

Morfometría de la estría vascular y el órgano de Corti ante el daño por kanamicina

Sandra Rodríguez-Salgueiro, Enoy Leiva-Pantoja, Rosa María Coro-Antich,* Odelsa Ancheta-Niebla, Tania Valdés-Prieto, Yahima Harvey-Pedroso y Mariuska Matos-Terrero.**

Laboratorio de Microscopia Electrónica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, *Laboratorio de Anatomía Patológica, Instituto de Neurología y Neurocirugía, **Escuela Latinoamericana de Medicina, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 11 de julio de 2009.

Aceptado: 12 de septiembre de 2009.

Palabras clave: estría vascular, órgano de Corti, cóclea, kanamicina, morfometría.

Key words: stria vascularis, organ of Corti, cochlea, kanamycin, morphometry.

RESUMEN. Las alteraciones morfológicas que inducen los aminoglucósidos en la estría vascular han sido muy poco estudiadas hasta el momento. Esta estructura no sensorial desempeña un papel importante en la audición, al ser la responsable de la generación del potencial endococlear necesario para el funcionamiento de las células ciliadas ubicadas en el órgano de Corti. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios temporales inducidos por kanamicina sobre las áreas de la estría vascular y del órgano de Corti. Se estudiaron cócleas de 17 ratas Wistar adultas sanas y sordas de 4, 8 y 16 semanas de sordera. La sordera se indujo por inyecciones intraperitoneales de kanamicina y furosemida. Los cortes histológicos se estudiaron por Microscopia Óptica de Alta Resolución: inclusión en resina Spurr, cortes semifinos en el plano horizontal y tinción con azul de Stevenel. Se midieron las áreas de la estría vascular y del órgano de Corti en las regiones apical, medial y basal de la cóclea. El tratamiento ototóxico provocó disminución de las áreas del órgano de Corti y de la estría vascular con respecto al grupo control. La disminución del área del órgano de Corti se observó en todos los grupos de animales sordos. El área del órgano de Corti fue menor a medida que aumentó el tiempo de sordera. Se detectó disminución del área de la estría vascular solo a las ocho y dieciséis semanas de sordera. La base de la cóclea fue la región más afectada, con disminución significativa de las dos áreas en todos los grupos de animales sordos. En la octava semana de sordera se dañaron las dos áreas en todas las regiones cocleares. De acuerdo con resultados previos de este grupo de trabajo, es también en la octava semana cuando se hace significativa la disminución de la densidad neuronal del ganglio espiral.

ABSTRACT. Morphological alterations induced by aminoglycosides on the stria vascularis have not been extensively studied. This non-sensorial structure plays an important role in audition, since it is responsible for the generation of the endocochlear potential needed for hair cells of the organ of Corti's performance. The objective of this work was to study the temporal changes induced by kanamycin on stria vascularis and organ of Corti's areas. Cochleae from 17 adult Wistar rats (normal hearing and deafened during 4, 8 and 16 weeks) were studied. Deafness was induced by means of intraperitoneal injections of kanamycin and furosemide. Histological sections were studied by High Resolution Light Microscopy: Spurr resin' embedding, semithin sections in the horizontal plane and Stevenel's blue dye. Stria vascularis and organ of Corti's areas were measured in apical, middle and basal regions of the cochlea. Ototoxic treatment caused reduction of stria vascularis and organ of Corti's areas. Reduction of organ of Corti's area was observed in all the groups of deaf animals. Organ of Corti's area was smaller as the time of deafness increased. Stria vascularis' area reduction was detected only at eighth and sixteenth weeks of deafness. Cochlear base was the most affected region, with significant reduction of both areas in all the groups of deaf animals. In the eighth week, the two areas were damaged in all cochlear regions. According to previous results of this working team, in the eighth week also spiral ganglion neuronal density reduction becomes significant.

