

Efecto neuroprotector del péptido 6 liberador de la hormona del crecimiento (GHRP6) sobre el ganglio espiral. Estudio ultraestructural

ODELSA ANCHETA NIEBLA¹, SANDRA RODRÍGUEZ SALGUEIRO², MARIUSKA MATOS TERRERO²,
DIANA GARCÍA DEL BARCO HERRERA³, MAGALI ALONSO CASTELLANOS¹, HERMILDA ANCHETA NIEBLA¹.

¹Escuela Latinoamericana de Medicina, Departamento de Ciencias Morfológicas, La Habana, Cuba.

²Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Laboratorio de Microscopía Electrónica, La Habana Cuba.

³Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), División Farmacéuticos, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: estudiar el efecto del GHRP6 sobre la ultraestructura de las neuronas y los procesos periféricos del ganglio espiral en un modelo de ototoxicidad inducida por Kanamicina.

Material y Método: ratas machos Wistar, con audición normal, se dividieron en tres grupos. El grupo control, otro grupo tratado con Kanamicina y un tercero con GHRP6 más Kanamicina. Las cócleas obtenidas se perfijaron por perfusión en el canal perilinfático, con una mezcla de Paraformaldehído y Glutaraldehído después fueron descalcificadas con EDTA y posteriormente procesadas para su estudio por Microscopía Electrónica de Trasmisión.

Resultados: las neuronas y procesos periféricos del ganglio espiral del grupo control presentaron características normales. En el grupo de Kanamicina, encontramos alteraciones en las células y en los procesos periféricos. En el grupo tratado con el GHRP6 la ultraestructura de las neuronas y de los procesos periféricos del ganglio espiral mostraron mejor conservación.

Conclusiones: la preservación de la ultraestructura de las neuronas y los procesos periféricos del ganglio espiral tratados con el GHRP6 nos induce a considerar el posible uso del mismo para incrementar los beneficios de los implantes cocleares en individuos sordos.

Palabras clave: Cócleas; Ganglio Espiral; Ultraestructura; Péptido 6 (GHRP6).

INTRODUCCIÓN

Los Aminoglicósidos constituyen una familia de antibióticos de uso frecuente en el tratamiento de infecciones graves causadas principalmente por bacterias Gram negativas (1). Los beneficios clínicos de los aminoglicósidos en ocasiones se afectan por uno de sus efectos secundarios más persistentes y graves: la ototoxicidad (2).

La ototoxicidad generalmente comienza después que concluye el tratamiento farmacológico y a partir de entonces se desarrolla lentamente. Los aminoglicósidos inducen pérdidas auditivas desde 5% hasta 33% de los pacientes (3). El epitelio sensorial del oído interno favorece la entrada y acumulación de los aminoglicósidos (4).

La muerte por apoptosis de las células ciliadas cocleares en el órgano de Corti inducida por los Aminoglicósidos, conduce a la pérdida de neuronas en el ganglio espiral. Esto se debe a que las células ciliadas, en condiciones fisiológicas, producen estímulos que promueven la supervivencia en las neuronas, de manera que la pérdida de las células ciliadas interrumpe el sustento trófico de dichas células (5). Como las células ciliadas y las neuronas del ganglio espiral no tienen capacidad de regenerarse cuando alcanzan la madurez, su degeneración conduce a sordera neurosensorial permanente.

En la actualidad numerosos estudios preclínicos se dirigen a contrarrestar la toxicidad inducida por aminoglicósidos utilizando diversos enfoques (6). La mayoría de los estudios precedentes, basados en biomodelos agudos de daño coclear, se han dirigido a la búsqueda de un efecto profiláctico para preservar el órgano de Corti, más que a la selección de alternativas terapéuticas con carácter regenerador (7).

En la práctica clínica la mejor opción para tratar la sordera por Aminoglicósidos, al igual que cualquier otro tipo de sordera, son los implantes cocleares (8). Sin embargo, estos dispositivos no restauran totalmente la función auditiva y su eficiencia depende de la preservación de las neuronas del ganglio espiral (9). En este sentido las alternativas son la preservación de la población de neuronas del ganglio espiral y la regeneración de los procesos periféricos que estén más próximos al electrodo (10).

