



## Cambios histológicos en la cóclea en un modelo de ototoxicidad. 2. Microscopía electrónica

Sandra Rodríguez Salgueiro\*, Odelsa Ancheta\*, Rosa María Coro\*\*, Tania Valdés\*, Yahima Harvey\*, Armando Alvaré\*\*\*, Valia Rodríguez\*\*\*, Pavel Prado\*\*\*\*

\* Centro Nacional de Investigaciones Científicas CUBA

\*\* Instituto de Neurología y Neurocirugía CUBA

\*\*\* Centro de Neurociencias de Cuba CUBA

\*\*\*\* Cantro de Neurociencias de Cuba CUBA

### Resumen

**Introducción:** En este trabajo se estudian las células tipo I del ganglio espiral (GE) de la cóclea. Además de ser las más susceptibles al daño, constituyen el 95% de la población celular, por lo que son decisivas en la aplicación de los implantes cocleares. En un estudio previo al microscopio óptico, desde la segunda semana de sordera se observó daño a las células ciliadas del órgano de Corti. La degeneración y pérdida de las células del GE solo fue significativa a partir de la octava semana de sordera. **Objetivo:** Estudiar la ultraestructura de las neuronas del GE para precisar el inicio de los cambios degenerativos en un modelo de ototoxicidad. **Métodos:** Se trabajó 10 con ratas Wistar adultas: dos controles sanos y 8 sordos (por kanamicina y furosemida). Se sacrificaron los animales a las 2, 4, 8 y 16 semanas de sordera. Las cócleas se procesaron para Microscopía Electrónica de Transmisión. **Resultados:** A partir de la segunda semana aparecen puntos de retracción citoplasmática con respecto a la vaina de mielina, y ligeras ondulaciones en la envoltura nuclear, que se hacen más pronunciadas en la cuarta semana. En la octava semana aparecen inclusiones citoplasmáticas y dilatación de los cuerpos de Nissl, entre otras alteraciones. En la semana 16 las células tipo I se transforman en tipo III, con marcados signos de degeneración. **Conclusión:** Los resultados de la microscopía óptica determinaron una posible "ventana terapéutica" de 8 semanas. Los cambios detectados ultraestructuralmente desde la segunda semana sientan las bases del daño ulterior, más severo.

### Introducción

Las células del ganglio espiral (GE) son neuronas aferentes que llevan información desde la cóclea hacia el sistema auditivo central. En las cócleas normales se han descrito dos tipos de células de GE dentro del canal de Rosenthal: tipo I y tipo II (1). El presente trabajo dirige su atención a las células tipo I, las cuales representan aproximadamente 95% de las células del GE en la cóclea de las ratas (2) y son más susceptibles al daño que las del tipo II (3). Además, éstas células tipo I son altamente relevantes en la aplicación de los implantes cocleares (4). En un estudio previo por microscopía óptica (MO), se observó degeneración de las células del GE después del daño en las células ciliadas inducido por drogas ototóxicas en ratas (5). Aunque las células ciliadas mostraron cambios patológicos a partir de la segunda semana de

sordera, la pérdida de células del GE y sus procesos periféricos no fue significativa hasta la octava semana (5).

El propósito de este trabajo fue estudiar las cócleas de ratas al Microscopio Electrónico de Transmisión para precisar el comienzo de los cambios degenerativos inducidos por ototoxicidad al nivel ultraestructural.

### Material y Métodos

Se emplearon 10 ratas Wistar adultas del sexo masculino. Se utilizaron dos animales como controles sanos y el resto se sometió a una monodosis de kanamicina (400 mg/kg) y furosemida (150 mg/kg) para inducir la sordera. Se sacrificaron los animales sordos a las 2, 4, 8 y 16 semanas del tratamiento ototóxico (2 animales en cada tiempo). Se fijaron las cócleas en glutaraldehído y paraformaldehído, se descalcificaron en EDTA, se pos-fijaron en  $\text{OsO}_4$  y se incluyeron en resina Spurr. Para localizar la vuelta media de la cóclea se observaron al MO los cortes semifinos al nivel del plano medio del modiolo (6).

