

Entzefalopatia hipoxiko-iskemikoaren eragina arratoien entzunbidean

(The effect of hypoxic ischemic encephalopathy in mice auditory pathway)

Miren Revuelta¹, Antonio Alvarez², Enrique Hilario²

¹ Onkologia Zelular Saila, Biodonostia Institutua

² Biologia Zelular eta Histologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea. EHU

miren.revuelta@biodonostia.org

DOI: 10.1387/ekaia.18970

Jasoa: 2018-01-26

Onartua: 2018-02-20

Laburpena: Entzunbidearen garapena nerbio sistema zentralaren mielinizazioaren menpe dago, eta entzefalopatia hipoxiko-iskemikoak eta antzeko gaitzek kalte egin diezaiokete. Gure helburua izan da entzunbidearen funtzio egokia ebaluatzea eta metodo histologiko eta molekularren bitartez kaltea aztertzea, 7 eguneko Sprague Dawley arratoiak erabiliz. Gure emaitzek hipoxia iskemiko baten ostean entzunbidea kaltetzen dela baieztatzen dute; izan ere, elektrofisiologikoki estimulu baten erantzuna atzeratzen da kaltearen ostean, astrozitoen erreaktibitate handiagoa dago animalia kaltetuen kasuan, eta mielina galera gertatzen da animalia horietan.

Hitz gakoak: Hipoxia iskemikoa (HI), entzumen gaitasuna, entzefalo enborraren entzumeneko erantzuna (ABR), behe kolikulua, arratoiak.

Abstract: Maturation of the auditory pathway is dependent upon central nervous system myelination and it can be affected by pathologies such as neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Our aim was to evaluate the functional integrity of the auditory pathway and to visualize by histological methods, the damage to the brainstem using a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. Our results support the hypothesis that hypoxic ischemic injury has negative effects on the functional changes of the auditory pathway and on the astrocyte reactivity and myelin reduction.

Keywords: Hypoxic-ischemic injury (HI), auditory threshold, auditory brainstem response (ABR), inferior colliculus, rats.

1. SARRERA

Mundu osoan 70 milioi pertsona inguruk omen du entzumen ezgaitasunen bat, gizakiaren ohiko gaitz neurosensorial bat izanik. Helduen artean, entzumen ezgaitasuna lehen 10 gaixotasun ohikoenen artean dago, gizon zein emakumeei era berean erasaten diela.

Entzumen ezgaitasunen kausen artean, arazo perinatalak %18 dira [1]: 1.000 jaioberritik biri erasaten die gaitzak. Horiek horrela, arazoa goiz detektatzeko teknika espezifikoek beharra dago, jaiotzean bertan erabiltzeko [2].

1.1. Entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa

Entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa (HI) oxigeno kontzentrazioa (O_2) murriztearen edo odol fluxua gutxitzearen eraginez gertatzen da, batzuetan asfixia baten ondorioz [3, 4]. Asfixia perinatalak arazo neurologiko ugari dakartza erditu ostean, hala nola esnatzeko arazoak, muskuluetako tonizitate-aldaketak eta erantzun motor eta erreflexuen galera. Kaltearen nolakoa asfixia mailaren eta iraupenaren arabera da [5-7], eta baita ahultasun mailaren arabera ere, hori selektiboa baita zelulekiko. Azken horren ondorioz, zelula batzuk hil, eta beste batzuk ilunantz iskemiko batean sartzen dira, eta batzuetan, aurrerago, nekrosi edo apoptosi batean ere bai (heriotza atzeratua).

Asfixia (hipoxia) iskemiko batek, kalte fisiologikoez gainera, zelula mailan ere kalte ugari sortzen ditu, batez ere neuronetan, zelularik ahulena baitira oxigeno murrizketaren aurrean, baina, horietaz gainera, zelula glialak ere kaltetuak ager daitezke [8, 9]. Egoera horietan, oligodendroito zein astrozitoak kitzikatzeko gaitasun handiagoa dute, eta baita erradikal askeak sortzeko ere; ondorioz, apoptosiak jota hiltzeko arriskua ere handitzen da [7, 10].

1.2. Entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa eta entzumena

Ikerketa esperimental zein klinikoez baiezatu dute hipoxia iskemikoak entzumen gaitasunaren galeran eragina duela. Izan ere, entzunbide neuralen garapena nerbio sistema zentralaren mielinizazioarekin erlazionatuta dago [11], eta mielinizazio eta garapen egokia kaltetuak gerta daitezke hainbat gaitzen ondorioz; besteak beste, entzefalopatia hipoxiko-iskemiko neonatalaren ondorioz.