Hasta el momento no se ha establecido ningún método clínicamente efectivo que evite los efectos tóxicos de los aminoglicósidos. Entre los tratamientos más promisorios se encuentran los agentes antiapoptóticos. El péptido 6 liberador de la hormona de crecimiento (GHRP6) es un ejemplo de este tipo de agentes, el cual ha mostrado capacidad citoprotectora en varias enfermedades (11). Sin embargo, no se han estudiado sus efectos en modelos de daño coclear inducido por aminoglicósidos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del GHRP6 sobre la ultraestructura de las neuronas y los procesos periféricos del ganglio espiral en un modelo animal con ototoxicidad inducida por Kanamicina.

MÉTODO

Diecinueve ratas machos Wistar, con audición normal, se dividieron en tres grupos. El grupo control fue tratado con 0.1 mol/L de buffer Fosfato de Sodio; un Segundo grupo se trató con 700 mg/kg por peso corporal de Sulfato de Kanamicina. El tercer grupo fue tratado con 600 µg/kg por peso corporal de GHRP6 más la misma dosis de Kanamicina. Este procedimiento se realizó una vez al día durante 9 días. Seis semanas después de concluido el tratamiento se extrajo una cóclea por animal y se procesó para su estudio por microscopia electrónica (Figura 1).

Diseño experimental



Figura 1. Diseño experimental.

Para obtener las cócleas los animales fueron perfundidos transcardiacamente con formalina al 10% en buffer de Fosfato de sodio 0.1 mol/L.

Las cócleas obtenidas se fijaron inmediatamente con Paraformaldehido al 2% y Glutaraldehido al 2% en 0.1 mol/L de buffer Fosfato de Sodio (pH 7.4) perfundidos en el canal perilinfático.

Posteriormente las cócleas fueron descalcificadas con EDTA al 8,3%; postfijadas en tetróxido de osmio al 1% en el mismo buffer; deshidratadas en acetona y posteriormente fueron incluidas en resina Spurr (12).

Los cortes se realizaron en un Ultratome III de la LKB. Los cortes ultrafinos (rampa medial) se montaron en rejillas de 400 mesh, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron analizadas en el microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss modelo EM10C operado a 60kv.

RESULTADOS

En las neuronas del ganglio espiral del grupo control observamos características normales de su citoplasma, núcleo y láminas de mielina (Figura 2).

En el grupo tratado con Kanamicina, encontramos núcleos irregulares con separación de las membranas de la envoltura

nuclear. Las mitocondrias presentaron balonamiento y pérdida de sus crestas. Tanto en el Retículo Endoplasmático como en el aparato de Golgi se observó dilatación de sus cisternas. También se observó edema citoplasmático. Las hojas de mielina presentaron ruptura y separación entre ellas (Figura 3).

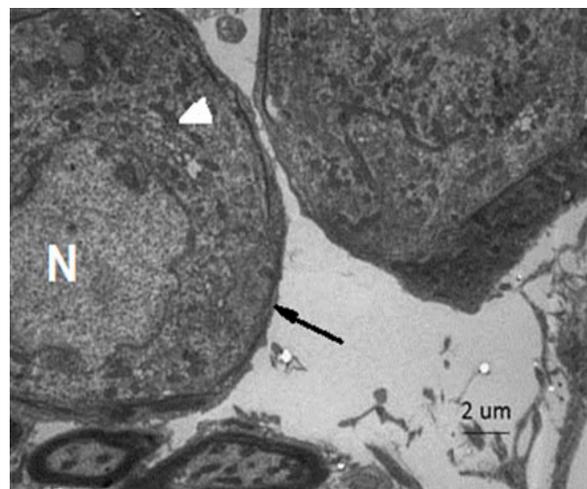


Figura 2. Micrografía de neuronas del ganglio espiral del grupo control. N- núcleo, Cabeza de flecha blanca- mitocondrias normales, Flecha negra- hojas de mielina normales.