Los cortes ultrafinos se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Se estudiaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM 100S.

### Resultados

#### Observación de las cócleas de los animales controles sanos:

Las células del GE son neuronas mielínicas con núcleos redondeados, retículo endoplasmático rugoso (cuerpos de Nissl) de canales estrechos, vesículas de Golgi apiladas, y mitocondrias con sus crestas normales (Fig. 1).

#### Observación de las cócleas de los animales sordos:

**Animales sacrificados a la 2da semana de sordera:** Se ven signos de daño en las células del GE tales como algunos puntos de retracción citoplasmática con respecto a la vaina de mielina que rodea la célula y pequeñas ondulaciones de la envoltura nuclear (Fig. 2).

**Animales sacrificados a la 4ta semana de sordera:** Se observan prominentes irregularidades, tanto en la vaina de mielina como en la envoltura nuclear (Fig. 3), así como pérdida del aspecto normal de la matriz citoplasmática, escasez de cuerpos de Nissl y vesículas de Golgi dilatadas (Fig. 4).

**Animales sacrificados a la 8va semana de sordera:** Las células tipo I que quedan en el canal de Rosenthal muestran encogimiento del citoplasma con respecto a la vaina de mielina, así como inclusiones citoplasmáticas bastante prominentes (Fig. 5); también se observan invaginaciones de la envoltura nuclear, dilatación de los cuerpos de Nissl y vacuolización

citoplasmática (Fig. 6).

**Animales sacrificados a la 16ta semana de sordera:** La mayoría de las pocas células tipo I que quedan en el canal de Rosenthal muestran una completa desmielinización, resultando en las llamadas células del GE tipo III (3), las cuales se caracterizan por mitocondrias densas y escasos cuerpos de Nissl (Fig. 7).

