

4- MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1-SUJETOS DE ESTUDIO:

Este estudio se ha realizado con una muestra de 32 sujetos voluntarios normooyentes, de ambos sexos, con una edad comprendida entre los 18 y 50 años.

Se ha considerado una muestra de 32 sujetos, al estimarse que será suficientemente representativo para establecer los parámetros de la normalidad.

Los 32 sujetos han sido divididos en dos grupos:

Grupo A (entre 18 y 34 años);

Grupo B (entre 35 y 50 años);

La edad se limita a 50 años, por ser la edad a partir de la cual pueden aparecer fenómenos de presbiacusia que distorsionarían los resultados, pudiendo ser este grupo motivo de un estudio posterior.

Cada uno de los sujetos voluntarios ha firmado un modelo de consentimiento informado (anexo al final del libro) antes de la realización de la prueba de RMf, dando su conformidad a participar en el estudio.

4.2- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

Los criterios de inclusión y exclusión aplicados en el estudio son los siguientes:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- 1-Sujeto voluntario, sin antecedentes médico-quirúrgicos neurológicos u otorrinolaringológicos, especialmente sin antecedentes en oído medio e interno.
- 2-Sujeto con una edad comprendida entre 18 y 50 años de edad sin antecedentes de claustrofobia u otros motivos que imposibiliten la práctica de la RMf (marcapasos, material ferromagnético...)
- 3- Sujeto con exploración otorrinolaringológica y audiológica dentro de la normalidad.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- 1- Paciente con antecedentes de cirugía de oído medio e interno (tubos de ventilación, timpanoplastias, neurectomías etc.).
- 2- Paciente menor de 18 años de edad y mayor o igual a 50 años de edad con antecedentes de claustrofobia u otros motivos que imposibiliten la práctica de la RMf (marcapasos, material ferromagnético...)
- 3- Paciente con alguna alteración audiológica en la exploración otorrinolaringológica (audiometría tonal liminar con umbral de cualquier frecuencia superior a 25 dB).
- 4- Pacientes con enfermedad de Ménière, otosclerosis o infecciones crónicas del oído medio.
- 5- Profesionales expuestos a ruidos ambientales y/o laborables.
- 6- Pacientes portadores de prótesis auditivas.
- 7- Pacientes con trastornos del lenguaje.
- 8- Pacientes con antecedentes de traumatismo craneoencefálico grave reciente.

4.3- MATERIAL:

Para este estudio disponemos de los siguientes recursos:

1. Equipo de Resonancia Magnética (1.5 Tesla) del Centro de diagnóstico por la imagen (CDI) del Hospital Clínic de Barcelona.
2. Sistema de Audio compatible con RM, necesario para la estimulación auditiva del córtex cerebral.
3. PC pentium IV IBM compatible y la herramienta estadística SPM (*Statistical Parametric Mapping*) necesarios para el procesamiento de las imágenes obtenidas mediante RMf.
4. PC portátil con programa generador de archivos de sonido necesarios como paradigmas para la estimulación del córtex auditivo. La composición de estos archivos de sonido es detallada en la metodología.

El equipamiento de los puntos 3 y 4 han sido obtenidos por medio de la colaboración de la empresa Amplifón SL.

4.4- TIPO DE ESTUDIO Y MÉTODOS:

Se trata de un estudio prospectivo longitudinal, controlado y clínico-experimental en pacientes voluntarios normooyentes (audiometría tonal normal) con edad comprendida entre los 18 y los 50 años de edad.

MÉTODOS:

A todos los sujetos del estudio se les ha realizado una historia clínica y una exploración otológica consistente en:

1. Otomicroscopia
2. Timpanometría.
3. Audiometría tonal liminar por vía aérea y ósea.

Una vez comprobado que las anteriores pruebas realizadas se encuentran dentro de la normalidad, se les realizó a cada uno de los sujetos una prueba de RMf consistente en:

1-Localizadores sagitales.

2-Cortes axiales anatómicos (10) en secuencia potenciada en T1 de la región en estudio (córtex temporal).

3-Secuencias de funcional auditivo en los 10 cortes axiales. Los parámetros de la adquisición son TE = 60ms; TR = 2000ms; “*delay*” = 8000ms para el paradigma.

4- Imagen estructural 3D (grosor de corte = 1.5 mm) para posterior localización anatómica exacta de los patrones de activación.

El paradigma empleado consiste en períodos alternos de 20 segundos de silencio y 20 de estimulación auditiva, con cuatro tipos de estímulos diferentes que se presentan cíclicamente durante 8 minutos y 20 segundos (3 fases) con una intensidad de 86 dB SPL: 750 Hz oído izquierdo, 750 Hz oído derecho, 2000 Hz oído izquierdo y 2000 Hz oído derecho todos ellos formados por tonos discontinuos de 125ms de duración.