INTRODUCCION

Los aminoglucósidos inducen pérdidas auditivas y cambios morfológicos degenerativos en varias estructuras cocleares: el órgano de Corti (OC), el ganglio espiral (GE) y la estría vascular (EV)^{1,2}

En artículos publicados por este mismo grupo de trabajo, en los que se trataron ratas con kanamicina y furosemida, se demostró cualitativamente por Microscopia Óptica y Electrónica, la degeneración progresiva del OC a partir de las dos semanas de sordera y la dis-

Correspondencia:

M.C. Sandra Rodríguez Salgueiro

Laboratorio de Microscopia Electrónica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: sandra.rodriguez@cnic.edu.cu

minución de la densidad neuronal del GE a partir de las ocho semanas de sordera.^{3,4} También se ha demostrado que el daño inducido por ototóxicos sigue un gradiente morfológico coclear que se expresa por una mayor sensibilidad (pérdida de células ciliadas y neuronas) en la base que en el ápice.⁵ Sin embargo, las alteraciones morfológicas que se producen por aminoglucósidos en la EV han sido muy poco estudiadas hasta el momento.⁶

La EV es una estructura presente en la cara lateral de la cóclea, localizada a continuación del OC. La importancia de esta estructura no sensorial radica en que allí se forma la endolinfa, fluido extracelular único en mamíferos, caracterizado por una elevada concentración de potasio (que secreta la EV), y se genera el potencial endococlear necesario para la transducción sensorial de las células ciliadas del OC.^{7,8}

El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios temporales inducidos por kanamicina, aminoglucósido de ototoxicidad intermedia, sobre las áreas de la EV y del OC.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron cócleas de 17 ratas machos Wistar adultas sanas y sordas de 4, 8 y 16 semanas de sordera (4 a 5 animales por grupo). Al inicio del experimento, se comprobó el estado funcional normal de la vía auditiva de todos los animales mediante técnicas electrofisiológicas de potenciales evocados auditivos transientes de tallo encefálico (PEATC) y potenciales evocados auditivos de estado estable (PEAEE). La sordera se indujo por inyecciones intraperitoneales de kanamicina (400 mg/kg) y furosemida (150 mg/kg).⁹ Una semana después del tratamiento ototóxico se comprobaron pérdidas auditivas en todos los animales mediante las mismas técnicas electrofisiológicas. Se consideraron sordos los animales que no presentaron respuesta a la intensidad de 105 dB pSPL para PEATC y de 105 dB SPL para PEAEE (1dB SPL = 20 μ Pa).

El procedimiento de obtención y procesamiento de las cócleas se realizó siguiendo la metodología descrita en un artículo previo.¹⁰ Se realizó la fijación por perfusión vascular de todos los animales con ayuda de una bomba peristáltica. Los animales se decapitaron y se extrajeron las cócleas, las cuales se procesaron siguiendo la técnica de inclusión en resina Spurr. Se obtuvieron cortes semifinos en el plano horizontal de la cóclea, que se tiñeron con Azul de Stevenel. Los cortes histológicos se estudiaron por Microscopia Óptica de Alta Resolución.

El estudio morfométrico se llevó a cabo por métodos de digitalización y procesamiento de imágenes. Se seleccionaron la EV y el OC en las zonas apical, medial superior, medial inferior y basal de la cóclea (Fig. 1) en cinco cortes histológicos por animal.

Se utilizó una cámara de video CCD marca SONY acoplada a un Microscopio Óptico modelo Axiostar (Karl Zeiss). Las imágenes se tomaron a una magnificación de 20x. Se utilizó una tarjeta digitalizadora de imágenes en color marca ATI. Las imágenes se digitalizaron con una resolución de 320 píxeles x 236 píxeles (área de un píxel = 0,016 μ m²).

La morfometría computarizada se realizó mediante el programa Image J¹¹ y se midieron las áreas de la EV y del OC. La delineación sobre las estructuras a medir se realizó con el instrumento de trazado libre del programa Image J previamente calibrado.

Para determinar el área de la EV se delineó la zona limitada por las células marginales y las células basales en un eje y por la prominencia espiral y la membrana de Reissner en el otro (Fig. 2).

El área del OC se determinó trazando el área comprendida desde el borde de las células ciliadas internas hasta el final de la vertiente externa del OC, excluyendo la membrana basilar (Fig. 3).

Análisis estadístico

Los valores obtenidos de las mediciones en las zonas mediales superior e inferior se fundieron en la zona medial. Para el procesamiento estadístico se empleó el programa Graph Pad InStat versión 3.0 para Windows. En todos los casos, se determinaron los valores de media y desviación estándar mediante estadística descriptiva. La normalidad y homogeneidad de varianza de los datos se comprobó utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre varios tratamientos se detectaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Las medias de dichos tratamientos se compararon utilizando la prueba de comparaciones múltiples de medias Turkey-Kramer.