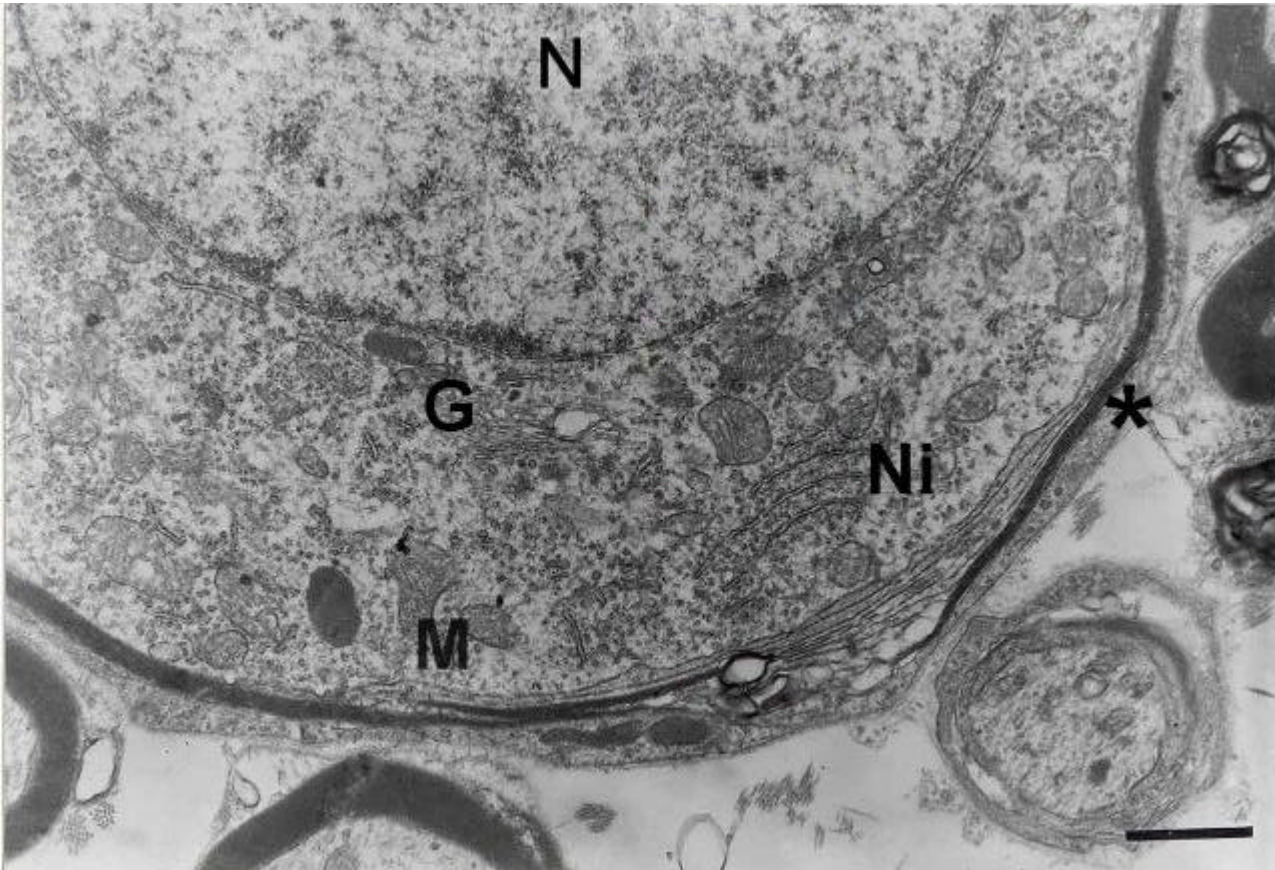


Figura 1: Células del ganglio espiral. Rata control. Barra = 1 $\mu$ . Núcleo (N), mitocondrias (M), cuerpos de Nissl (Ni), vesículas de Golgi (G), vaina de mielina (\*). Barra=1 $\mu$ m.