1.3. Soinuaren monitorizazioa

Jaioberrien entzumen gaitasuna neurtzeko metodo espezifiko zein sentikorrek beharrezkoak dira, eta gehien erabiltzen direnen artean emi-

sio otoakustikoak eta entzumeneko potentzial ebokatuak ditugu [12]. Potentzial ebokatu horiek estimulu akustiko baten ostean sortzen diren eta entzunbidean zehar gertatzen diren voltaje aldaketak neurtzen dituzte. Potentzial horiek arrazoi hauengatik gerta daitezke:

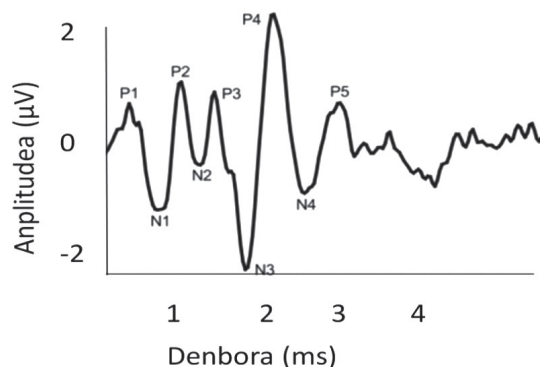
- Neuronaren despolarizazioaren ostean sortzen diren akzio potentzialak.
- Potentzial postsinaptiko, kitzikatzaille edo inhibitzaileak izan daitezke. [13].

Estimuluaren intentsitate aldaketek uhinen anplitudea zein latentzia aldarazten dituzte, baina baita haien morfologia ere.

1.4. Soinuaren interpretazioa zein errepresentazioa

Entzefalo enberraren entzumeneko erantzuna (ABR) neurtzean, uhin baten 5 tontor bereiz ditzakegu (1. irudia), horietariko bakoitza egitura anatomiko baten erantzunari dagokiola. Estimuluaren intentsitateak entzumen ataria sortzen du, eta era horretan 40 Db-tik beherako entzumen ataria duten pertsonen hipoakusiak diagnostikatzea ahalbidetzen digu.

- Entzumen nerbioa = I. tontorra (P1).
- Nukleo koklearrak = II. tontorra (P2).
- Goi oliba = III. tontorra (P3).
- Alboko lemniskoa = IV. tontorra (P4).
- Behe kolikulua = V. tontorra (P5).



1. irudia. Estimulu akustiko baten ondorioz sortutako entzefalo enberraren entzumeneko erantzuna, non uhinaren 5 tontorrek egitura anatomiko baten erantzunari dagozkion.

1.5. Entzumen atariaren aldaketak

Aurretik egindako hainbat ikerketak erakutsi dute ABRek oxigeno kontzentrazioarekiko sentikortasun handia dutela; hain zuzen ere, kontzentrazio hori gutxitzeak kalte neurosensorialak eragiten ditu Cortiren organoan, eta baita entzefalo enborreko nukleo galera ere, hala nola nukleo klocklearren eta behe kolikuluko neuronen galera [5, 14]. Kaltea neurtzeko orduan, V. tontorraren latentzia zein I. tontorretik V.-era dagoen latentzia tartekak dira gehien erabiltzen diren parametroak. Parametro horiek neuronen garraioarekin guztiz erlazionaturik daude, eta baita funtzio sinaptikoarekin zein mielinizazioarekin ere [15].

Parametro horietako aldaketek latentzia zein anplitudeak aldatu daudela esan nahi dute eta, ondorioz, entzunbidean arazoak daudela [16].

Horrela, lehen tontorraren latentzia normala baino atzeratuagoa badago, entzumen sistema periferikoko estrukturak kaltetuak daudela esan nahi du horrek, eta kaltea entzefalo enborreko barne sisteman kokatzen bada, berriaz, IV.-V. tontorren latentzien denboraren atzerapenekin edo horien desagertzearekin erlazionatzen da [16, 17].

Elektrofisiologian atzemandako kalte horiek ikerketa histopatologikoen erlazionatzen dira, entzefalo enborreko behe kolikuluko neuronak kaltetuak agertzen baitira HI baten ondorioz. Gainera, gaur egun ditugun eza-gutza biokimiko zein molekularrei esker, geroz eta alternatiba terapeutiko gehiago probatzen ari dira, asfisia perinatalak dakartzen ondorioak ekiditeko edo murrizteko.