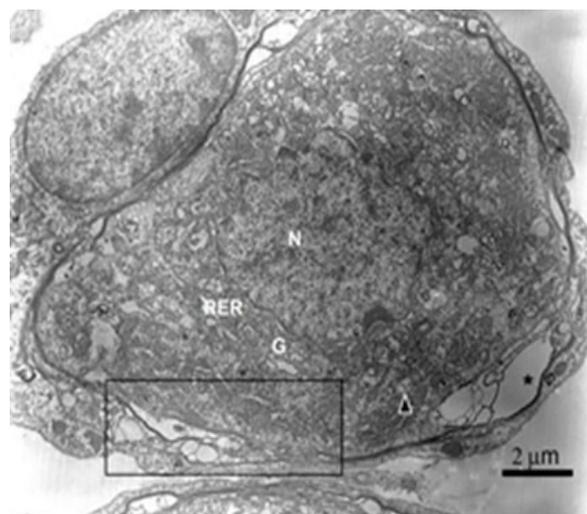


Figura 3. Micrografía de neurona del ganglio espiral del grupo Kanamicina. N-núcleo, Cabezas de flechas negras-mitocondrias dañadas, Rectángulo- área de ruptura y separación de las láminas de mielina, RER-retículo endoplasmático rugoso, G-complejo de Golgi, *- áreas de edema citoplasmático.

En el grupo tratado con el GHRP6 la ultraestructura de las neuronas del ganglio espiral mostró mejor conservación de sus núcleos, citoplasma y láminas de mielina (Figura 4).

En los procesos periféricos del grupo control se observó la capa de mielina bien conservada (Figura 5 A).

En el grupo de Kanamicina se observó separación de las láminas de mielina, así como en algunas áreas de ruptura de las mismas (Figura 5 B).

En el grupo tratado con GHRP6 la mielina de los procesos periféricos se observó bien conservada (Figura 5 C).

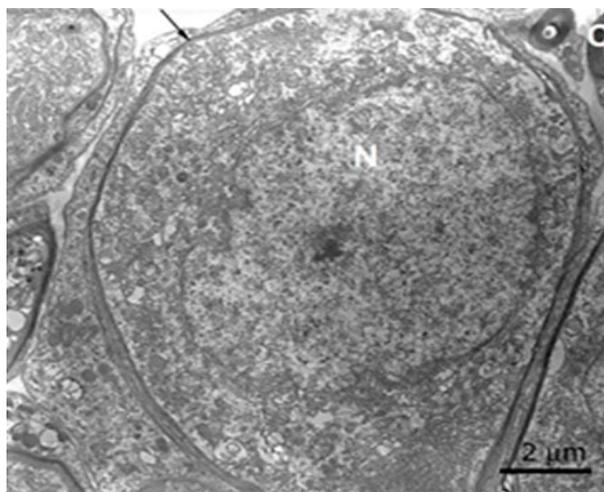


Figura 4. Micrografía de neurona del ganglio espiral del grupo GHRP6. Mejor conservación de sus núcleos (N), citoplasma y láminas de mielina (flecha).

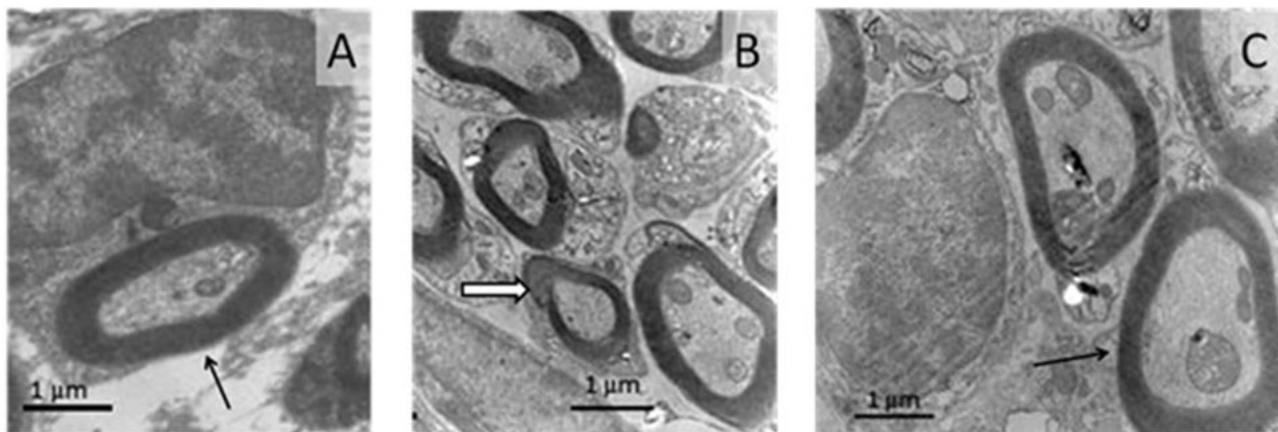


Figura 5. Procesos periféricos. A) Control, B) Kanamicina, C) GHRP6. Flechas negras- capas de mielina normales, flechas blancas- zonas de ruptura de las hojas de mielina.