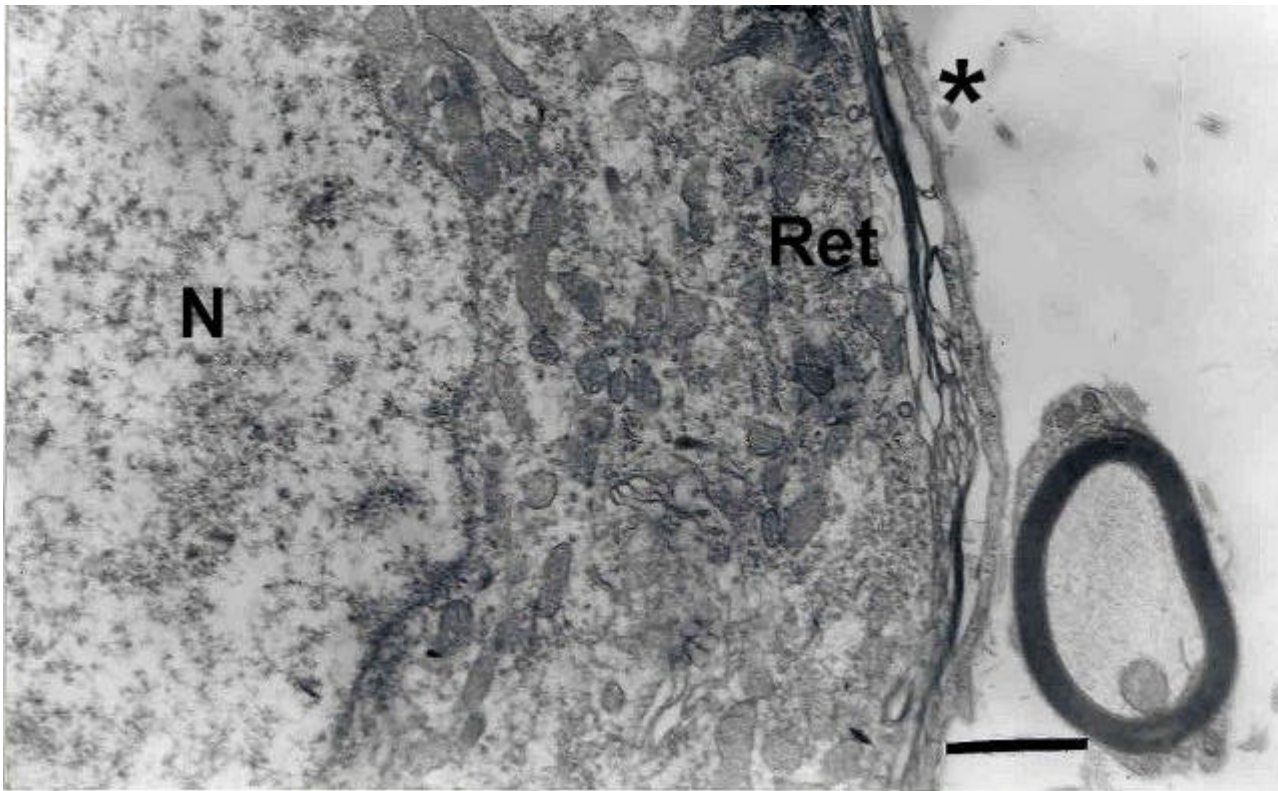


Figura 2: Células del ganglio espiral. Rata de 2 semanas de sordera. Núcleo (N), vaina de mielina (\*), retracción citoplasmática con respecto a la vaina de mielina (Ret). Barra=1µm.





Figura 3: Células del ganglio espiral. Rata de 4 semanas de sordera. Núcleo (N), invaginaciones de la vaina de mielina (\*) y de la envoltura nuclear (Env). Barra=1µm.

