

LAS CÉLULAS DEL ÓRGANO DE CORTI Y SU RELACION CON LAS NEURONAS DEL GANGLIO ESPIRAL EN UN MODELO DE OTOTOXICIDAD

Rodríguez S., S.^{1*}, Coro A., R. M.², Ancheta N., O.¹, Valdés P., T.¹, Harvey P., Y.¹, Leyva P., E.¹

¹ Laboratorio de Microscopía Electrónica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas
² Laboratorio de Anatomía Patológica, Instituto de Neurología y Neurocirugía, La Habana, Cuba.

*Autor de correspondencia: sandra.rodriguez@cnic.edu.cu

Recibido en Noviembre 28, 2007. Aceptado en Abril 12, 2008.

Publicado en-línea: Mayo 30, 2008

RESUMEN

La afectación de las células ciliadas cocleares, localizadas en el órgano de Corti constituye la causa primaria de pérdida auditiva, que induce la degeneración neuronal del ganglio espiral, resultando en sordera sensorineural. En trabajos anteriores se demostró la degeneración progresiva del órgano de Corti a partir de las 2 semanas de sordera y la disminución de la densidad neuronal del ganglio espiral a partir de las 8 semanas de sordera. Los objetivos de este trabajo son describir cambios morfológicos inducidos por ototoxicidad en el órgano de Corti y relacionar los valores de área del órgano de Corti con sus correspondientes valores de densidad neuronal del ganglio espiral. Se estudiaron cortes semifinos en las vueltas apical, media y basal de la cóclea de ratas adultas sanas y ensordecidas por kanamicina. Se midieron la longitud de la membrana basilar y el área del órgano de Corti y la densidad neuronal del ganglio espiral. Luego de la segunda semana de sordera se alteró la estructura del órgano de Corti en las tres vueltas cocleares, siendo los cambios más notables hacia la base. Se observó una disminución progresiva del área del órgano de Corti y la densidad neuronal del ganglio espiral en los animales sordos. Los cambios degenerativos de las células ciliadas y de soporte que se describen podrían justificar la disminución del área del órgano de Corti. La disminución de la densidad neuronal del ganglio espiral se debe, aparentemente, a que las células ciliadas afectadas dejan de ejercer su efecto trófico sobre esas neuronas.

Palabras clave: Células ciliadas cocleares, neuronas, ganglio espiral, Ototoxicidad.

THE ORGAN OF CORTI CELLS AND THEIR RELATION TO THE SPIRAL GANGLION IN AN OTOTOXICITY MODEL

ABSTRACT

The major cause of hearing loss is damage to the cochlear hair cells located in the organ of Corti, which induces the spiral ganglion neuronal degeneration, and results in sensorineural deafness. In previous works, progressive degeneration of the organ of Corti since the second week of deafness and reduction of the spiral ganglion neuronal density since the eighth week were demonstrated. The aims of this work were to describe morphological changes induced by ototoxicity in the organ of Corti and to correlate the areas of the organ of Corti with their corresponding spiral ganglion neuronal densities. Cochlear semithin sections from the apical, medial and basal turns of healthy and kanamycin-treated adult rats were studied. The basilar membrane length and area of the organ of Corti were measured, as well as spiral ganglion neuronal densities. Since the second week of deafness, the normal structure of the organ of Corti was altered in the three cochlear turns, and more evidently towards the basal turn. A progressive decline of the organ of Corti area and the corresponding spiral ganglion neuronal density was observed in deaf animals. The degenerative changes of hair and supporting cells described in this work might justify the area reduction of the organ of Corti. The decrease of spiral ganglion neuronal density is apparently due to the failure of the affected hair cells to exert their trophic effect upon those neurons.

Key words: Cochlear hair cells, Spiral ganglion, neuron, Ototoxicity.

INTRODUCCION

La causa primaria de pérdida auditiva es la afectación o muerte de las células receptoras sensoriales del oído interno, que son las células ciliadas (CC) cocleares del órgano de Corti (OC). Estas células, en mamíferos, no

tienen capacidad de regenerarse después que se han dañado [1], por lo que su desaparición lleva a una sordera permanente. Además, se conoce que el daño neuronal del ganglio espiral se debe a la pérdida del efecto trófico que ejercen las CC sobre esas neuronas [2].

