% formic acid, and 10% and 20% EDTA. After decalcifying the samples, in terms of the decalcifying agent, we next valued their ability to decalcify samples in the shortest time, the morphological preservation by histochemistry staining, and the antigenicity preservation by immunohistochemistry staining. In general, acceptable results were obtained from all solutions, but 20% EDTA offered better results.

With respect to the time it took the samples to decalcify, the Histofix[®] decalcifier 3 was the fastest and the slowest were 10% and 20% EDTA. The samples processed with 20% EDTA came from two calves of *Tursiops truncatus*, so it is possible that if they had been adults, the ears would have been slower to decalcify [26]. Results from the present study concur with other studies in which EDTA took more time than hydrochloric acid. However, the time it took the samples to decalcify in formic acid was similar to EDTA, which is inconsistent with other studies carried out with the same decalcifying agent [27–29].

The samples that better maintained their macroscopic morphology, and thus allowed good handling when processing, were those treated with EDTA and hydrochloric acid. On the other hand, the decalcified ears with 15% formic acid maintained a poor macroscopic morphology and were friable when handling them. The results obtained concur, completely or partially, with several studies carried out in which the authors value the ease of handling and conservation of the morphology of decalcified osteological material with different agents [27,28,30,31]. Choube et al. observed that the samples that were processed with formic acid and had heat applied were sectioned better [32]. In another study, they determined that the samples processed with EDTA were those that presented a worse structure when sectioning the samples after decalcification [27].

Although ears processed with formic acid, hydrochloric acid, and 10% EDTA preserved good cell morphology, evaluated by hematoxylin and eosin staining, the result with 20% EDTA was better. Similar results were obtained in previous studies [27,28]; however, in one of them, the formic acid showed some deficiencies in this aspect [31]. Nonetheless, some authors have described potential over-decalcification artefacts in EDTA-decalcified cetaceans ears [33]. We also used the Nissl substance staining to evaluate the conservation of the cellular structure. In this case, the best results were obtained with 20% EDTA and the worst were obtained with Histofix[®] decalcifier 3. Kristensen described that the most difficult part of his study had been getting a good stain of the Nissl substance in the spiral ganglion [34].

The conservation of antigenicity in our research was better preserved with 20% EDTA compared with hydrochloric acid and 10% EDTA. In most studies, EDTA is the decalcifying agent of choice to perform immunohistochemical techniques [28,35,36]. The decalcified samples with 20% EDTA that were later processed with the cryostat offered the best immunohistochemical results; this concurs with the results obtained by other authors [37]. This could be because samples embedded in paraffin must be exposed to heat and xylene to remove paraffin, therefore losing some of the antigenicity of the tissue [38]. However, limitations in the number of available samples did not allow us to fully compare paraffin-embedded and cryostat-derived samples using the protocols described, and further studies should be performed in order to examine these different tissue evaluation strategies. Despite what has been previously commented on EDTA and its ability to preserve the antigenicity of the tissues, in our study, decalcified samples with 10% EDTA did not offer very good results; this was most likely due to the conservation status of the animal when the necropsy was performed.

As the soft tissue of the ear deteriorates only a few hours after death [33], the degree of decomposition of the animal and a rapid tissue fixation are the most relevant factors leading to a good analytical outcome of the sample. Tissues processed with Histofix[®] decalcifier 3, 15% formic acid, and 20% EDTA came from animals that were classified at the time of necropsy with a degree of preservation ranging from fresh to very fresh. However, the ear treated with 10% EDTA was sourced from an animal with moderate signs of decomposition. Although a higher degree of decomposition was observed in this sample, both thionine and cresyl violet staining and immunolabeling showed acceptable results.

5. Conclusions

Obtaining samples from cetaceans in a good state of conservation is very complicated, so having standardized decalcification protocols is critical to allow the correct evaluation of tissue samples. Due to this, the sample decalcifying time should not be considered as a limiting factor as it will ensure an optimal tissue quality for further evaluation. Therefore, although EDTA-based solutions are the slowest decalcifying agents, they offer the best results and should be considered the decalcifying solutions of choice; specifically, samples decalcified with EDTA at 20% and processed in cryostat in offer the best balance between tissue and antigenicity conservation. Despite the difficulty in handling of tissue processed with 10% formic acid, promising results were obtained when using this decalcifier. However, we suggest that future studies should be aimed at evaluating lower concentration formic acid solutions. The positive labeling of the spiral ganglion obtained using the tissue processing protocols described as part of our research represents an optimal starting point for future research efforts focused on the physiological and pathological status of stranded cetaceans. Although useful results have been obtained as part of our research, it is important to continue optimizing tissue processing protocols in order to obtain as much information from tissue samples of cetaceans as possible. These samples, usually scarce and altered by conservation issues, are of central importance for understanding the pathological processes affecting these wild animals.