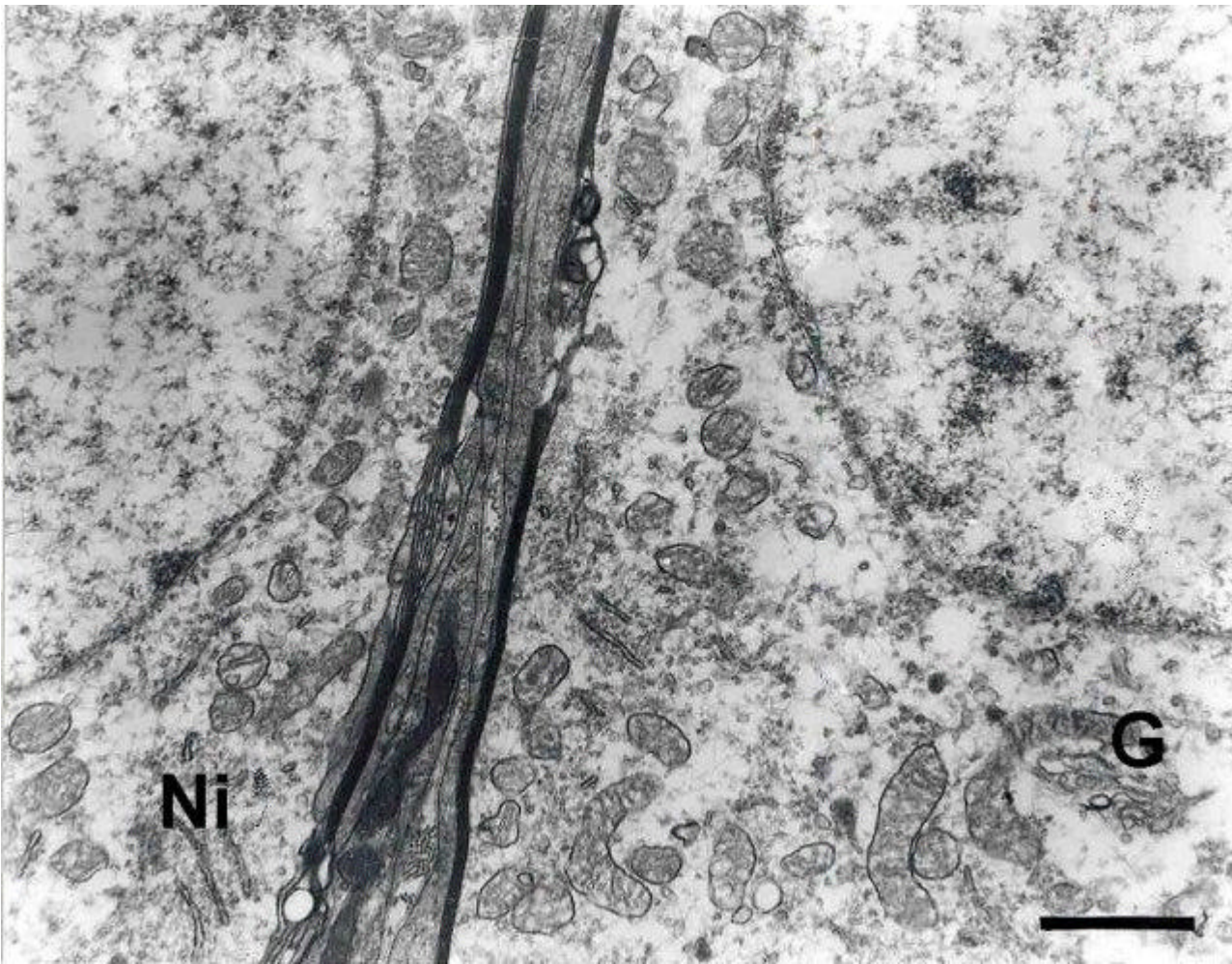


Figura 4. Células del ganglio espiral. Rata de 4 semanas de sordera. Cuerpos de Nissl (Ni) y vesículas de Golgi (G). Barra=1 $\mu$ m.



