

Preparación histológica de cócleas de ratas y su aplicación a estudios de sordera

Sandra Rodríguez¹, Tania Valdés¹, Yahima Harvey¹, Odelsa Ancheta¹, Valia Rodríguez², Armando Alvaré², Rosa María Coro³, Pavel Prado², Farah Gutiérrez², Cesar Valmaña⁴ y Michael Y. Feston¹

¹Dpto. de Microscopia Electrónica, Dirección de Biotecnología, CNIC, Ave. 25 y 158, Playa, Apto. Postal 6412, Ciudad Habana, Cuba.

²Dpto. de Neurociencias Cognitivas, CNEURO

³Dpto. de Anatomía Patológica, Instituto de Neurología y Neurocirugía

⁴Dpto. de Histología ICBP, Victoria de Girón.

Recibido: 30 de noviembre del 2004

Aceptado: 24 de diciembre del 2004

Palabras clave: Cóclea, ganglio espiral, sordera, histología.

Key words: Cochlea, spiral ganglion, deafness, histology.

RESUMEN. Entre los cambios degenerativos que tienen lugar en la vía auditiva como consecuencia de una sordera sensorineural se encuentra la disminución de la densidad neuronal del ganglio espiral. Este trabajo tuvo como objetivos: 1) Normalizar la técnica histológica para cócleas de ratas y 2) Estudiar la evolución temporal de los cambios morfológicos que se producen en el ganglio espiral de ratas adultas ante un tratamiento ototóxico. Para el primer objetivo se emplearon 4 cócleas de ratas sanas, a las que se les realizaron diferentes variantes técnicas. Para el segundo objetivo se utilizaron 24 ratas que se dividieron en seis grupos: cuatro grupos de ratas sacrificadas a las 2, 4, 8 y 16 semanas de sordera y dos grupos de animales sanos sacrificados al inicio y al final del experimento (semanas 2 y 16). Se obtuvieron cortes de las cócleas para su estudio al Microscopio Óptico. Se estudiaron las neuronas del ganglio espiral situadas en el canal de Rosenthal; así como los procesos periféricos que inervan el órgano de Corti, en las regiones basal, medial y apical. Se observó una buena conservación de las estructuras en animales sometidos a perfusión vascular con formalina, cuyas cócleas fueron descalcificadas en EDTA e incluidas en resinas. A partir de las 4 semanas de inducida la sordera se observó una disminución progresiva de la densidad neuronal del ganglio espiral; igualmente se afectaron los procesos periféricos que inervan el órgano de Corti. La estandarización del procedimiento histológico es una premisa importante para estudios ulteriores de la cóclea de ratas adultas.

ABSTRACT. Among the degenerative changes in the auditory pathway, induced by sensorineural hearing loss is the decreased density of spiral-ganglion cells. The aims of the present study were: 1) To standardize the histological procedure for rat cochleae and 2) To explore changes of spiral ganglion morphology after induced deafness in adult rats. For the first objective, four cochleae of healthy rats were processed by several technical variants. For the second objective, twenty-four rats were used, divided into six groups: four groups were sacrificed two, four, eight and

sixteen weeks after deafness induction. The other two groups were used as non-treated healthy controls, sacrificing the animals at the beginning and at the end of the experiment (second and sixteenth weeks). Sections of cochleae were obtained for their observation at the optical microscope. Spiral ganglion neurons in Rosenthal's canal and peripheral processes innervating the organ of Corti were studied in basal, medial and apical regions. A good structural preservation was observed in animals submitted to formaline vascular perfusion, whose cochleae were decalcified in EDTA and embedded in resins. A progressive reduction of spiral ganglion cells density and a loss of peripheral processes were observed since the fourth week of induced deafness. The standardization of the histological procedure is an important premise for further studies of the adult rat cochleae.

INTRODUCCIÓN

La creación y desarrollo de prótesis cocleares permite la recuperación de la función auditiva después que ha ocurrido una pérdida sensorial. Sin embargo, la recuperación de la audición y el reaprendizaje de funciones relacionadas con la percepción y procesamiento del habla dependen, en gran medida, del tiempo que media entre la aparición de la sordera y el momento en que se realiza el implante coclear. Durante este período, denominado período de privación, comienzan a producirse una serie de cambios degenerativos que aumentan con el tiempo, entre los que se encuentra la muerte de las primeras neuronas de la vía (del ganglio espiral). La reducción de la población neuronal del ganglio espiral afecta dramáticamente la eficiencia de los implantes, pues el funcionamiento de esos dispositivos está basado en la estimulación de los axones de estas neuronas.¹ Es así que una de las estrategias básicas en las investigaciones del sistema auditivo está encaminada a lograr la supervivencia de la mayor parte de las neuronas ganglionares.² Sin embargo para la evaluación de cualquier terapia preventiva contra la muerte de estas células es necesario primeramente estudiar los parámetros de su degeneración.