En trabajos anteriores se demostró por Microscopia de Luz y Electrónica la degeneración progresiva del OC a partir de las 2 semanas de sordera [3] y la disminución de la densidad neuronal (DN) del ganglio espiral a partir de las 8 semanas de sordera [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 CC y neuronas) en la base que en el ápice [5]. Esto último concuerda con la disminución de la DN hacia la vuelta basal, observada en animales sordos [4].

Los objetivos de este trabajo fueron describir los cambios morfológicos inducidos por ototoxicidad en el órgano de Corti y relacionar los valores de área del órgano de Corti con sus correspondientes valores de densidad neuronal del ganglio espiral en ratas adultas sanas y sordas.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron cócleas de 22 ratas Wistar adultas sanas y sordas de 2, 4, 8 y 16 semanas de sordera (4-5 animales por grupo). La sordera se indujo por inyecciones intraperitoneales de kanamicina (400 mg/kg) y furosemida (150 mg/kg). Las cócleas se incluyeron en resina Spurr. Se realizaron cortes semifinos en el plano horizontal, que se tiñeron con Azul de Stevenel (Fig. 1) [4]. Se describió la morfología de las CC y células de soporte del OC (Fig. 2A) en las vueltas apical, media y basal de la cóclea.

La morfometría se llevó a cabo empleando el programa “Image J” [6]. Se midieron la longitud de la membrana basilar y el área del OC en una sección por animal, en las tres vueltas cocleares. La delineación sobre las estructuras a medir se realizó con el instrumento de trazado libre del programa “Image J” previamente calibrado. Se delineó el OC en la zona comprendida entre la célula ciliada interna y el final de la membrana basilar del lado de la vertiente externa (Fig. 2B).

Cada valor de área del OC se relacionó con un valor promedio de DN de su ganglio espiral. Se calculó la DN

(neuronas/mm²) dividiendo el número de neuronas entre el área del canal de Rosenthal (Fig. 3).

Se trabajó con un microscopio de luz Zeiss modelo Axiostar.

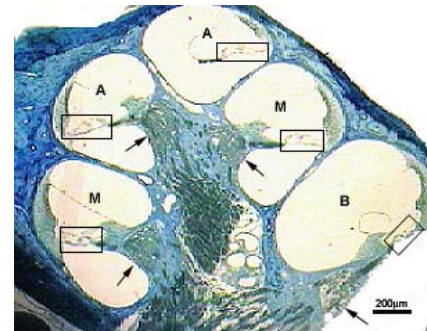


Fig. 1. Vista panorámica de un corte de cóclea de animal control en el plano horizontal. Vueltas cocleares: A-apical, M-media, B-basal. □ órgano de Corti. → ganglio espiral.

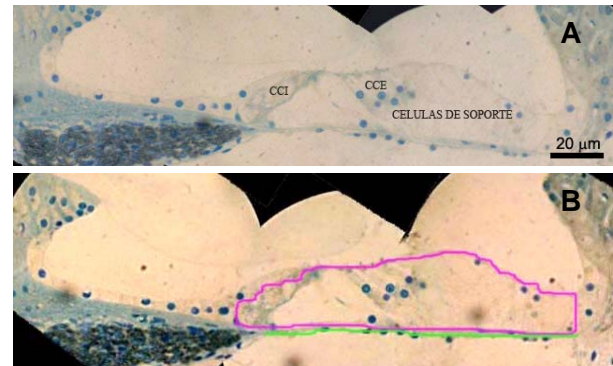


Fig. 2. Secciones del órgano de Corti de animal control. A) Análisis cualitativo: CCI-células ciliadas internas, CCE-células ciliadas externas. B) Análisis cuantitativo: longitud de la membrana basilar (línea verde); área del OC (trazo rosado). Imágenes reconstruidas con Arcsoft Panorama Maker 3.0.