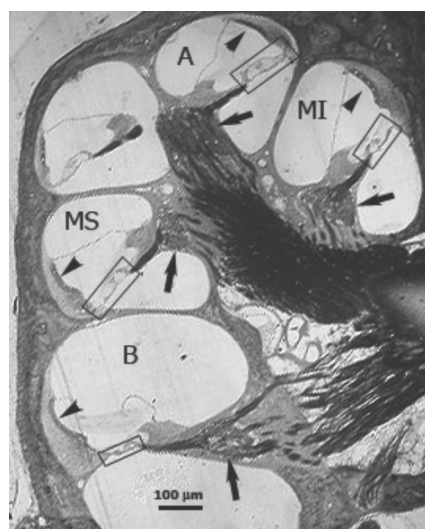


Fig. 1. Vista panorámica de un corte de cóclea de animal sano en el plano horizontal. Zonas cocleares: A (apical), MS (medial superior), MI (medial inferior), B (basal). Rectángulos (órgano de Corti). Saetas (ganglio espiral). Cabezas de Saetas (estría vascular).

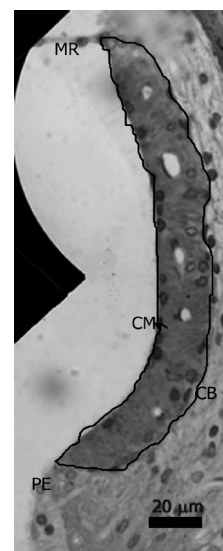


Fig. 2. Cóclea de rata sana. Estría vascular (área delineada en trazo blanco). MR: membrana de Reissner, CM: células marginales, PE: prominencia espiral, CB: células basales. Imagen reconstruida con el programa Arcsoft Panorama Maker 3.0.

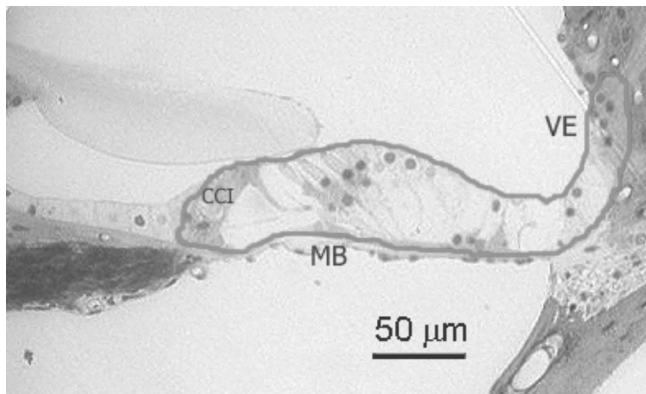


Fig. 3. Cóclea de ratona sana. Órgano de Corti (área delineada en trazo negro). CCI: células ciliadas internas, VE: vertiente externa, MB: membrana basilar.

RESULTADOS

Comportamiento de las áreas de la estría vascular y del órgano de Corti por zonas cocleares en el tiempo

Estría vascular

En todos los animales (sanos y sordos) el área de la EV fue mayor hacia la base.

En los grupos de animales sordos de 8 y 16 semanas se observó una disminución del área de la EV respecto a los controles en las tres zonas cocleares estudiadas (Figuras 4 y 5). A las cuatro semanas de sordera, solo hubo disminución del área de la EV respecto al grupo control en la zona basal (Fig. 5). Entre los animales sordos de 8 y 16 semanas no hubo diferencias en cuanto al área del OC en las tres regiones cocleares estudiadas.

Órgano de Corti

En los animales sanos el área del OC no varió en las tres regiones estudiadas. En todos los grupos de animales sordos, los valores de área del OC fueron mayores en el ápice que en las dos zonas restantes, las cuales no difirieron entre sí.

En los grupos de animales sordos de 8 y 16 semanas se observó una disminución del área del OC respecto a los controles en las tres zonas cocleares estudiadas (Figuras 6 y 7). A las 4 semanas de sordera, solo hubo disminución del área del OC respecto al grupo control en las zonas medial y basal (Fig. 7). Entre los animales sordos de 8 y 16 semanas no hubo diferencias en cuanto al área del OC en las tres regiones cocleares estudiadas.