La preparación histológica de las cócleas se hace difícil, no sólo por su ubicación anatómica dentro del oído interno y su pequeño tamaño, sino también porque este órgano es una estructura ósea. La literatura registra procedimientos diversos con mayor o menor éxito. Se reportan variantes en cuanto a la fijación, la descalcificación y la inclusión.³⁻⁵

El presente trabajo tuvo los siguientes objetivos:

1. Normalizar una técnica histológica para cócleas de ratas probando algunas variantes de fijación, descalcificación e inclusión
2. Estudiar la evolución temporal de los cambios morfológicos que se producen en el ganglio espiral de ratas adultas a las que se les indujo una sordera por ototoxicidad.

MATERIALES Y MÉTODO

Normalización de la técnica histológica

Se utilizaron 4 cócleas procedentes de 2 ratas Wistar sanas. Se probaron variantes de la técnica de inclusión en resinas; en las que los cambios se realizaron en los dos pasos críticos en el procesamiento de estructuras óseas: la fijación y la descalcificación.

1. Fijación del animal por perfusión vascular con formalina al 10%. En una variante se omitió este paso, por requerir gran volumen del fijador.
2. Extracción de las cócleas
3. Fijación por perfusión perilinfática de la cóclea mediante paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2% en buffer fosfato de sodio
4. Descalcificación (EDTA al 8.3% o ácido fórmico al 5%)
5. Fijación por inmersión mediante paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2% en buffer fosfato de sodio
6. Postfijación en tetróxido de osmio al 2%
7. Deshidratación en acetona
8. Infiltración e inclusión en resinas (Spurr o araldita).
9. Cortes semifinos seriados, tinción con azul de Stevenel para estudiar al Microscopio Óptico
10. Obtención de cortes ultrafinos para su observación al Microscopio Electrónico

Estudio morfológico del ganglio espiral de ratas adultas sordas

En este trabajo se utilizaron 24 ratas Wistar adultas entre 250 y 300 g de peso. Durante todo el experimento los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales de humedad, temperatura y fotoperíodo. Además, se les facilitó un acceso constante al agua y al alimento.

Se trabajó con 2 grupos controles (4 animales en cada uno) sacrificados a las 2 y 16 semanas de iniciado el experimento y con 4 grupos tratados (4 animales en cada uno) sacrificados a las 2, 4, 8 y 16 semanas de inducida la sordera. La ototoxicidad se indujo mediante la administración simultánea, por vía intraperitoneal, de una dosis única de kanamicina (400 mg/kg) y furosemida (150 mg/kg).

El estado funcional de la vía auditiva se comprobó con técnicas electrofisiológicas de potenciales evocados transientes de tallo encefálico y potenciales evocados de estado estable en todos los animales. En los grupos de animales tratados se comprobó la instauración de la sordera una semana después de inducida. Se consideraron sordos todos los animales que presentaron umbrales sensoriales superiores a 110 dB nHL.

Las cócleas se procesaron por la técnica que resultó la mejor variante de las que se describen en este trabajo.

La atención se centró en las neuronas del ganglio espiral situadas en el canal de Rosenthal; así como en los procesos periféricos que inervan el órgano de Corti. Las comparaciones entre los grupos se realizaron en las regiones basal, medial y apical de la cóclea (Figura 1).

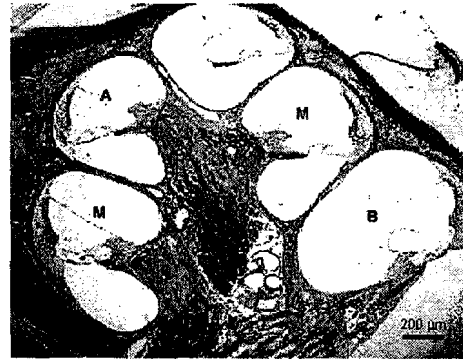


Fig. 1. Corte semifino de cóclea de ratona. Se señalan las regiones estudiadas. A) apical, M) medial, B) basal.

RESULTADOS Y DISCUSION

Normalización de la técnica histológica

En cuanto a las variantes analizadas, se comprobó que la fijación del animal por perfusión vascular es un paso imprescindible en la preservación de las cócleas, pues cuando se omitió ésta, no se logró buena conservación celular. Este tipo de fijación es un procedimiento engorroso que tiene como inconvenientes que requiere el empleo de grandes volúmenes del líquido fijador, equipamiento especial y personal entrenado. Sin embargo, la perfusión se realizó con formalina, que es un fijador más económico que el paraformaldehído y el glutaraldehído utilizados por otros autores.³⁻⁵

En cuanto a las variantes de descalcificación probadas, al Microscopio Óptico no se encontraron diferencias; sin embargo al Microscopio Electrónico se observó mejor preservación de las estructuras cuando la descalcificación se llevó a cabo con EDTA.