1.6. Helburua

Gure lanaren helburua zera izan da: entzefalopatia hipoxiko-iskemiko batek behe kolikuluko neuronetan eta entzunbidearen elektrofisiologian zer eragin duen ikustea. Horretarako hainbat proba histologiko, elektrofisiologiko zein molekularren bitartez kaltea nolakoa den aztertzen saiatu gara.

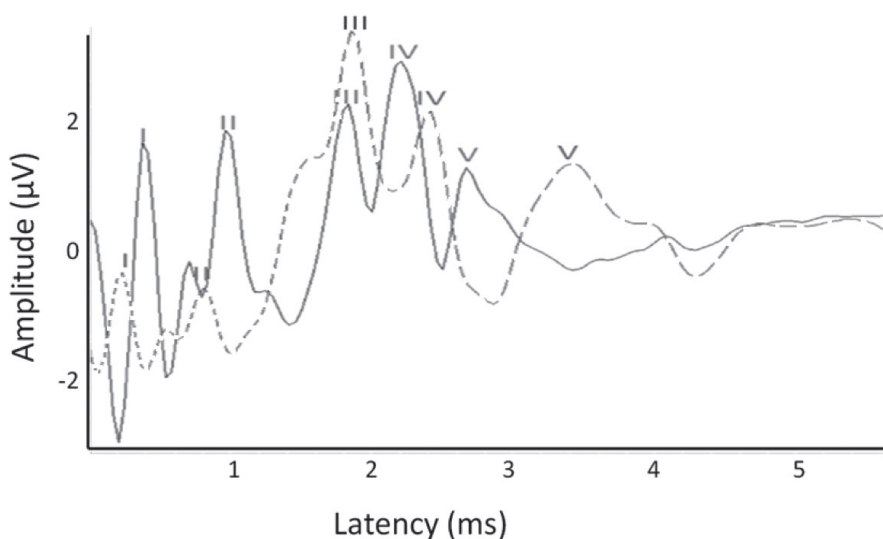
2. MATERIALA ETA METODOA

Gure lana egiteko, 7 eguneko Sprague Dawley arratoiak erabili genituen. Hain zuzen, elektrofisiologia neurtzeko, ABRak (hau da, entzefalo enborraren entzumeneko erantzunak).

Animaliak ketaminarekin eta xilazinarekin anestesiatu ziren (80 eta 10 mg/kg). ABRak neurtzeko GSI Audera aparatua erabili genuen [18], 2016an erabilitako parametroetan oinarrituz. Neurketak zarata gabeko gela batean egin ziren, ABR anplitude eta latentziak neurtuz.

3. EMAITZAK

Gure emaitzek lehen aldiz baieztatzen dute entzunbidean zehar HI baten ondorioz kaltea gertatzen dela. Alde batetik, IV. zein V. tontorren iraupena luzatzen dela ikus dezakegu hipoxia iskemikoaren ostean (2. irudia). IV. tontorra lemniskoaren erantzunari dagokio, eta V.a, berriz, behe kolikuluaren erantzunari.



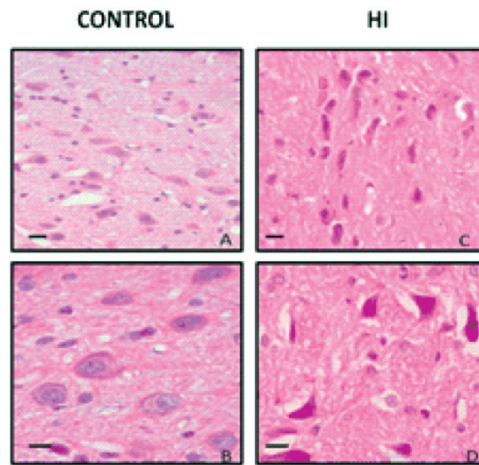
2. irudia. 7 eguneko Sprague Dawley arratoiaren entzumen gaitasunaren grafikoa, non estimulu akustiko baten osteko entzunbidearen lehen 10 ms-etako egitura anatomikoen erantzunak agertzen diren. Marra baten bitartez animalia kontrol bat irudikatzen da, eta marra etenene bitartez animalia hipoxiko-iskemiko bat.

Histologian aldaketa morfologikoak behe kolikuluan soilik ikusi ditugenez, behe kolikuluaren azterketetan oinarrituko gara hemendik aurrera.