Comportamiento de las áreas promedio de la estría vascular y del órgano de Corti en el tiempo

Se promediaron los valores de las áreas de la EV y del OC de todas las zonas de cada animal. El área de la EV disminuyó con respecto al grupo de animales sanos, a partir de la octava semana de sordera [Fig. 8 (Superior)]. El tratamiento ototóxico provocó disminución del área del OC en todos los animales sordos con respecto a los sanos. Esta disminución fue progresiva a partir de la cuarta semana de sordera [Fig. 8 (Inferior)].

DISCUSIÓN

Animales sanos

En los animales sanos el área de la EV aumentó hacia la base, en correspondencia con lo que se conoce como comportamiento normal.¹²

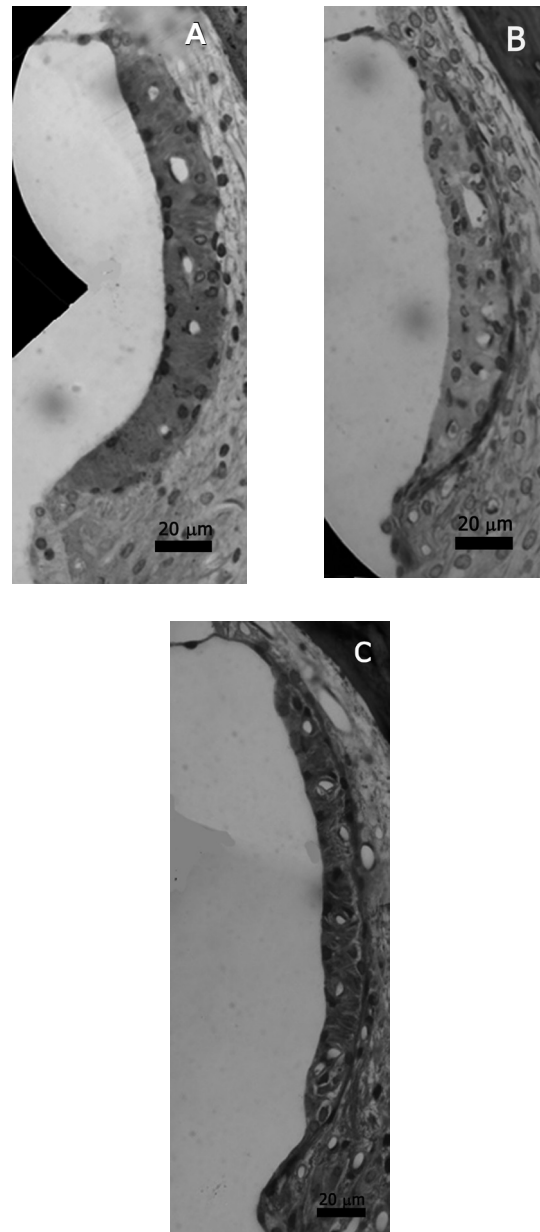


Fig. 4. Microfotografías de la estría vascular en la zona medial de la cóclea al Microscopio Óptico. A) Control. B) Sordera 8 semanas. C) Sordera 16 semanas. Imágenes reconstruidas con el programa Arcsoft Panorama Maker 3.0.

No hubo diferencias significativas en cuanto al área del OC entre las tres regiones estudiadas. Como se conoce que en cócleas normales la longitud de la membrana basilar del OC disminuye hacia la base de la cóclea,¹³ el área del OC solo depende de la capa de células sobre la membrana basilar. Esto es lo que permite utilizar el área del OC como un posible indicador del grado de conservación de esas células.

Animales sordos

La disminución de las áreas de la EV y del OC encontradas en este trabajo, demuestran que estas áreas son indicadores de la degeneración coclear por aminoglucósidos. Otros autores han medido el área de la EV con este mismo propósito.^{1,6} Sin embargo, no se han encontrado referencias con respecto a la medición del área del OC.