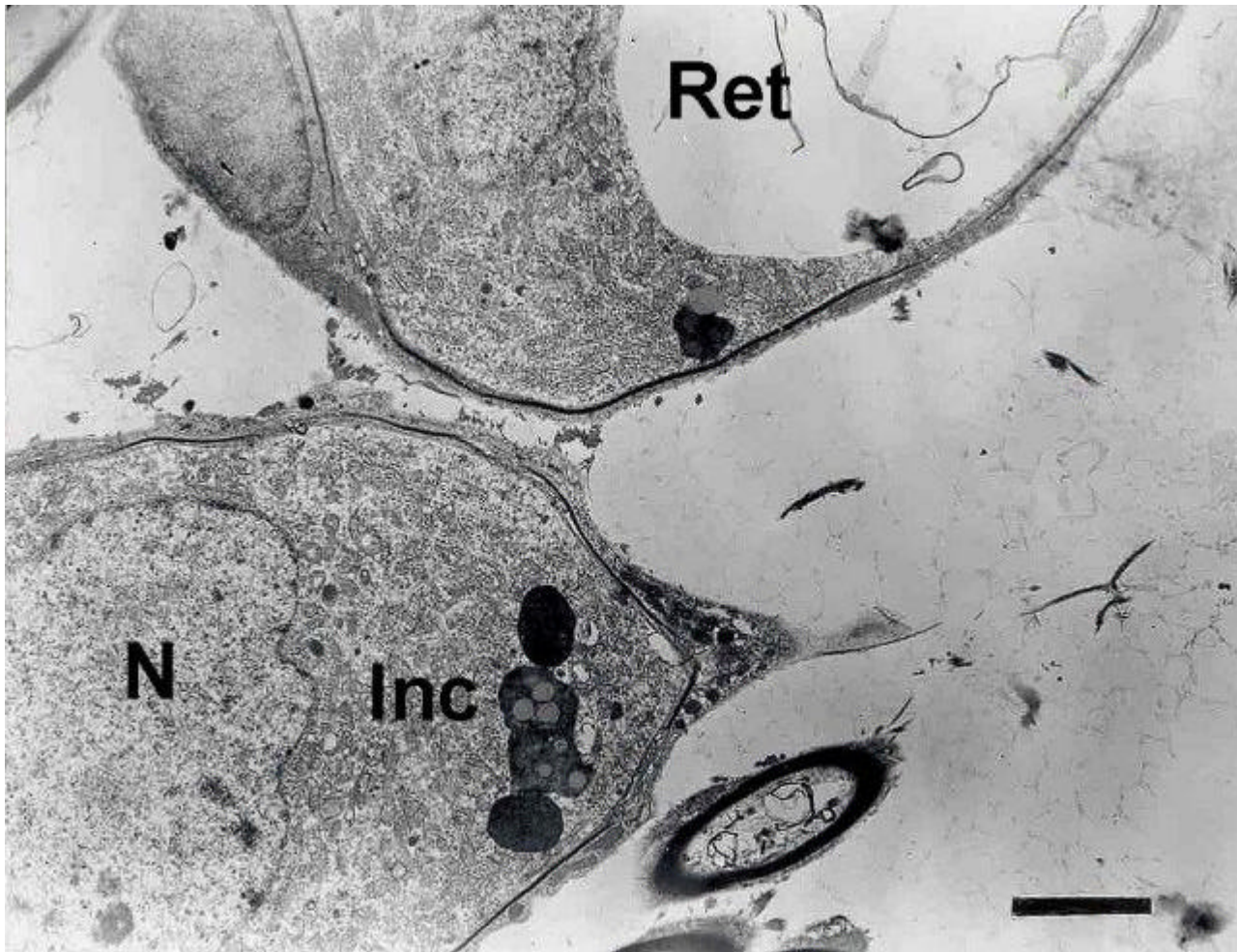


Figura 5: Células del ganglio espiral. Rata de 8 semanas de sordera. Núcleo (N), retracción citoplasmática con respecto a la vaina de mielina (Ret), e inclusiones citoplasmáticas (Inc). Barra=3  $\mu$ m.