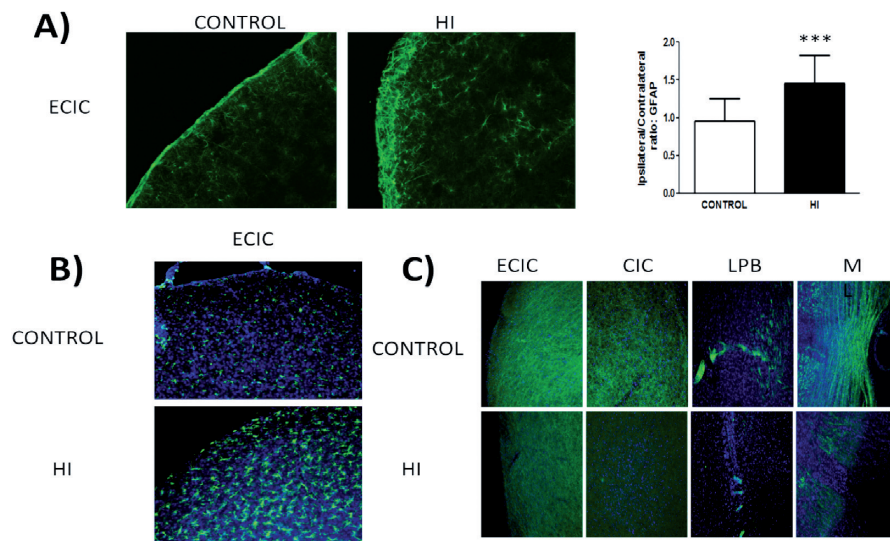
Neuronen morfologia aztertzeko hematoxilina-eosina tindaketa histologikoa egin genuen.

Behe kolikuluko neuronen morfologia hipoxikoen kasuan zitoeskeletoa kontzentratua agertzen da, morfologia aldakorra eta tamaina handia izanik; kaltetuak dauden seinale, hain zuzen ere (3. irudia).

Immunofluoreszentziaren bitartez, GFAP (astrozitoen erreaktibitatea aztertzeko) eta MBP (oligodendrozitoak tindatzeko) tindaketak aztertu genituen.



3. irudia. Hematoxilina-eosinaz tindaturiko laginak, non neuronak bereiz ditzakegun. A-B) animalia kontrolak, C-D) HI.



4. irudia. (A) GFAP immunofluoreszentzia behe kolikuluaren kanpoaldean eta beraren kuantifikazioa, datuak honela daude adierazita: taldeen batezbestekoak + SEM (* $p < 0.05$ vs Kontrolak eta # $p < 0.05$ vs HI, ANOVA) (B) MBP immunofluoreszentzia aurreko zona berean eta (C) Behe kolikuluko zona guztietan. ECIC (behe kolikuluaren kanpoaldea), CIC (behe kolikuluaren erdialdea), LPB (alde bateko nukleo pontinoak) eta M (nukleo motorrak).

Kriotomoz moztutako laginak (30 µm) berriz hidratatu, peroxidasa endogenoarekin blokeatu (%1), eta mouse anti-GFAP antigorputz primarioan eduki ziren gau osoan (1:500, Dako, Denmark). Hurrengo egunean, antigorputz sekundarioarekin (1:1000) inkubatu ziren ordu batez, eta mikroskopiaarekin argazkiak atera genituen. MBP immunofloreszentziarako, berriz, protokolo berdina erabili genuen antigorputz primarioa 1:200 kontzentrazioan erabiliz (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Astrozitoen kasuan ere, astroglia aztertzeko orduan hipoxikoen kasuan erreaktivitate maila handiagoa da kontrolekin konparaturik.

Oligodendroitoak azertzean, mielina kontzentrazio baxuagoa dute animalia hipoxikoek, eta ez da hala gertatzen antioxidatzaileekin tratatutako animalietan, kaltea txikiagoa den seinale-edo (4. irudia).