En este trabajo se encontró que el área de la EV a las 8 y 16 semanas de sordera disminuyó significativamente

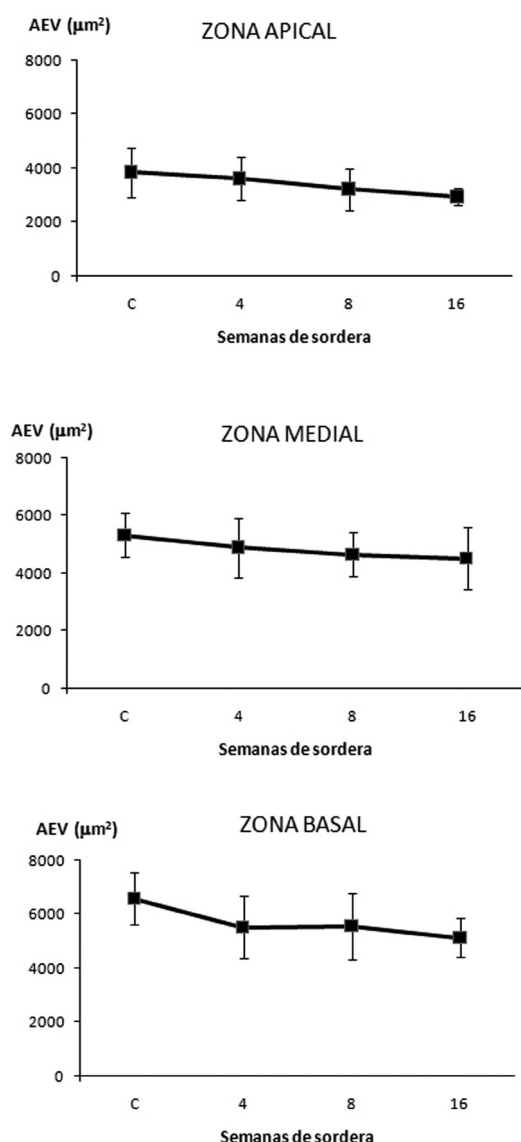


Fig. 5. Comportamiento del área de la estría vascular (AEV) en los grupos de animales sordos en las tres zonas estudiadas. Media y desviación estándar. C: Grupo control.

respecto al grupo de animales sanos en las tres zonas cocleares. Estos resultados coinciden con las diferencias en el área de la EV entre animales sanos y sordos encontradas por Hellier y cols. en estos mismos tiempos.⁶

A diferencia de los animales sanos, en los sordos, el área del OC disminuyó hacia la base de la cóclea. El gradiente morfológico de daño coclear por ototoxicidad, que se expresa como mayor sensibilidad en la base que en el ápice, ya ha sido reportado. La base de la cóclea es la región donde se transducen las altas frecuencias y las bajas se transducen en el ápice. El rango de frecuencias se distribuye tonotópicamente a lo largo del conducto coclear, desde la base hasta el ápice.¹⁴ También se ha planteado que dicho gradiente de base a ápice puede ser el resultado de una susceptibilidad diferencial de las CC externas a las especies reactivas del oxígeno que genera el agente ototóxico.⁵

En este estudio, se confirmó que la kanamicina coadministrada con furosemida a ratas induce una sordera sensorineural, al provocar la degeneración progresiva del OC. En los animales sordos el área del OC se redujo gradualmente con el tiempo de sordera. Estos resultados

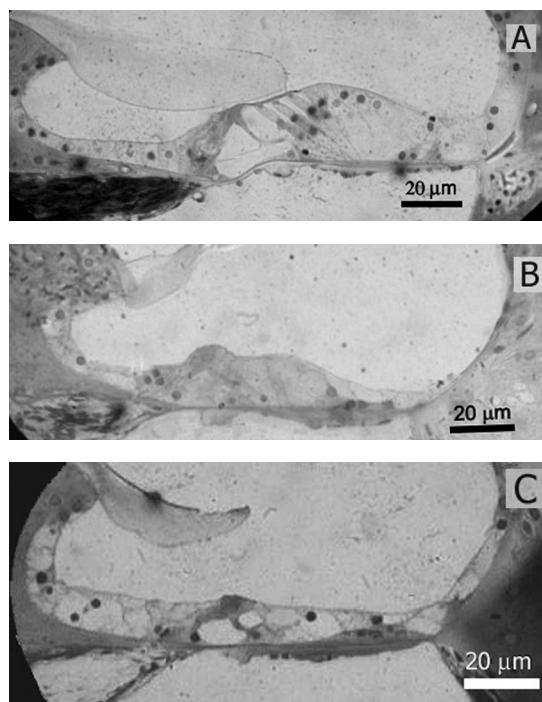


Fig. 6. Microfotografías del órgano de Corti en la zona medial de la cóclea al Microscopio Óptico. A) Control. B) Sordera 8 semanas. C) Sordera 16 semanas. Imágenes reconstruidas con el programa Arcsoft Panorama Maker 3.0.