CONCLUSIONES

La conservación de la ultraestructura de las neuronas, así como de los procesos periféricos del ganglio espiral de los animales tratados con el GHRP6 nos induce a considerar el posible uso de este producto para incrementar los beneficios de los implantes cocleares en individuos sordos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen LF, Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Med Clin North Am.* 2011;95(4):819-42, viii-ix.
2. Xie J, Talaska AE, Schacht J. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear Res.* 2011;281(1-2):28-37.
3. Mac Dougall CaC, H.F. Chemotherapy and Microbial Diseases. Aminoglycosides. In: Brunton LL, editor. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Twelfth ed: Mc Graw Hill Medical; 2011. p. 1991.
4. Karasawa T, Steyger PS. Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity. *Integr Biol (Camb).* 2011;3(9):879-86.
5. Op de Beeck K, Schacht J, Van Camp G. Apoptosis in acquired and genetic hearing impairment: the programmed death of the hair cell. *Hear Res.* 2011;281(1-2):18-27.
6. Mukherjea D, Rybak LP, Sheehan KE, Kaur T, Ramkumar V, Jajoo S, et al. The design and screening of drugs to prevent acquired sensorineural hearing loss. *Expert Opin Drug Discov.* 2011;6(5):491-505.
7. Yorgason JG, Luxford W, Kalinec F. In vitro and in vivo models of drug ototoxicity: studying the mechanisms of a clinical problem. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(12):1521-34.
8. Wilson BS, Dorman MF. Cochlear implants: current designs and future possibilities. *J Rehabil Res Dev.* 2008;45(5):695-730.
9. Nichani J, Bruce IA, Mawman D, Khwaja S, Ramsden R, Green K. Cochlear implantation in patients deafened by ototoxic drugs. *Cochlear implants international.* 2013;14(4):207-12.

10. Pflug BE, Bowling SA, Colesa DJ, Garadat SN, Raphael Y, Shibata SB, et al. Cochlear infrastructure for electrical hearing. *Hear Res.* 2011;281(1-2):65-73.
11. Berlanga-Acosta J, Abreu-Cruz A, García-del Barco Herrera D, Mendoza-Marí Y, Rodríguez-Ulloa A, García-Ojalvo A, Falcón-Cama V, Hernández-Bernal F, Beichen Q, Guillén-Nieto G. Synthetic Growth Hormone-Releasing Peptides (GHRPs): A Historical Appraisal of the Evidences Supporting Their Cytoprotective Effects. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 11: 1-9, 2017.
12. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of ultrastructure research.* 1969; 26(1):31-43.

Neuroprotective effect of hormone-releasing peptide 6 Growth (GHRP6) on the spiral ganglion. Ultrastructural study

ABSTRACT

Objective: to study the effect of GHRP6 on the ultrastructure of neurons and the peripheral processes of the spiral ganglion in a model of ototoxicity induced by Kanamycin.

Material and Method: male Wistar rats, with normal hearing, were divided into three groups. The control group, another group treated with Kanamycin and a third with GHRP6 plus Kanamycin. The obtained cochleas were prefixed by perfusion in the perilymphatic channel, with a mixture of Paraformaldehyde and Glutaraldehyde, then decalcified with EDTA and subsequently processed for study by Transmission Electron Microscopy.

Results: the neurons and peripheral processes of the spiral ganglion of the control group presented normal characteristics. In the Kanamycin group, we found alterations in the cells and peripheral processes. In the group treated with GHRP6, the ultrastructure of the neurons and the peripheral processes of the spiral ganglion showed better conservation.

Conclusions: The preservation of the ultrastructure of the neurons and the peripheral processes of the spiral ganglion treated with the GHRP6 leads us to consider the possible use of it to increase the benefits of cochlear implants in deaf individuals.

Keywords: Cocleas; Spiral ganglion; Ultrastructure Peptide 6 (GHRP6).