4. ONDORIOAK

Gure emaitza guztiak kontuan hartzen baditugu, lehen aldiz berretsi dugu entzumen sistemako morfologiaren eta funtzionalitatearen arteko korrelazioa HI baten ostean. Guk dakigula, hau da lehen aldia frogatzen dela hipoxia iskemikoak bai funtzionalki bai histologikoki entzumen gaitasunean eta behe kolikuluko neuronetan eragindako kaltea. Hori garrantzitsua izan liteke gizakiei aplikatzeko eta baita beste zona batzuetan eraginkorrak izan diren tratamenduak entzunbidean probatzeko.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] MAZUREK B, HAUPT H, GEORGIEWA P, KLAPP B, REISSHAUER A. 2006. «A model of peripherally developing hearing loss and tinnitus based on the role of hypoxia and ischemia». *Medical Hypotheses*. **67**. 892-899.
- [2] MORENO-AGUIRRE AJ, SANTIAGO-RODRÍGUEZ E, HARMONY T, eta FERNÁNDEZ-BOUZAS A. 2012. «Effect of Hearing Aids on Auditory Function in Infants with Perinatal Brain Injury and Severe Hearing Loss». *PLoS One*. **7**. 4100.
- [3] CAPLAN LR. 2000. «Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect?» *Neurology*. **28**. 55(10)-1596.
- [4] VOLPE JJ. 1995. «Hypoxic-ischemic encephalopathy: Clinical aspects». *Neurology of the Newborn*. 314-369.
- [5] JOHNSTON MV. 1998. «Selective vulnerability in the neonatal brain». *Ann Neurol*. **44**. 155-156.
- [6] HILARIO E, ALVAREZ A, ALVAREZ FJ, GASTIASORO E, VALLS-I-SOLER A. 2006. «Cellular Mechanisms in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury». *Current Pediatric Rev*. **2**. 131-141.

- [7] ALVAREZ A, HILARIO E, GOÑI DE CÉRIO F, VALLS-I-SOLER A, ALVAREZ-DÍAZ FJ. 2007. «Hypoxic-Ischemic Injury in the Immature Brain-Key Vascular and Cellular Players». *Neonatology*. **92**. 227-235.
- [8] HILARIO E, REY-SANTANO MC, GOÑI-DE-CERIO F, ALVAREZ FJ, GASTIASORO E, MIELGO VE, CABALLERO A, VALLS-I-SOLER A, GÓMEZ-URQUIJO S, ALVAREZ A. 2005. «Cerebral blood flow and morphological changes after hypoxic-ischaemic injury in preterm lambs». *Acta Paediatr*. **94**. 903-11.
- [9] GOÑI-DE-CERIO F, ALVAREZ A, CABALLERO A, MIELGO VE, ALVAREZ FJ, REY-SANTANO MC, GASTIASORO E, VALLS-I-SOLER A, BILBAO J, HILARIO E. 2007. «Early cell death in the brain of fetal preterm lambs after hypoxic-ischemic injury». *Brain Res*. 2.161-71.
- [10] INDER TE, VOLPE JJ. 2000. «Mechanisms of perinatal brain injury». *Semin Neonatol*. **5**. 3-16.
- [11] HEPPER PG, SHAHIDULLAH BS. 1994. «Development of fetal hearing». *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 71. F81-F87.
- [12] BOGACZ J, CHOUZA C, ROMERO S, BOGACZ A, CORREA H, BARBEAU A. 1984. «Visual evoked potentials and brain stem auditory potentials in Friedreich's ataxia--a longitudinal study». *Can J Neurol Sci*. **11**.565-9.
- [13] PLOURDE G. 2006. «Auditory evoked potentials». *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. **20**. 129-139.
- [14] FREEMAN DT. 1991. «Computer recognition of brain stem auditory evoked potential wave V by a neural network». *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care*. 305-309.
- [15] TOMIMATSU T, FUKUDA H, ENDOH M, MU J, KANAGAWA T, HOSONO T, KANZAKI, T, DOI K, KUBO T, MURATA Y. 2003. «Long-term neuroprotective effects of hypothermia on neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats, assessed by auditory brainstem response». *Pediatr. Res*.**53**. 57-61.
- [16] JIANG ZD, LIU XY, SHI BP, LIN L, BU CF, WILKINSON AR. 2008. «Brainstem auditory outcomes and correlation with neurodevelopment after perinatal asphyxia». *Pediatr Neurol*. **39**. 189-195.
- [17] SIMPSON GV, KNIGHT RT, BRAILOWSKY S, PROSPERO-GARCIA O, SCABINI D. 1985. «Altered peripheral and brainstem auditory function in aged rats». *Brain Res*. **1**.28-35.
- [18] REVUELTA M, ARTEAGA O, MONTALVO H, ALVAREZ A, HILARIO E, MARTINEZ-IBARGÜEN A. 2016. «Antioxidant Treatments Recover the Alteration of Auditory-Evoked Potentials and Reduce Morphological Damage in the Inferior Colliculus after Perinatal Asphyxia in Rat». *Brain Pathol*. **26(2)**:186-98.