confirman los cambios degenerativos en las células del OC demostrados cualitativamente en trabajos anteriores de este mismo grupo.^{3,4} En este modelo de sordera se había comprobado cualitativamente la degeneración de las células del OC y de las neuronas del GE desde las dos semanas.^{3,4}

El incremento no significativo del área del OC en la semana 16 no estuvo relacionado con una recuperación del estado de las células ciliadas y se atribuya un aumento en la vacuolización de las células de sostén.⁴ Sin embargo, la densidad neuronal del GE correspondiente sí experimenta una reducción progresiva hasta las 16 semanas de sordera.³ La muerte de las células ciliadas inducida por drogas ototóxicas provoca el cese del efecto trófico que ejercen esas células sobre las neuronas del GE. Esto se debe a la interrupción de la aferencia de las neuronas del GE, al perderse las prolongaciones neuronales que inervan el OC, las cuales se desmielinizan y degeneran gradualmente hasta ocasionar la muerte celular.^{15,3}

La disminución del área de la EV en los animales sordos probablemente no sea un resultado directo de la intoxicación por el aminoglicósido, sino una reducción de la carga metabólica debido a la degeneración del OC.⁶ Se ha planteado que los daños estriales no son un prerequisite del daño de las células ciliadas.¹⁶

En la octava semana de sordera se afectan las dos áreas en todas las regiones cocleares. De acuerdo con resultados previos de este grupo de trabajo,³ es también en la octava semana cuando se hace significativa la disminución de la densidad neuronal del GE.

CONCLUSIONES

El tratamiento ototóxico con kanamicina provoca disminución de las áreas de la EV y del OC.

La sensibilidad de las células del OC y la EV a la ototoxicidad evidencian lo importante que resulta conocer

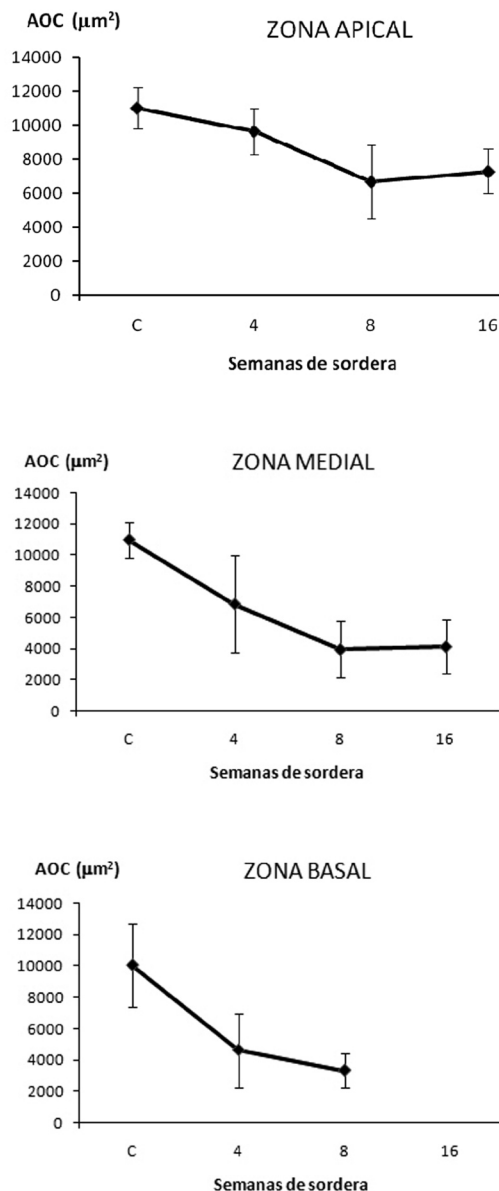


Fig. 7. Comportamiento del área del órgano de Corti (AOC) en los grupos de animales sordos en las tres zonas estudiadas. Media y desviación estándar. En la zona basal no se realizó el estudio morfométrico en el grupo de 16 semanas de sordera, por no tener suficientes cortes histológicos de buena calidad. C: Grupo control.