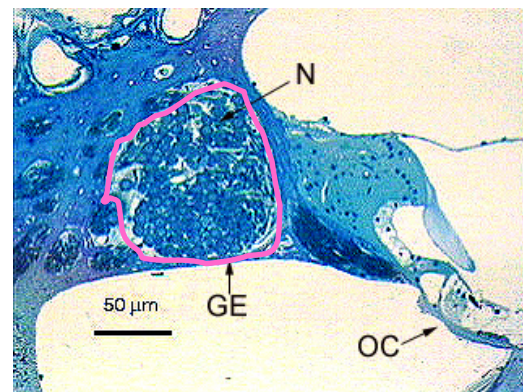


Fig. 3. Animal control. Sección del ganglio espiral (GE) ocupado por neuronas (N) y órgano de Corti (OC) adyacente. Canal de Rosenthal delineado en rosado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Animales controles

La morfología del OC en los animales controles siguió el patrón de normalidad [7] caracterizado por la presencia de 3 filas de CC externas, una fila de CC internas, separadas entre sí por un espacio conocido como túnel de Corti, que disminuye de tamaño de ápice a base, y varios tipos de células de soporte. Todas estas células están organizadas como un epitelio en mosaico (Fig. 4).

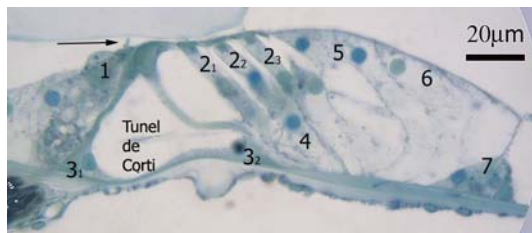


Fig. 4. Órgano de Corti en la vuelta media de la cóclea. 1-célula ciliada interna, flecha-estereocilios, 2₁, 2₂, 2₃- células ciliadas externas (los subíndices indican las filas), 3₁- célula pilar interna, 3₂- célula pilar externa, 4- célula de Dieter, 5- células de Hensen, 6- células de Claudius. 7- células de Boetcher.

Células ciliadas

Los controles mostraron las células conservadas en las 3 regiones de la cóclea [8]. Las CC internas, con abundantes vacuolas, presentaban forma de pera con un núcleo redondeado central. Las CC externas presentaron forma cilíndrica, con el extremo apical aplanado y el núcleo redondeado, localizado en la porción basal. Tanto en las CC internas como en las externas se observaron penachos de estereocilios en la superficie apical.

En la vuelta apical de la cóclea se observaron amplios espacios entre las filas de CC externas, los cuales se van estrechando hacia la vuelta basal. Las CC se observaron menos altas y más delgadas en la vuelta basal que en las otras vueltas.

Células de soporte

En los animales controles las células de soporte del órgano de Corti presentaron aspecto normal [8]. Las células pilares (internas y externas) son las que limitan

el túnel de Corti. Las células de Dieter, de citoplasma un poco más denso que las anteriores, mostraron superficie apical en forma de cáliz sobre el cual descansan las CC externas.

Las células de Hensen y de Claudius, colindantes con las CC externas, tenían citoplasma claro y núcleos redondeados. Se observó disminución de tamaño de las células de Hensen y Claudius hacia la vuelta basal.

Las células de Boetcher, más pequeñas que las anteriores, mostraron citoplasma mucho más denso y núcleos también redondeados. No se observaron células de Boetcher en el ápice. En la vuelta media superior aparecen apenas 3 células formando un triángulo. En la vuelta media inferior y en la basal, las células de Boetcher se presentaron en grupos de 4 ó 5 células que formaban una especie de trapecio.

Animales sordos

A partir de la segunda semana de sordera se alteró el patrón de organización normal del OC y las CC y de soporte sufrieron cambios degenerativos en las tres vueltas cocleares, los cuales fueron más notables hacia la base (Fig. 5). A las 8 y 16 semanas de sordera se hizo más difícil distinguir los diferentes tipos celulares del OC y se mantuvo la mayor susceptibilidad hacia la base (Fig. 5).

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 [5]. 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. También se ha planteado que dicho gradiente de base a ápice puede ser resultado de una susceptibilidad diferencial de las CC externas a las especies reactivas del oxígeno que genera el agente ototóxico [9].

En la vuelta apical el patrón de organización celular del OC se afectó más hacia la zona de las CC externas en

todos los tiempos de sordera, haciéndolas indistinguibles de las células de Dieter. El túnel de Corti se mantuvo visible, aunque con deformaciones. El grosor de la capa de células sobre la membrana basilar disminuyó poco con el tiempo de sordera. A las 2 semanas las CC internas apenas se distinguieron, aunque en algunos animales se vieron estereocilios. A partir de la cuarta semana las células que ocupan la posición de las CC externas tienden a orientarse paralelamente a la membrana basilar. El grado de conservación de las células de Hensen y Claudius es bastante uniforme y similar al control hasta la semana 8. En la semana 16 el citoplasma de las células de Claudius se observó bastante claro con respecto a las otras células de soporte (Fig. 5).