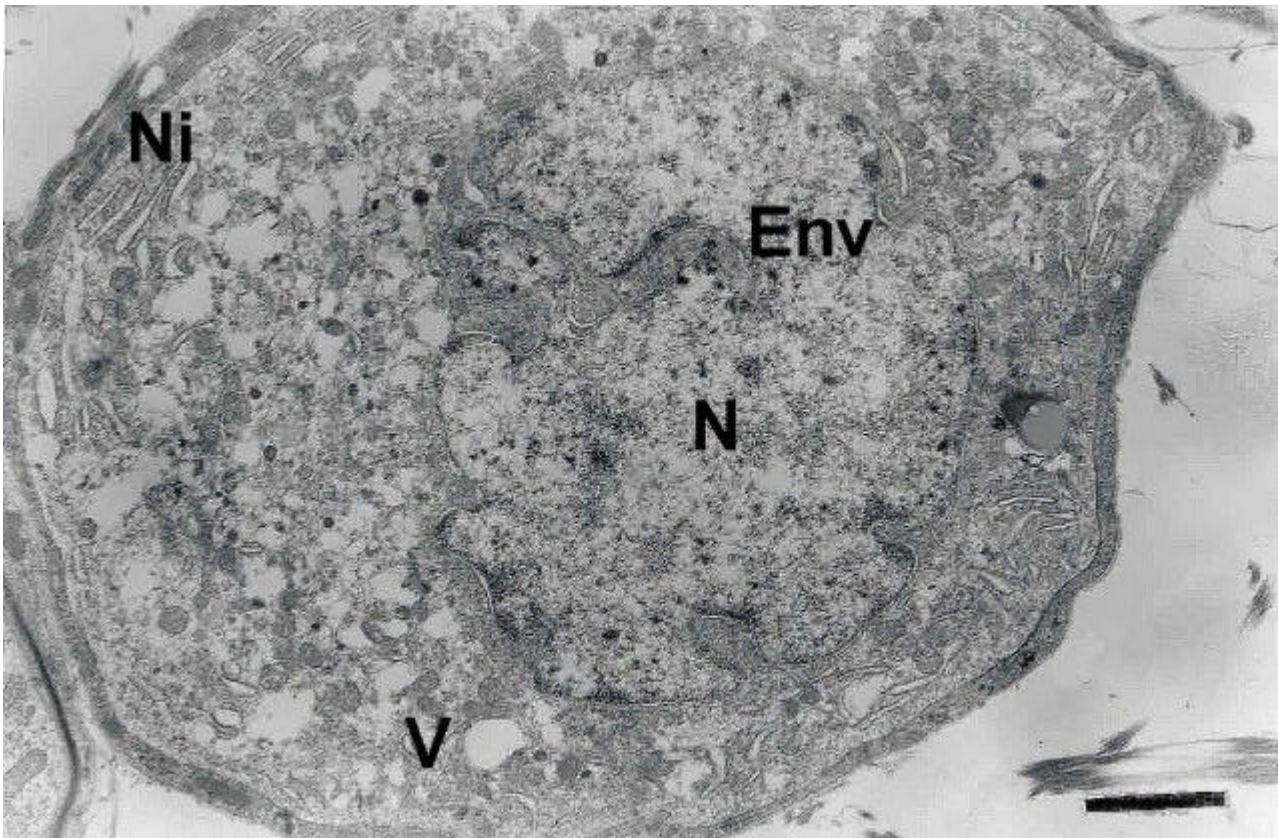


Figura 6: Células del ganglio espiral. Rata de 8 semanas de sordera. Núcleo (N), cuerpos de Nissl (Ni), vacuolas (V) e invaginaciones de la envoltura nuclear (Env). Barra= 1  $\mu$ m.