los cambios morfológicos que experimentan estas células vitales en la función auditiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kusunoki T, Cureoglu S, Schachern PA, Sampaio A, Fukushima H, Oktay ME, *et al.* Effects of aminoglycoside administration on cochlear elements in human temporal bones. *Auris Nasus Larynx*. 2004;31:383-388.
- Rybak LP and Ramkumar V. Ototoxicity. *Kidney International*. 2007;72:931-935.
- Rodríguez S, Ancheta O, Coro RM, Valdés T, Harvey Y, Alvaré A, *et al.* Cambios histológicos inducidos por ototoxicidad en ratas. Citoarquitectura del órgano de Corti y del ganglio espiral. *Rev Ecuat de Neurología*. 2005;14(1-3):13-17.
- Rodríguez S, Ancheta O, Coro RM, Valdés T, Harvey Y, Alvaré A, *et al.* Efecto de un tratamiento ototóxico en la ultraestructura coclear. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas*. 2007;38(3):214-219.

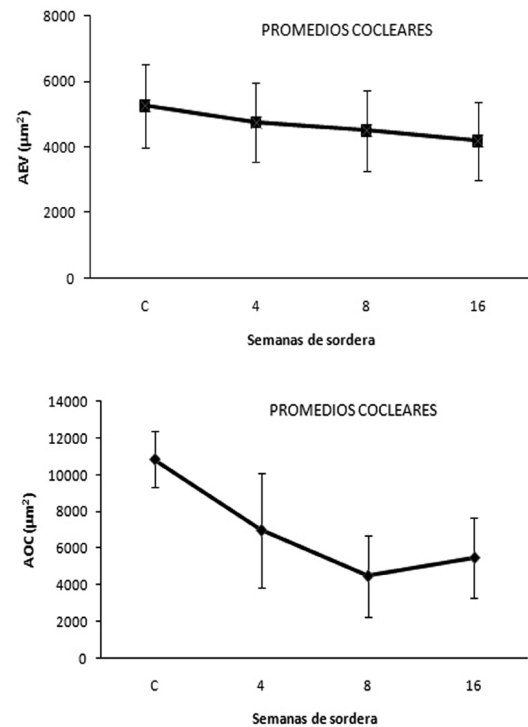


Fig. 8. Comportamiento de los valores promedios de las áreas de la estria vascular (AEV) y del órgano de Corti (AOC) en todos los grupos. C Grupo control (animales sanos). Superior: AEV. Inferior: AOC. Media y desviación estándar.

- Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear Res*. 2001;155:1-8.
- Hellier WPL, Wagstaff SA, O'Leary SJ, Shepherd RK. Functional and morphological response of the stria vascularis following a sensorineural hearing loss. *Hear Res*. 2002;172:127-36.
- Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear Res*. 2002;165:1-9.
- Wangemann P. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol*. 2006;576.1:11-21.
- Prado P, Alvaré A, Rodríguez V. Efecto de la sordera sensorineural sobre el ganglio espiral de ratas adultas: Desarrollo de un biomodelo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2006;37:372.
- Rodríguez S, Valdés T, Harvey Y, Ancheta O, Rodríguez V, Alvaré A, *et al.* Preparación histológica de cócleas de ratas y su aplicación a estudios de sordera. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2006;37:385.
- Wayne Rasband. Image J. A public domain Java image processing program. National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. On line: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Consultado: 27 de mayo de 2008.
- Lopes Sampaio A, Augusto C. Structure and Ultrastructure of the Mammalian Inner Ear with Emphasis in the Cochlea. *International Arch Otorhinolaryngol*. 2006;10(3):228-240.
- Geneser F. Histología sobre bases moleculares. Capítulo 25. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.: 1999:729-754.
- Raphael Y, Altschuler RA. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*. 2003;60:397-22.
- Alam A, Robinson K, Huang J, Green H. Prosurvival and Proapoptotic Intracellular Signaling in Rat Spiral Ganglion Neurons *In Vivo* After the Loss of Hair Cells. *J Comp Neurol*. 2007;503:832-852.
- Forge A, Schacht J. Aminoglycoside Antibiotics. *Audiol Neurotol*. 2000;5:3-22.