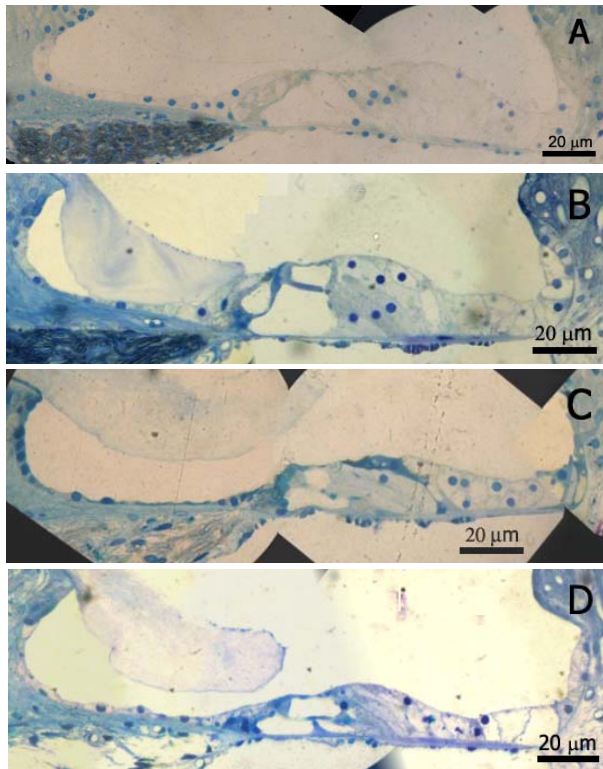


Fig. 5. Microfotografías del órgano de Corti al Microscopio Óptico en la vuelta apical. A) Control, B) Sordera 2 semanas, C) Sordera 8 semanas, D) Sordera 16 semanas. Imágenes reconstruidas con el programa Arcsoft Panorama Maker 3.0.

En la vuelta media todavía se delimitó el túnel de Corti en algunos animales sordos. Las células que ocupaban el espacio correspondiente a las ciliadas presentaron vacuolización y cambios de forma, que no permitían

identificarlas ni distinguir las CC externas con respecto a las células de Dieter. No se observaron estereocilios. Los trapecios característicos en que se disponen las células de Boetcher se encontraban aplanados y algunas células presentaron cierto grado de aclaramiento del citoplasma. Esto último debe ocurrir a expensas de pérdida de organelos y vacuolización, como se ha observado por Microscopía Electrónica en otras células de soporte del OC [3] y posiblemente comprometa el funcionamiento normal de estas células. Se apreció disminución del grosor de la capa de células sobre la membrana basilar (Fig. 6)