Author Contributions: Methodology and formal analysis, T.R., A.F., S.S., Y.P., N.C., M.A. (Manuel Arbelo) and M.A. (Marisa Andrada); Writing—original draft preparation, T.R. and A.F.; Supervision and writing—review and editing, A.F. and R.S.R.; Funding acquisition, A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study is part of Tania Ramírez's PhD thesis, registered at the Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), and supported by the Agencia canaria de investigación, innovación y sociedad de la información (ACIISI) through a predoctoral grant for training of research personnel (reference TESIS2015010113). Part of this research was supported through the national project "Embolio Pathology (gas/fat) in cetaceans" supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (reference PGC2018-101226-B-I00) and the international project MARCET ("Macaronesian network for the transfer of interregional and multidisciplinary knowledge and technologies to protect, watch and monitor cetaceans and the marine environment, and analyze and exploit in a sustainable way the associated tourist activity"); reference MAC/1.1b/149). The Government from the Canary Islands funded and provided support to the stranding research network.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ketten, D.R. Cetacean Ears. In *Hearing by Whales and Dolphins*; Springer: New York, NY, USA, 2000; pp. 43–108. ISBN 978-1-4612-7024-9.
2. Mooney, T.A.; Yamato, M.; Branstetter, B.K. *Hearing in Cetaceans: From Natural History to Experimental Biology*, 1st ed.; Elsevier Ltd.: London, UK, 2012; Volume 63, ISBN 9780123942821.
3. Erbe, C. Underwater noise of whale-watching boats and potential effects on killer whales (*Orcinus orca*), based on an acoustic impact model. *Mar. Mammal Sci.* **2002**, *18*, 394–418. [[CrossRef](#)]
4. Fernández, A.; Edwards, J.F.; Rodríguez, F.; de los Monteros, A.E.; Herráez, P.; Castro, P.; Jaber, J.R.; Martín, V.; Arbelo, M. “Gas and Fat Embolic Syndrome” Involving a Mass Stranding of Beaked Whales (Family *Ziphiidae*) Exposed to Anthropogenic Sonar Signals. *Vet. Pathol.* **2005**, *42*, 446–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kastelein, R.A.; Gransier, R.; Hoek, L. Comparative temporary threshold shifts in a harbor porpoise and harbor seal, and severe shift in a seal. *J. Acoust. Soc. Am.* **2013**, *134*, 13–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Middel, H.; Verones, F. Making marine noise pollution impacts heard: The case of cetaceans in the North Sea within life cycle impact assessment. *Sustainability* **2017**, *9*, 1138. [[CrossRef](#)]
7. Gordon, C. Anthropogenic Noise and Cetacean Interactions in the 21st Century: A Contemporary Review of the Impacts of Environmental Noise Pollution on Cetacean Ecologies. Bachelor’s Thesis, Portland State University, Portland, OR, USA, 2018; pp. 1–64.
8. Nabi, G.; McLaughlin, R.W.; Hao, Y.; Wang, K.; Zeng, X.; Khan, S.; Wang, D. The possible effects of anthropogenic acoustic pollution on marine mammals’ reproduction: An emerging threat to animal extinction. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 19338–19345. [[CrossRef](#)]
9. Kastelein, R.A.; Schop, J.; Gransier, R.; Hoek, L. Frequency of greatest temporary hearing threshold shift in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) depends on the noise level. *J. Acoust. Soc. Am.* **2014**, *136*, 1410–1418. [[CrossRef](#)]
10. Spoendlin, H. The innervation of the cochlear receptor. In *Basic Mechanisms in Hearing*; Academic Press: New York, NY, USA, 1973; pp. 185–234.
11. Spoendlin, H. Innervation Densities of the Cochlea. *Acta Otolaryngol.* **1972**, *73*, 235–248. [[CrossRef](#)]
12. Muniak, M.A.; Connelly, C.J.; Suthakar, K.; Milinkeviciute, G.; Ayeni, F.E.; Ryugo, D.K. Central projections of spiral ganglion neurons. In *The Primary Auditory Neurons of the Mammalian Cochlea*; Springer: New York, NY, USA, 2016; pp. 157–190. ISBN 9781493930302.
13. Wever, E.G.; McCormick, J.G.; Palin, J.; Ridgway, S.H. The cochlea of the dolphin, *Tursiops truncatus*: Hair cells and ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 2908–2912. [[CrossRef](#)]
14. Alers, J.C.; Krijtenburg, P.J.; Vissers, K.J.; van Dekken, H. Effect of bone decalcification procedures on DNA in situ hybridization and comparative genomic hybridization. EDTA is highly preferable to a routinely used acid decalcifier. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 703–710. [[CrossRef](#)]
15. Callis, G.M. Bone. In *Theory and Practice of Histological Techniques*; Bancroft, J.D., Gamble, M., Eds.; Elsevier Health Sciences: Philadelphia, PA, USA, 2008; pp. 333–363.
16. IJsseldijk, L.L.; Brownlow, A.C.; Mazzariol, S. Best Practice for Cetacean Post Mortem Investigation and Tissue Sampling. In Proceedings of the 25th Meeting of the Advisory Committee, Joint ACCOBAMS and ASCOBANS Document, Stralsund, Germany, 17–19 September 2019.
17. Morell, M.; André, M. Cetacean ear extraction and fixation protocol. In Proceedings of the European Cetacean Society Conference, Istanbul, Turkey, 2–4 March 2009.
18. Fedorenko, G.M.; Uzdensky, A.B. Nissl substance and cellular structures involved in the intraneuronal and neuroglial transport in the crayfish stretch receptor U. *Microsc. Sci. Technol. Appl. Educ.* **2010**, *4*, 299–306.
19. Mayer, M.P.; Bukau, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 670–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Massa, S.M.; Swanson, R.A.; Sharp, F.R. The stress gene response in brain. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1996**, *8*, 95–158. [[PubMed](#)]
21. Schwaller, B. Calretinin: From a “simple” Ca²⁺ buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. *Front. Neuroanat.* **2014**, *8*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schwaller, B. Cytosolic Ca²⁺ Buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 1–21.
23. Sharma, K.; Seo, Y.W.; Yi, E. Differential expression of Ca²⁺-buffering protein calretinin in cochlear afferent fibers: A possible link to vulnerability to traumatic noise. *Exp. Neurobiol.* **2018**, *27*, 397–407. [[CrossRef](#)]