Con la técnica de inclusión en resinas las muestras pueden ser estudiadas tanto por Microscopía Óptica como Electrónica, lo que implica un ahorro de tiempo y materiales respecto a la técnica de inclusión en parafina, que sólo permite la observación al Microscopio Óptico. En este trabajo se obtuvieron buenos resultados con las dos resinas empleadas (Spurr y araldita), similares a los obtenidos por otros autores con la resina epoxi LX⁵ y Epón.⁶

Estudio morfológico del ganglio espiral de ratas adultas sordas

Normalmente el canal de Rosenthal presenta las neuronas ocupando todo el espacio del mismo, de manera que quedan muy próximas unas de otras (Figura 2A). El aspecto normal de los procesos periféricos que inervan el órgano de Corti es en forma de haces de fibras apretadas (Figura 2A). En

los dos grupos de animales controles (2 y 16 semanas) se observaron estos patrones de normalidad, al igual que en los animales sordos de 2 semanas.

Sin embargo, a las 4, 8 y 16 semanas de inducida la sordera se observó reducción de la densidad de neuronas y escasez de los procesos periféricos que normalmente inervan el órgano de Corti, siendo éstas más notables a las 16 semanas (Fig. 2 B, C y D).

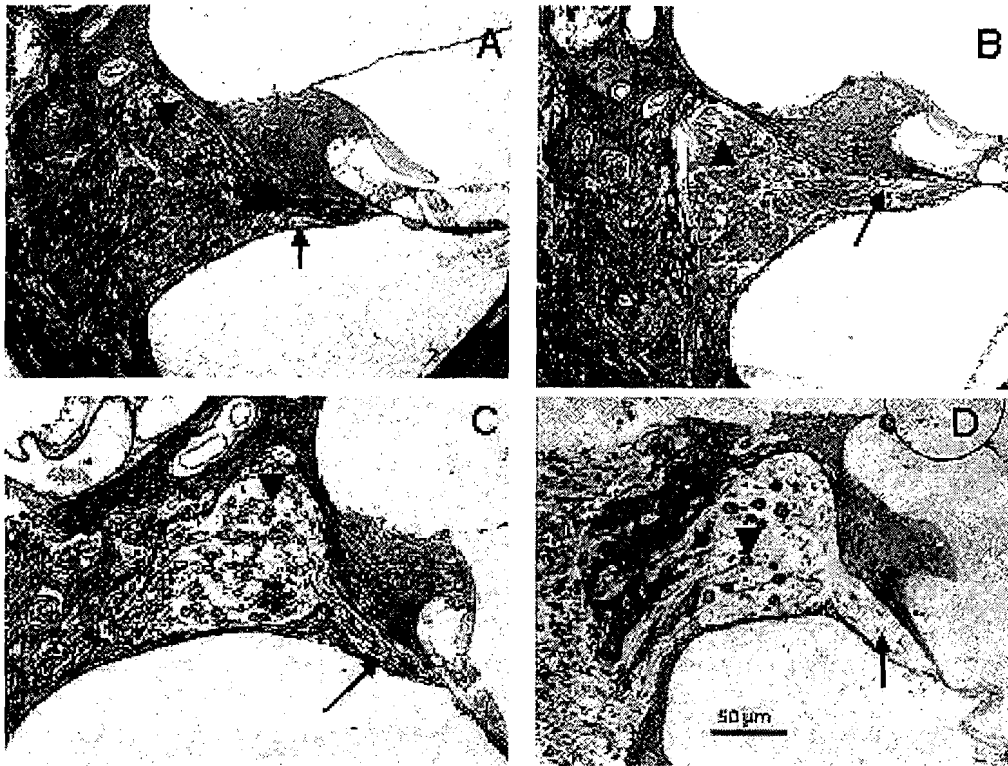


Fig. 2. Cortes semifinos de cócleas de ratas. Región medial superior. A) Rata control, B) Rata sorda de 4 semanas, C) Rata sorda de 8 semanas, D) Rata sorda de 16 semanas. Neuronas en el canal de Rosenthal (cabezas de flechas); procesos periféricos que inervan el órgano de Corti (flechas). Nótese reducción progresiva de la densidad neuronal y de los procesos periféricos con el tiempo de sordera.