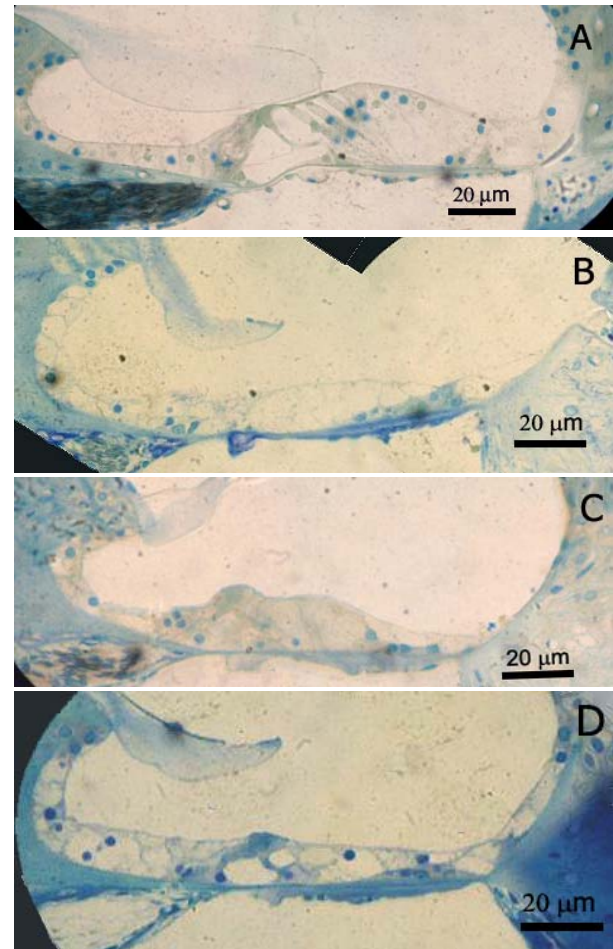


Fig. 6. Microfotografías del órgano de Corti al Microscopio Óptico en la vuelta media. A) Control, B) Sordera 2 semanas, C) Sordera 8 semanas, D) Sordera 16 semanas. Imágenes reconstruidas con el programa Arcsoft Panorama Maker 3.0.

En la vuelta basal el adelgazamiento de la capa de células del OC fue más notable. En todos los tiempos de sordera, la pérdida del epitelio en mosaico hace indistinguibles las CC y las de soporte; solo las de Boetcher se pueden identificar. Se observó un aplanamiento casi total a las 16 semanas de sordera y aclaramiento del citoplasma de las pocas células que quedan, entre ellas las de Boetcher. (Fig. 7). Las posibles consecuencias del aclaramiento se explicaron anteriormente.

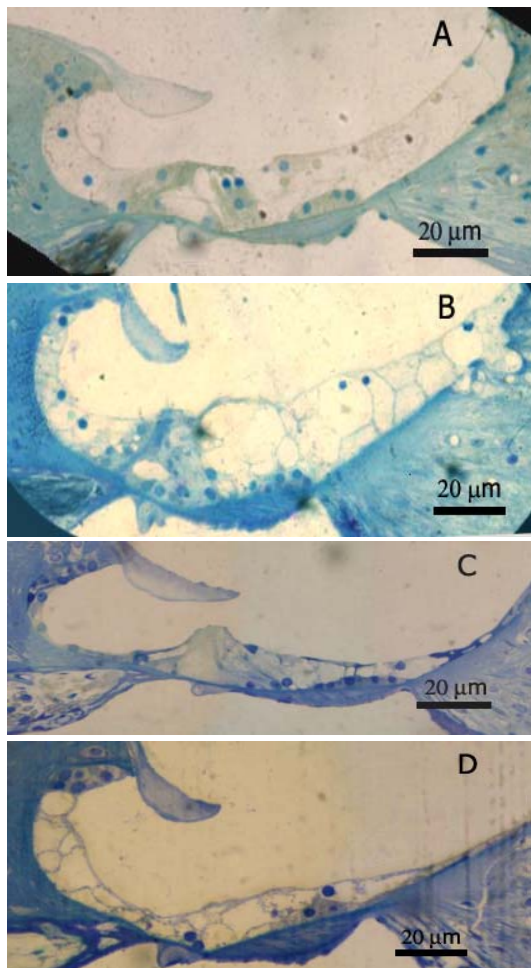


Fig. 7. Microfotografías del órgano de Corti al Microscopio Óptico en la vuelta basal. A) Control, B) Sordera 2 semanas, C) Sordera 8 semanas, D) Sordera 16 semanas. Imágenes reconstruidas con el programa Arcsoft Panorama Maker 3.0.

Morfometría

La longitud de la membrana basilar del OC disminuyó hacia la base de la cóclea en todos los grupos, incluyendo

los controles (Fig. 8), lo cual coincide con los datos de la literatura [10].

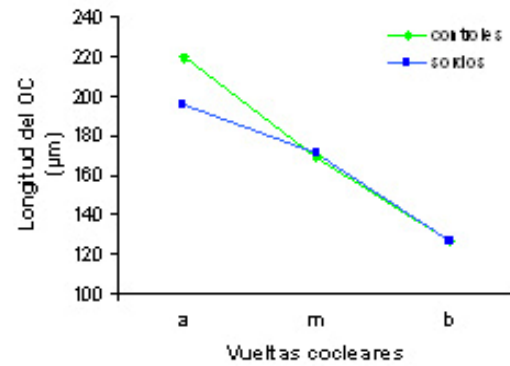


Fig. 8. Comportamiento de la longitud del órgano de Corti en animales controles y sordos, en las tres vueltas cocleares: a-apical, m-media y b-basal.