Durante el estudio los sujetos se situaron en posición supina sobre la camilla de la resonancia, con una bobina de cráneo situada alrededor de la cabeza. La aplicación de los estímulos auditivos se ha realizado con un sistema de cascos neumáticos proporcionados por la empresa *General Electric*, compatibles con la RM.



Figura 14: Cascos neumáticos para estimulación auditiva.

Con la finalidad de minimizar el movimiento de la cabeza se les pidió a los sujetos que permaneciesen lo más quietos posible y se utilizaron almohadillas para mantener la cabeza fija.

Los sujetos fueron instruidos antes de entrar a la máquina, que en caso de sensación claustrofóbica durante la realización de la prueba, podrían accionar un sistema de alarma (pera neumática) y la prueba se detendría inmediatamente.

4.5- PREPARACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS:

Las imágenes neurofuncionales han sido registradas en formato DICOM (archivos individuales que corresponden cada uno a un corte de un volumen) y convertidas a formato Analyze 7.5 mediante el programa MRICRO (software desarrollado por Chris Rorden; <http://psychology.nottingham.ac.uk/staff/cr1/mricro.html>), y se han obtenido 50 archivos volumétricos de 10 cortes (que cubren la corteza auditiva), a partir de los 500 originales.

Todos los tratamientos llevados a cabo sobre estos volúmenes de imagen funcional se realizaron con la herramienta estadística SPM2 (*Statistical Parametric Mapping*, software del Wellcome Department of Cognitive Neurology, Institute of Neurology, London <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm> bajo el programa Matlab 6.5 MathWorks, Natick, MA). Las imágenes han sido tratadas en un procesador Pentium IV con el sistema operativo Windows 98.

El primer volumen (correspondiente a los 10 segundos iniciales de estabilización de la señal) de cada sujeto fueron descartados y los 49 restantes se utilizaron para el posterior análisis. El SPM es una herramienta informática que permite analizar estadísticamente la información recogida en las imágenes médicas.

Este programa considera los valores de intensidad de cada vóxel como variable dependiente; la variable independiente estaría constituida por las condiciones bajo las que recogemos los datos funcionales, en nuestro caso las condiciones definidas como período de “estímulo auditivo” y período de “silencio”.

Las imágenes neurofuncionales han sido sometidas a un pretratamiento idéntico en todos los casos, consistente en: Corrección del movimiento, normalización espacial y suavizado.

4.6- CORRECCIÓN DEL MOVIMIENTO:

Las correcciones sobre las imágenes por movimientos involuntarios de la cabeza del voluntario durante la adquisición se han realizado mediante realineación (calculada en base a la mínima diferencia de cuadrados según tres traslaciones y tres rotaciones en los ejes cartesianos) de los volúmenes conforme a un volumen de referencia; se ha tomado como referente el primer volumen de la serie funcional, por ser el más próximo a la adquisición anatómica (Friston K.J. et al., 1996). La corrección aplicada ha sido generalmente menos de 2 mm en cada plano y menos de 2° de rotación en cada uno de los ejes.

4.7- NORMALIZACIÓN ESPACIAL:

Normalización espacial de cada sujeto a fin de transformar el espacio funcional en un espacio estándar para todos los sujetos, correspondiente al espacio MNI (Montreal Neurological Institute) (Evans A.C. et al., 1993). La normalización de las series funcionales ha sido realizada a partir de la imagen anatómica 3D de cada sujeto (de mayor precisión que las funcionales) según el “*template*” o patrón anatómico ponderado en T1 localizado en el espacio MNI. Primeramente, se realizó una reorientación manual

de las imágenes para hacerlas coincidir con la orientación propuesta en los patrones anatómicos del programa, y así garantizar el éxito de la normalización automática. Se introdujeron manualmente los parámetros de traslación y rotación precisos y una orientación axial correspondiente al plano imaginario que contiene la comisura anterior y la comisura posterior cerebral. En segundo lugar se corregistraron las imágenes funcionales con la imagen anatómica 3D. En tercer lugar se normalizó la imagen anatómica sobre el “*template*” y se aplicó la misma transformación a las imágenes funcionales.