24. Duchemin, S.; Boily, M.; Sadekova, N.; Girouard, H. The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation. *Front. Neural Circuits* **2012**, *6*, 1–19. [[CrossRef](#)]
25. Eliasson, M.J.; Huang, Z.; Ferrante, R.J.; Sasamata, M.; Molliver, M.E.; Snyder, S.H.; Moskowitz, M.A. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 5910–5918. [[CrossRef](#)]
26. Madden, V.J.; Henson, M.M. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. *Hear. Res.* **1997**, *111*, 76–84. [[CrossRef](#)]
27. Jimson, S.; Balachander, N.; Masthan, K.M.K.; Elumalai, R. A Comparative Study in Bone Decalcification Using Different Decalcifying Agents. *Int. J. Sci. Res.* **2014**, *3*, 1226–1229.
28. Savi, F.M.; Brierly, G.I.; Baldwin, J.; Theodoropoulos, C.; Woodruff, M.A. Comparison of Different Decalcification Methods Using Rat Mandibles as a Model. *J. Histochem. Cytochem.* **2017**, *65*, 705–722. [[CrossRef](#)]
29. Shibata, Y.; Fujita, S.; Takahashi, H.; Yamaguchi, A.; Koji, T. Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. *Histochem. Cell Biol.* **2000**, *113*, 153–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Farrel, S.F.; Osmotherly, P.G.; Rivett, D.A.; Cornwall, J. Formic acid demineralization does not affect the morphometry of cervical zygapophyseal joint meniscoids. *Anat. Sci. Int.* **2015**, *90*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Prasad, P.; Donoghue, M. A comparative study of various decalcification techniques. *Indian J. Dent. Res.* **2013**, *24*, 302–308. [[CrossRef](#)]
32. Choube, A.; Astekar, M.; Choube, A.; Sapra, G.; Agarwal, A.; Rana, A. Comparison of decalcifying agents and techniques for human dental tissues. *Biotech. Histochem.* **2018**, *93*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jepson, P.D.; Prael, S.; Deaville, R.; Siebert, U. *Postmortem research feasibility study on cetacean ears. Final report to the Department for Environment, Food and Rural Affairs. Defra Contract: CRO303*; Institute of Zoology: London, UK; Forschungs- und Technologiezentrum Westküste: Buesum, Germany, 2006.
34. Kristensen, H.K. An improved method of decalcification. *Stain Technol.* **1948**, *23*, 151–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Liu, H.; Zhu, R.; Liu, C.; Ma, R.; Wang, L.; Chen, B.; Li, L.; Niu, J.; Zhao, D.; Mo, F.; et al. Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 9050754. [[CrossRef](#)]
36. Choi, S.-E.; Hong, S.W.; Yoon, S.O. Proposal of an Appropriate Decalcification Method of Bone Marrow Biopsy Specimens in the Era of Expanding Genetic Molecular Study. *J. Pathol. Transl. Med.* **2015**, *49*, 236–242. [[CrossRef](#)]
37. Zupančič, D.; Terčelj, M.; Štrus, B.; Veranič, P. How to obtain good morphology and antigen detection in the same tissue section? *Protoplasma* **2017**, *254*, 1931–1939. [[CrossRef](#)]
38. Takahashi, M.; Kimura, Y.; Sawabe, M.; Kitamura, K. Modified paraffin-embedding method for the human cochlea that reveals a fine morphology and excellent immunostaining results. *Acta Otolaryngol.* **2010**, *130*, 788–792. [[CrossRef](#)]



Tesis Doctoral

Tania Aurora Ramírez Herrera

Avances metodológicos para el estudio microscópico
del ganglio espiral de cetáceos



ULPGC
Universidad de
Las Palmas de
Gran Canaria

Doctorado en Sanidad Animal y
Seguridad Alimentaria

Las Palmas de Gran Canaria
Julio 2020



IUSA
Instituto Universitario
de Sanidad Animal