Como el patrón de disminución de la longitud del OC es igual en los animales controles que en los sordos, se puede decir que las variaciones en el área del OC no son a expensas de cambios de su longitud. Esto es lo que permite utilizar el área del OC como un posible indicador del grado de conservación.

El área del OC fue menor en los animales sordos que en los controles, y disminuyó hacia la base de la cóclea en todos los grupos (Fig. 9).

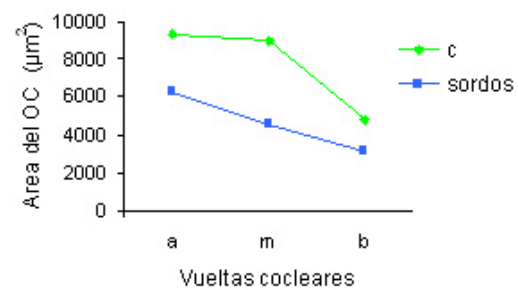


Fig. 9. Comportamiento del área del órgano de Corti en animales controles y sordos, en las tres vueltas cocleares: a-apical, m-media y b-basal.

La disminución del área del OC y de la DN hacia la vuelta basal en los animales sordos se acompañó de cambios degenerativos en las células del OC (Fig. 7).

Se observó una disminución progresiva del área del OC con el tiempo de sordera, en correspondencia con el comportamiento de la DN del ganglio espiral (Fig. 10) [4].

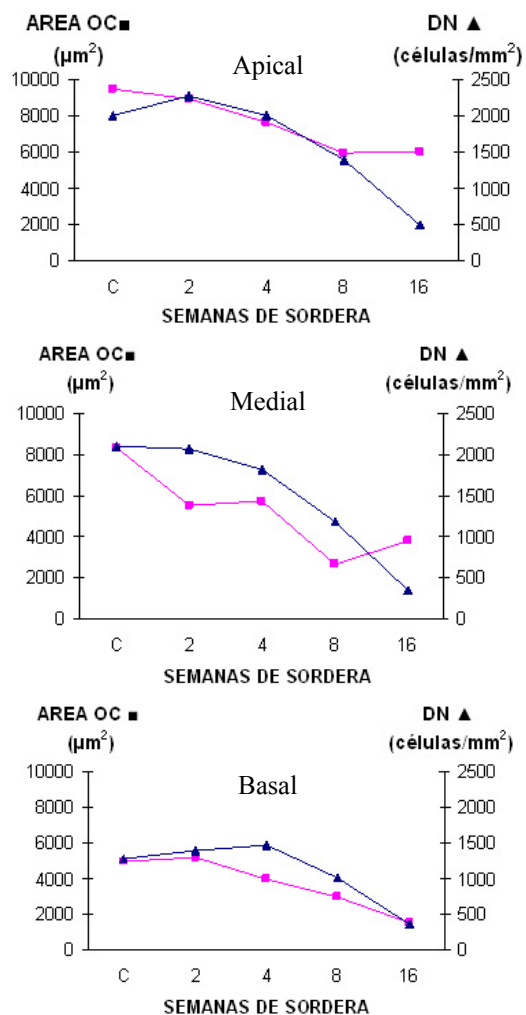


Fig. 10. Relación del área del OC con la DN del ganglio espiral según aumenta el tiempo de sordera, en las tres vueltas cocleares.

La mayoría de las ototoxinas, incluyendo los agentes quimioterapéuticos y antibióticos aminoglicósidos, tienen como blanco primario a las CC, pero afectan también a las neuronas del ganglio espiral [11–13]. En humanos, la mayoría de las sorderas son de origen sensorineural [14] y se plantea que el daño neuronal del ganglio espiral se debe a la pérdida del efecto trófico que ejercen las CC sobre esas neuronas [2]. El estado de las células de soporte del OC afecta también la supervivencia

neuronal [15]. En este trabajo se observaron cambios degenerativos en las CC y células de soporte antes de que se afectaran las neuronas del ganglio espiral.

Los implantes cocleares, aunque son la mejor opción en el tratamiento de la sordera, no restablecen totalmente la audición, por lo que actualmente se están estudiando diferentes estrategias terapéuticas para tratar esta afección. Entre ellas está la prevención de la muerte de las CC [16], los intentos por regenerarlas [17] y la regeneración de neuronas que inerven las nuevas CC [18].