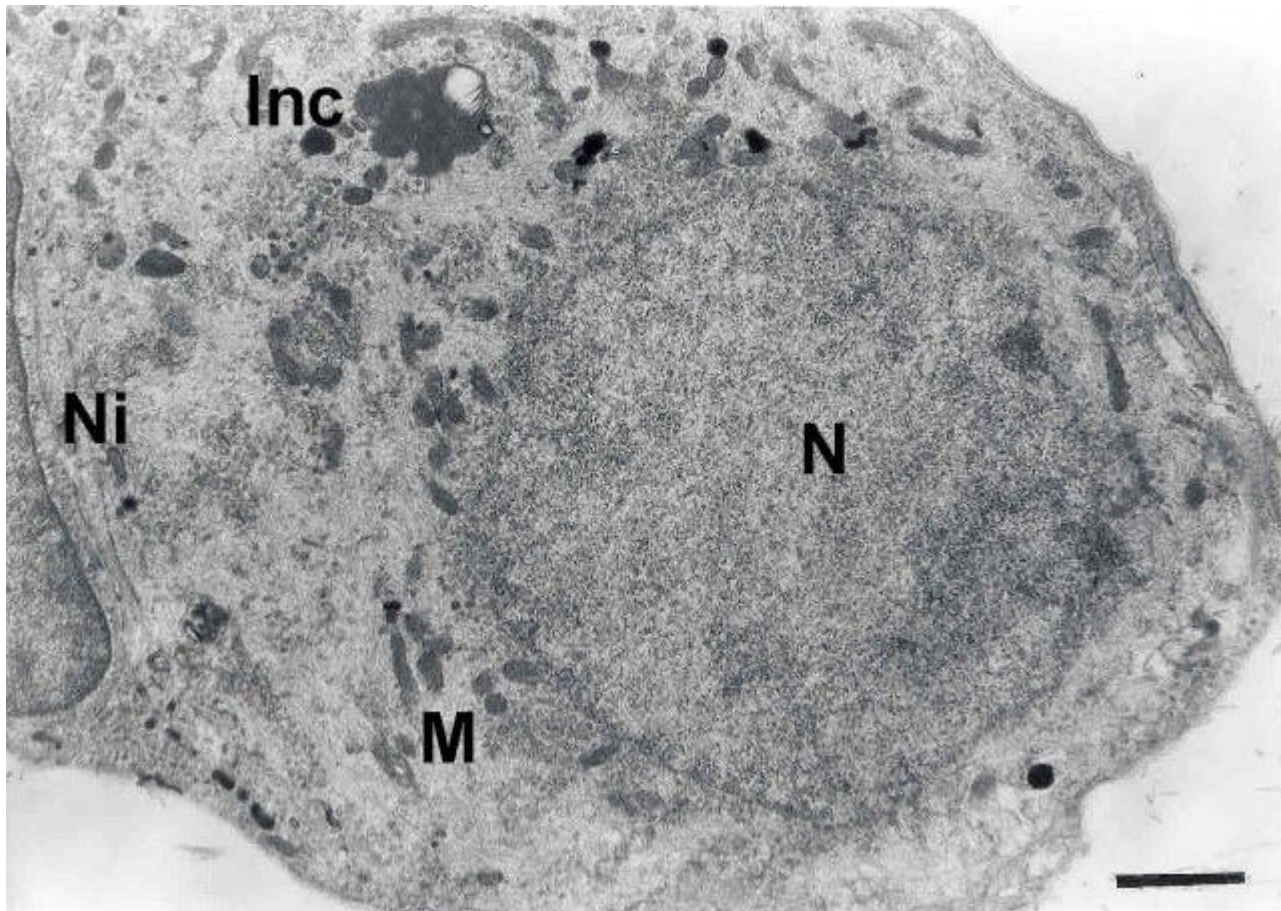


Figura 7. Células del ganglio espiral. Rata de 16 semanas de sordera. Núcleo (N), cuerpos de Nissl (Ni), mitocondrias (M) e inclusiones citoplasmáticas (Inc). Barra=2 $\mu$ m.

### Discusión

Los signos de daño inducido por ototoxicidad sobre las células del GE se detectaron ultraestructuralmente 6 semanas antes de que la microscopía óptica revelara la pérdida de las células del GE y de sus procesos periféricos (2). Los cambios degenerativos progresivos de las células tipo I del GE después de la sordera dan lugar al surgimiento de las neuronas tipo III, exclusivas de condiciones patológicas (4).

De acuerdo con los hallazgos de la MO, a las 8 semanas se determinó una posible ventana terapéutica. Sin embargo, ultraestructuralmente desde la segunda semana se detectan cambios patomorfológicos que preceden al daño ulterior, más severo.

### Bibliografía

- 1.- R. K, Shepherd. The Auditory System, Chapter 1.8. In: Neuroprosthetics: Theory and Practice, K. W. Horch & G. S. Dhillon (Eds), World Scientific Publishing, 2002, 600 pp.
- 2.- Keithley E.M., Ryan A. F. and Feldman M. L. Cochlear degeneration in aged rats of four strains. *Hear. Res.*, 59 (1992) 171-178.
- 3.- Leake P.A. and Hradek G.T. Cochlear pathology of long term neomycin induced deafness in cats. *Hearing Research*, 33 (1988) 11-34.
- 4.- 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.* 1999; 412, 543.
- 5.- Rodríguez S., Valdés T., Harvey Y., Ancheta O., Rodríguez V., Alvaré A., Coro R.M., Prado P., Gutiérrez F., Valmaña C. y Feston M. Preparación histológica de cócleas de ratas y su aplicación a estudios de sordera. *Revista CNIC Ciencias Biológicas* 2004, vol 34, No.3, Suppl, en prensa.
- 6.- Rodríguez S., Valdés T., Harvey Y., Ancheta O., Coro R.M. y Rodríguez V. Effects of an induced deafness in the spiral ganglion cells' density: a morphometric study. *Restorative Neurology and Neuroscience* 21 (5, 6), 2003.