El proceso de normalización de la imagen anatómica consta de dos pasos: En primer lugar una “*affine registration*” o registro afin para realinear la imagen anatómica 3D con el “*template*” (Ashburner J. et al., 1997); y el segundo paso de la normalización es aplicar las deformaciones locales necesarias para que las estructuras cerebrales de referencia en la imagen a normalizar concuerden con las del “*template*”. Este método no trata de solapar cada una de las localizaciones corticales con una precisión exacta, sino que meramente corrige las diferencias globales en la forma del cerebro (Ashburner J. et al., 2000). De esta manera se garantiza una precisa localización espacial de los mapas de actividad.

4.8- SUAVIZADO (SMOOTHING):

Suavizado de la intensidad de las imágenes funcionales normalizadas en base a un núcleo (“*Kernel*”) gaussiano tridimensional. El filtrado incrementa la relación señal/ruido, además, el uso de un núcleo tridimensional de este tipo posibilita que los valores de cada imagen sigan una distribución que permita poder aplicar la estimación en campos gaussianos; con ello se incrementa la validez de los posteriores análisis estadísticos (Ashburner J. et al., 1999). El núcleo viene definido por su característica FWHM (“*Full Width at Half Maximum*”); para el suavizado de nuestras imágenes utilizamos un núcleo con un FWHM de 8 mm.

4.9- DEFINICIÓN DEL MODELO ESTADÍSTICO:

Especificar un modelo para el estudio es definir los regresores (funciones temporales que modulan la respuesta) para todas las condiciones del paradigma presentado, es decir, traducir matemáticamente las hipótesis en cuanto a la forma de las respuestas (variable dependiente, intensidad de señal de cada vóxel, Y) asociadas a cada condición experimental (“período de estimulación”; “período de silencio”). La matriz diseño (X) agrupa los regresores definidos para cada condición.

Utilizamos cuatro regresores que son la combinación de la estimulación por el oído derecho o izquierdo y la frecuencia de dicho estímulo auditivo: 750 Hz oído izquierdo, 750 Hz oído derecho, 2000 Hz oído izquierdo y 2000 Hz oído derecho.

Mediante la opción “fMRI models” del SPM, se especificó la matriz diseño (Design Matrix) definiendo cada condición según una función de base tipo box-car, que correspondería a una función de base en forma de almendra (cuya longitud sería la duración, en imágenes, del bloque). De este modo, mediante el SPM se construyó un

modelo estadístico correspondiente a una generalización del modelo lineal general que descompone la señal medida en cada vóxel como una combinación lineal de regresores. Lo anteriormente escrito se resume en que realizamos un análisis estadístico de los mapas de activación mediante la identificación de regiones que estadísticamente presentan una estimulación significativa correlacionando vóxel a vóxel la intensidad de la imagen con el patrón de actividad y posterior corrección por comparaciones múltiples.

4.10- ESTIMACIÓN ESTADÍSTICA DEL MODELO:

Para cada sujeto, se estimaron los parámetros del modelo definido en la matriz diseño sobre las imágenes realineadas, normalizadas y suavizadas.

En términos matemáticos, estimar el modelo consiste en efectuar una regresión lineal de los datos de cada vóxel sobre el total de los regresores teóricos definidos en la matriz de diseño (en nuestro caso, la función box-car) y estimar los parámetros beta (coeficientes de regresión) que minimicen la variancia del error residual. Para hacer ésto se utiliza un método de resolución llamado “de mínimos cuadrados ordinarios” (OLS, “*ordinary least-squares*”).

Este método permite obtener:

- Una estimación de los parámetros de coeficiente de regresión (B) en cada vóxel.
- La señal estimada en cada vóxel, es decir la señal reconstruida según los regresores teóricos y los parámetros estimados $Y=XB$.
- El error residual (E) en cada vóxel, que será la diferencia entre los datos y la señal estimada $E = Y - Y'$.

En base a esta estimación individual del modelo, para cada sujeto se ha estudiado la activación significativamente mayor en la condición de “período de estimulación” que

en la condición de “período de reposo”, utilizando para ello un tes t de Student unilateral que nos permitió obtener para cada individuo una imagen que contenía en cada vóxel la combinación lineal de los parámetros beta. Estas imágenes obtenidas fueron tratadas grupalmente mediante dos análisis de segundo orden de efectos aleatorios.

4.11- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS:

-Estandarización mediante estudios globales. Determinación de patrones de activación comunes que sean estadísticamente significativos en el conjunto de sujetos en estudio (mediante las herramientas específicas del paquete estadístico SPM –“*one sample T-test*” de mapas estadísticos de activación).

-Búsqueda de posibles patrones de activación diferenciales por subgrupos (edad, sexo) y por tipo de estímulo (presentación, frecuencia) (mediante las herramientas específicas del paquete estadístico SPM –“*two sample T-test*” de mapas estadísticos de activación).

- Estudio de la reproducibilidad de la prueba.