CONCLUSIONES

La extrema sensibilidad de las células del OC a la ototoxicidad y su influencia sobre las neuronas del ganglio espiral, evidencian lo importante que resulta conocer los cambios morfológicos que sufren estas células vitales en la función auditiva.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Valia Rodríguez, al Lic. Armando Alvaré, al MSci. Pavel Prado y a los técnicos Oilime Prego y Teresa Díez, del Centro de Neurociencias de Cuba, por el trabajo con los animales de experimentación.

REFERENCIAS

- [1] Matsui J.I., Parker M.A., Ryals B.M., Comanche D.A. (2005) "Regeneration and replacement in the vertebrate inner ear" *Drug Discovery Today* 10: 1307.
- [2] Kopke R., Staecker H., Lefebvre P., Malgrange B., Moonen G., Ruben R.J., Van de Water T.R. (1996) "Effect of neurotrophic factors on the inner ear: clinical implications" *Acta Otolaryngol* 116: 248-52.
- [3] Rodríguez S., Coro R.M., Ancheta O., Valdés T., Harvey Y. (2006) "Morfología del órgano de Corti en ratas. Cambios inducidos por ototoxicidad". *Actas Hispanoamericanas de Patología*. 8°

- Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. <http://conganat.cs.urjc.es/>
- [4] Rodríguez S., Ancheta O., Coro R.M., Valdés T., Harvey Y., Rodríguez V., Alvaré A., Prado P. y Rodríguez V. (2005) “Cambios histológicos inducidos por ototoxicidad en ratas. Citoarquitectura del órgano de Corti y del ganglio espiral” *Rev. Ecuat. de Neurología* 14:13-18.
- [5] Raphael Y., Altschuler R.A. (2003) “Structure and innervation of the cochlea” *Brain Res. Bull* 60: 397-22.
- [6] Wayne Rasband. “ImageJ: A public domain Java image processing program”. National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- [7] Shepherd R. K. (2002) *Neuroprosthetics: Theory and Practice*, Singapur, World Scientific Publishing, pp. 1-23.
- [8] Glueckert R., Pfaller K., Kinnefors A., Schrott-Fischer A., Rask-Andersen H. (2005) “High resolution scanning electron microscopy of the human organ of Corti. A study using freshly fixed surgical specimens”. *Hear Res*; 199: 40–56.
- [9] Sha S.H., Taylor R., Forge A., Schacht J. (2001) “Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals” *Hear Res*; 155: 1-8.
- [10] Geneser F. (1999) “Histología sobre bases moleculares”. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S.A., 729-754.
- [11] Bichler E., Spöndlin H., Rauchegger H. (1983) “Degeneration of cochlear neurons after amikacin intoxication in the rat” *Arch. Otorhinolaryngol* 237: 201-8.
- [12] Gabaizadeh R., Staecker H., Liu W., Kopke R., Malgrange B., Lefebvre P.P., Van der Water T.R. (1997) “Protection of both auditory hair cells and auditory neurons from cisplatin induced damage” *Acta Otolaryngol* 117: 232-8.
- [13] McFadden S.L., Ding D., Jiang H., Salvi R.J. (2004) “Time course of efferent fiber and spiral ganglion cell degeneration following complete hair cell loss in the chinchilla” *Brain Res.* 997:40-51.
- [14] Lefebvre P.P., Staecker H., Van de Water T., Moonen G., Malgrange B. (2002) “Pharmacologic treatment of inner ear: from basic science to the patient” *Acta Otorhinolaryngol Belg* 56: 45-9.
- [15] Sugawara M., Corfàs G., Liberman M.C. (2005) “Influence of supporting cells on neuronal degeneration after hair cell loss” *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 6: 136.
- [16] Atar O. and Avraham K.B. (2005) “Therapeutics of hearing loss: expectation vs reality” *Drug Discovery Today* 10: 1323.
- [17] Minoda R., Izumikawa M., Kawamoto K., Raphael Y. (2004) Strategies for replacing lost cochlear hair cells. *Z. Neuroreport* 15: 1089.
- [18] Roehm P.C., Hansen M.R. (2005) “Strategies to preserve or regenerate spiral ganglion neurons” *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 13: 294-300.