El hecho de que la densidad neuronal se haya mantenido similar en los controles de 2 y 16 semanas permite concluir que esta variable no sufre efecto de envejecimiento en este período. Entonces, las diferencias encontradas entre el grupo de sordera de 16 semanas con respecto a su control deben atribuirse al daño ototóxico.

La escasez de los procesos periféricos que inervan el órgano de Corti en animales sordos se ha descrito como signo de degeneración.^{1,7} Esto provoca que el sitio de generación de potenciales de acción tenga que trasladarse hacia el soma de las neuronas del ganglio espiral o al axón central, lo que tiene implicaciones para la aplicación de los implantes cocleares.⁸

En este trabajo se demostró que como consecuencia de una sordera sensorineural inducida a ratas adultas por una combinación de kanamicina y furosemida, se produjo una disminución progresiva en la densidad de neuronas del ganglio espiral a partir de las 4 semanas. Sin embargo, se hace necesario realizar un estudio morfométrico a fin de cuantificar las variaciones en la densidad neuronal.

Resultados similares han sido obtenidos por varios autores utilizando gatos jóvenes y adultos.⁹⁻¹⁰

Además de la comprobación de la eficacia del modelo de sordera empleado, la normalización de las técnicas y los cambios degenerativos encontrados, hacen que este trabajo sirva de base para estudios posteriores encaminados a lograr la preservación de las células del ganglio espiral en ratas adultas sordas.

CONCLUSIONES

- Con la técnica de inclusión en resinas precedida de fijación por perfusión vascular con formalina y descalcificación con EDTA, se obtuvo una preservación satisfactoria de las cócleas, que permite el estudio por Microscopía Óptica y Electrónica.
- Desde las 4 semanas posteriores al tratamiento con kanamicina y furosemida a ratas adultas, se observó reducción progresiva de la densidad neuronal del ganglio espiral y de los procesos periféricos que inervan al órgano de Corti.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Lariot Sánchez, del IMRE por su cooperación en el mantenimiento de los equipos necesarios para la realización de este trabajo.

Agradecemos al Dr. Eddy Sánchez, jefe del Banco de Tejidos del Hospital "Frank País", que gentilmente permitió que se realizara en su laboratorio la digitalización de imágenes.

A la Téc. María Xiomara Gil Gil, del Instituto de Neurología y Neurocirugía, por su cooperación durante la digitalización de imágenes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shepherd R.K. y Hardie N.A. Deafness-Induced Changes in the Auditory Pathway: Implications for Cochlear Implants. **Audiol. Neuro-Otol.** 6, 305, 2001.

2. Leake P.A., Snyder R.L., Rebscher S.J., Hradek G.T., Moore C.M., Vollmer M. y Sato M. Long-Term Effects of Deafness and Chronic Electrical Stimulation of the Cochlea. **Cochlear Implants**, Chapter 3, ed. Waltzman and Cohen, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, 31-41, 2000.

3. Freeman S, Khvoles R, Cherny L y Sohmer H. Effect of long-term noise exposure on the developing and developed ear in the rat. **Audiol. Neuro-Otol.** 4, 207, 1999.

4. Ohlemiller KK y Dugan LL. Early Elevation of Cochlear Reactive Oxygen Species following Noise Exposure. **Audiol. Neuro-Otol.** 4, 229, 1999.

5. Leake PA, Snyder RL, Hradek GT y Rebscher SJ. Consequences of chronic extracochlear electrical stimulation in neonatally deafened cats. **Hearing Res.** 82, 65, 1995.

6. Leake PA, Hradek GT, Rebscher SJ y Snyder RL. Chronic intracochlear electrical stimulation induces selective survival of spiral ganglion neurons in neonatally deafened cats. **Hearing Res.** 54, 251, 1991.

7. Leake PA, Hradek GT, and Snyder RL. Chronic electrical stimulation by a cochlear implant promotes survival of spiral ganglion neurons after neonatal deafness. **J. Comp. Neurol.** 412, 543, 1999.

8. Shepherd RK, Baxi JH y Hardie NA. Electrical stimulation of the auditory nerve: single neuron strength – duration functions in deafened animals. **Ann. Biomed. Eng.** 29, 195, 2001.

9. Xu J, Shepherd RK, Millard RE y Clark GM. Chronic electrical stimulation of the auditory nerve at high stimulus rates: a physiological and histopathological study. **Hearing Res.** 105, 1, 1997.

10. Araki S, Kawano A, Seldon HL, Shepherd RK, Funasaka S y Clark GM. Effects of chronic electrical stimulation on spiral ganglion neuron survival and size in deafened kittens. **Laryngoscope** 108, 687, 1998